



ACTES DE COLLOQUES  
n° 1 1985

BASES BIOLOGIQUES  
DE L'AQUACULTURE

MONTPELLIER  
12-16 DÉCEMBRE 1983



2L001





ACTES DE COLLOQUES N° 1

# BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE

MONTPELLIER  
12-16 DÉCEMBRE 1983

Le colloque sur  
**LES BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE**

s'est tenu  
à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc  
du 12 au 16 décembre 1983

**Comité d'Organisation**

Pr. Y.A. FONTAINE  
Dr L. LAUBIER  
Pr. P. LUBET  
Dr J.J. MEUSY

**Secrétariat Scientifique**

Dr D. REYSS

IFREMER - SERVICE DOCUMENTATION-PUBLICATIONS  
CENTRE DE BREST  
B.P. 337 - 29273 BREST CEDEX  
Tél. (98) 45.80.55 - Télex OCEANEX 940627 F

---

ISSN 0761-3962

© Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, 1985

## COMMUNICATIONS

<b>ALGUES</b> .....	13
. COSSON J. ET P. GAYRAL - Les bases expérimentales des hybridations réalisées chez les Laminariales des côtes françaises. ....	15
. CHOPIN T., J.Y. FLOCH, C. BODEAU-BELLION, M. PENOT - Nutrition phosphorée chez <i>Chondrus crispus</i> Stackhouse. ....	19
. BRAULT D., X. BRIAND, P. GOLVEN - Les "marées vertes". Premier bilan concernant les essais de valorisation. ....	33
<b>MOLLUSQUES</b> .....	43
. RIVA A. ET H. MASSE - Etude écophysiologique de quelques mollusques bivalves. ....	45
. FIALA-MEDIONI A., M. COPELLO, J.C. COLOMINES - Relations trophiques entre huître et milieu : influence de la concentration et de la taille des particules. ....	63
. BOUCAUD-CAMOU E., C. LEBESNERAIS, P. LUBET, I. LIHRMANN - Dynamique et enzymologie de la digestion chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> . ....	75
. HILLY A. - Etude histoenzymologique de la digestion chez <i>Ruditapes philippinarum</i> . ....	97
. DESLOUPS PAOLI J.M., J.M. HERAL, M. MASSE - Bilan énergétique d'une population naturelle de <i>Crepidula fornicata</i> dans le bassin de Marennes-Oléron. ....	109
. PODER M., M. AUFFRET, G. BALOUET - Etude pathologique et épidémiologique des lésions parasitaires chez <i>Ostrea edulis</i> L. Premiers résultats d'une recherche prospective comparative chez les principales espèces de Mollusques des zones ostréicoles. ....	125
. MORAGA D., A. LUCAS - Polymorphisme électrophorétique de trois populations de palourdes <i>Ruditapes decussatus</i> de palourde. ....	139
. LEBORGNE Y. - Dix ans de production d'écloserie de mollusques bivalves. ....	151
<b>CRUSTACES</b> .....	155
. BARBE L., J. LAUTIER, G. VERNET, A. VEY - L'adaptation écophysiologique de l'écrevisse turque ( <i>Astacus leptodactylus</i> ) à des milieux saumâtres : contribution à l'astaciculture. ....	157
. KO G. L., N. PASTEUR, F. BONHOMME, D. LIAO - Variabilité génétique chez quelques espèces de crevettes pénaïdes d'intérêt aquacole. ....	175
. BELLON-HUMBERT C. - Développement embryonnaire de <i>Palaemon serratus</i> . Résultats préliminaires. ....	181
. LAUBIER A., L. CHIM, G. PAYEN - Morphogénèse sexuelle et activité génitale chez la crevette <i>Penaeus japonicus</i> en élevage. ....	195
. MEUSY J.J., P. JUGAN, C. ZERBIB - Les cellules folliculaires secondaires de la crevette <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (Décapode Palaémodié) : mise en évidence d'un réseau tubulaire impliqué dans les échanges entre l'hémolymphe et l'ovocyte. ....	207
. GOUDEAU M., F. LACHAISE, P. KUBISZ, H. GOUDEAU - Données cytologiques, électrophysiologiques et biochimiques relatives au phénomène de fécondation chez le homard ( <i>Homarus gammarus</i> L.) et implication du processus d'activation sur le mécanisme d'attache des oeufs pondus. ....	217
. LOREC J. - Une écloserie à homard et le repeuplement. Bilan, points de blocage et perspectives. ....	237



- . TRUCHOT J.P., A. JOUVE-DUHAMEL - Consommation d'oxygène de la crevette japonaise *Penaeus japonicus* en fonction de l'oxygénation du milieu : effets de la température et de l'acclimation à des conditions ambiantes hypoxiques. .... 245
- . LE ROUX M. - Histogénèse de l'organe Y (glande de mue) chez l'embryon de la crevette *Palaemon serratus* (Pennant) (Crustacé Décapode Natantia). .... 255
- . LACROIX D. - L'aquaculture du *Macrobrachium* aux Antilles françaises. .... 263
- . GALGANI F., Y. BENYAMIN, A. VAN WORMHOUDT, H.J. CECCALDI - Variations des activités digestives en fonction des facteurs du milieu chez les crustacés. .... 277

## POISSONS

- I. REPRODUCTION - GENETIQUE ..... 293
- . BRETON B., E. SAMBRONI, Y. ZOHAR - Dosages immunologiques de gonadotropines de poissons. .... 295
- . LELOUP-HATEY J., Y.A. FONTAINE, S. DUFOUR, B. QUERAT - Rôle des hormones stéroïdes et des facteurs externes dans le contrôle de la fonction gonadotrope hypophysaire de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) femelle. .... 309
- . BILLARD R., C. WEIL, G. BARNABE - Induction de l'ovulation et stimulation de la spermiation par le LHRH ou un analogue de LHRH associé ou non au Pimozide chez quelques espèces de poissons téléostéens. .... 321
- . MAITRE J.L., L. MERCIER, L. DOLO, Y. VALOTAIRE - Liaison de l'oestradiol 17 $\beta$  dans les hépatocytes de truite arc-en-ciel et induction de la vitellogénine et son ARNm spécifique. .... 333
- . GALLIS J.L., F. LE MENN, A. LEBRUN, J. NUNEZ-RODRIGUEZ - Etude préliminaire des équilibres de distribution de l'eau et des ions au cours de l'ovogénèse de *Solea solea* L. .... 349
- . RIMBLOT F., F. FRETEY, J. LESCURE, C. PIEAU - Influence de la température sur la différenciation sexuelle des gonades chez la tortue luth (*Dermochelys coriacea*) : étude en incubation artificielle et naturelle. .... 355
- . BERREBI P., J.F. MAGNESE, R. VIANET - Structure génétique des flets (*Platichthys flesus*) téléostéens (Pleuronectidae). .... 363
- . YAHYAOUI A., J. BRUSLE, N. PASTEUR - Etude du polymorphisme biochimique de deux populations naturelles de civelles et d'anguillettes d'*Anguilla anguilla* L. (Maroc atlantique et Roussillon) et de deux échantillons d'élevage. .... 373
- II. CROISSANCE, NUTRITION, PATHOLOGIE, METABOLISME ET ECOETHOLOGIE ..... 391
- . VERNIER J.M., M.F. SIRE - L'absorption intestinale des lipides chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). .... 393
- . RICHARD P., M. DJABALI, F. LAGARDERE, J.P. LAGARDERE - Etude de la composition corporelle de la sole (*Solea solea*) au cours du jeûne : influence de la température. .... 429
- . CASTRIC J., P. DE KINKELIN - Etude expérimentale de la réceptivité du bar (*Dicentrarchus labrax*) et du turbot (*Scophthalmus maximus*) aux infections virales communes en salmoniculture. .... 437
- . DESCHAUX P. ET G. PERES - Effets de la température et du régime alimentaire sur certains paramètres de l'immunité cellulaire du loup de mer en élevage. .... 445
- . LERAY C. - Adaptations biochimiques intestinales chez la truite : influence de l'aliment et de la salinité sur quelques propriétés membranaires. .... 455
- . BAC N., S. BIAGIANTI, J. BRUSLE - Etude cytologique ultrastructurale des anomalies hépatiques du loup, de la daurade et de l'anguille, induites par une alimentation artificielle. .... 473

. GALLIS J.L., S. PIQUEMAL, J.N. LAMBERT, P. SERGENT, V. ROUSSEAU - Incidence de la salinité sur les équilibres de distribution hydrique et ionique et sur le métabolisme respiratoire dans le muscle blanc, le muscle rouge et la branchie chez le muge ( <i>Chelon labrosus</i> ). . . . .	485
. CARVAL J.P. - L'analyse des points de blocage dans l'élevage marin de la truite arc-en-ciel en Bretagne. . . . .	491
. ANTHOUARD M., J. PARIS - L'activité de déplacement et le repérage de la nourriture chez le bar juvénile captif. . . . .	495
. BARNABE G. - Les chaînes alimentaires naturelles et l'aquaculture. . . . .	515
. KENTOURI M., P. DIVANACH - Sur l'utilisation des critères comportementaux pour déterminer l'état de santé des élevages de poissons marins. . . . .	525

COLLOQUES SUR L' AQUACULTURE

---

. L'AQUACULTURE	Brest, 22-24 octobre 1973	472 p.	200 F
. MARICULTURE (3è réunion du CIEM)	Brest, 10-13 mai 1977	305 p.	250 F
. Le THON ROUGE EN MEDITERRANEE biologie, pêche, aquaculture	Sète, 9-12 mai 1979	200 p.	100 F
. AQUACULTURE EXTENSIVE ET REPEUPLEMENT	Brest, 29-31 mai 1979	198 p.	120 F

édités par l' IFREMER

Service de la Documentation  
et des Publications (SDP)  
CENTRE DE BREST  
B.P.337-29273 BREST CEDEX  
Tél.(98)45.80.55-Télex 940627F



L'IFREMER inaugure une nouvelle série

**RECHERCHES BIOLOGIQUES EN AQUACULTURE**

Elle est destinée à diffuser les résultats obtenus par les Groupements d'Intérêt Scientifique en Aquaculture (GISA) :

- . GIS - Aquaculture Région Méditerranée
- . GIS - Aquaculture Sud Vilaine
- . GIS - Aquaculture Nord Vilaine

Ils associent des équipes relevant d'organismes très divers : UNIVERSITÉS, CNRS, CEMAGREF, EPHE, IFREMER, INRA, DIRECTION DE LA QUALITÉ (services vétérinaires), FONDATION Océanographique RICARD.

Cette série annuelle publiée, à côté de textes originaux, des articles parus dans les revues scientifiques françaises et étrangères. Elle témoigne ainsi de la vitalité et de l'originalité des activités de recherche de chaque groupement, en matière d'aquaculture des poissons, des crustacés, des mollusques ou en matière de gestion du milieu. Le premier volume fait état des travaux d'une vingtaine d'équipes du Groupement de la région Méditerranée (GIS-ARM). Il rassemble les communications présentées aux Journées de Montpellier, les 13 et 14 avril 1983, et rapporte les résultats des travaux menés en 1982.

Cette nouvelle série s'adresse à l'évidence à tous les biologistes et écologistes marins - surtout à ceux qui travaillent pour l'aquaculture, mais, au-delà, à tous ceux qui s'intéressent au développement des cultures marines en France.

1 volume broché 16 x 24, 235 p. fig, tabl., pl. illus.  
ISSN 0761-2974 - 2ème trimestre 1984

PRIX : 95 F.

Pour toute commande, s'adresser à

IFREMER - Service de la Documentation et des Publications  
Centre de Brest

B.P. 337 — 29273 BREST CEDEX

JOINDRE LE REGLEMENT



## ALLOCUTION D'OUVERTURE DU COLLOQUE

---

Monsieur le Député, Monsieur le Président, Mesdames, Mesdemoiselles, Messieurs,

Je voudrais tout d'abord, au nom des trois organisateurs de ce colloque, la Direction de la Recherche du Ministère de l'Education nationale, le Centre National de la Recherche Scientifique et le Centre National pour l'Exploitation des Océans, remercier Monsieur Jean LACOMBE, Président de la Commission Mer de l'Assemblée parlementaire et Président du CEPALMAR, d'avoir bien voulu honorer de sa présence l'ouverture de ces journées, manifestant une nouvelle fois son intérêt pour le développement de l'aquaculture sous toutes ses formes. Monsieur le Président CANOT, vous avez accepté de mettre à notre disposition les locaux de votre université à une période très proche des fêtes de fin d'année, ce qui nous vaut de bénéficier d'un décor original pour traiter d'aquaculture marine ... Soyez-en remercié.

Le présent Colloque national consacré aux bases biologiques de l'aquaculture a pour origine une action d'incitation concertée entre la Direction de la recherche, le CNRS et le CNEXO, lancée à la fin de l'année 1980 sous forme d'une ATP financée conjointement par les trois partenaires. Une définition assez large avait été donnée à l'appel d'offres, dans le but d'intéresser à la recherche sur la biologie des espèces marines susceptibles d'être élevées ou cultivées de nouvelles équipes n'ayant pas eu auparavant d'activité dans le milieu marin. Les recherches biologiques et physiologiques sur les algues, les mollusques, les crustacés et les poissons et reptiles marins.

Au même moment, devant la progression catastrophique de l'épizootie de l'huître plate provoquée par le sporozoaire *Bonamia ostreae* mis en évidence pour la première fois en juillet 1979 dans le Sud Finistère, le Secrétariat d'Etat à la recherche et la Direction des pêches et des cultures marines décidaient de lancer une action spécifique consacrée aux recherches écologiques, physiologiques, pathologiques et génétiques en amont de l'ostréiculture. Le thème s'inscrivait parfaitement dans les orientations retenues pour l'ATP, dont l'appel d'offres prévoyait explicitement les recherches sur les huîtres et les moules, et il fut décidé de faire financer par l'action spécifique conchyliculture les propositions correspondantes retenues par le comité scientifique de l'ATP. Ce qui peut aujourd'hui apparaître comme un groupement naturel, constituait encore à cette époque une novation ...

Lancée pour une première période de deux ans (1981-1982) et prolongée pour deux nouvelles années, l'ATP Bases biologiques de l'aquaculture se termine formellement à la fin de l'année 1984. S'agissant d'une ATP conjointe entre des organismes traditionnellement garants de la qualité et de l'originalité des projets scientifiques et le CNEXO qui privilégie les recherches à caractère de qualité scientifique et de finalisation des objectifs. Sans être strictement limitatives, la liste des espèces proposées et celles des principaux thèmes de recherche abordés, ont servi de cadre de travail au comité. Il a été également tenu compte de l'existence des programmes à plus court terme conduits au sein des Groupements d'Intérêt scientifique en aquaculture, dont le plus ancien, le GIS Aquaculture en région méditerranéenne, était mis en place au cours de la première année de fonctionnement de l'ATP.



Selon les groupes végétaux et animaux considérés, la répartition des projets marque un certain déséquilibre, au détriment des grandes algues et des reptiles marins, ce qui s'explique aisément compte tenu du nombre de laboratoires existant. Les poissons, tant marins qu'amphibiotiques, comptant le plus grand nombre de projets, mollusques et crustacés occupant une place comparable.

Le présent colloque constitue en premier lieu un colloque d'évaluation scientifique : il a été demandé à l'ensemble des participations à l'ATP une présentation des résultats obtenus, nécessairement très sommaire en ce qui concerne la seconde phase commencée au début de l'année 1983. Les textes des communications seront publiés sous forme d'un volume de la série Actes de Colloques, préparé en liaison entre le CNEXO et le CNRS. De ces présentations, des discussions auxquelles elles donneront lieu, et des synthèses qui pourront être réunies à l'issue des tables rondes, les organisateurs de l'ATP attendent une réponse en ce qui concerne la suite à donner à cette action en 1985 : faut-il renouveler une ATP de même type, à objectifs scientifiques très larges, courant le risque d'une dispersion excessive d'actions de recherche isolées, faut-il identifier quelques thèmes et les aborder selon une approche comparative dans différents groupes animaux ou végétaux, ou bien doit-on imaginer d'autres modalités, afin de mieux associer sur le terrain les équipes de biologistes et de physiologistes avec les spécialistes en zootechnie et les praticiens à travers des formules dérivées des réseaux scientifiques créés il y a quelques années par le CNRS ? Telles sont les questions qui sont posées à la communauté scientifique.

Afin d'enrichir et d'élargir le débat scientifique, le Comité d'organisation a souhaité que pour chacune des principales sessions du colloque, un professionnel puisse apporter une contribution, destinée à permettre aux chercheurs une appréhension plus précise des questions qui se posent au niveau de l'application, et par conséquent une meilleure définition de projets de recherche susceptibles d'apporter, sinon une solution, du moins une explication, à ces problèmes.

Enfin, dans le souci de compléter l'ensemble des recherches conduites dans le cadre de l'ATP, le Comité d'organisation a souhaité inviter à titre tout à fait exceptionnel quelques équipes travaillant sur des programmes financés par les Groupements d'Intérêt Scientifique en Aquaculture à présenter les résultats de leurs travaux. Conscient des redondances possibles entre ce colloque et les procédures d'évaluation propres aux GIS, le Comité d'organisation entend laisser aux auteurs de ces communications, de même d'ailleurs qu'aux professionnels, le choix du dépôt d'un manuscrit destiné à être publié dans les actes de ce colloque.

Ce colloque intervient également quelques mois après la signature d'un accord de coopération entre le CNRS et la Direction de la recherche du Ministère de l'Education nationale d'une part (représentés par le PIROCEAN) et le CNEXO d'autre part. Cet accord prévoit notamment diverses modalités de collaboration concrète telles que la formation d'équipes mixtes ; il comporte d'autre part la définition conjointe de quelques programmes d'intérêt commun et des modalités de leur animation. L'exploitation des ressources marines vivantes par l'élevage fera certainement partie de ces programmes, comme en témoigne dès aujourd'hui dans le domaine de l'écologie la création d'un laboratoire mixte CNRS-CNEXO pour conduire les recherches en vue de la valorisation par l'aquaculture des zones de marais maritimes aménagés ou naturels du centre ouest en cours d'installation à L'Houmeau, près de La Rochelle. Pour la biologie et la physiologie des organismes intéressant l'aquaculture, une réflexion a été engagée depuis le début de l'automne entre le CNRS et le CNEXO, pour proposer des mécanismes propres à favoriser le rapprochement des chercheurs des deux organismes tout en préservant l'identité de leurs activités. Si des questions se posent encore, la volonté de collaboration fermement affichée par les directions des deux organismes permet d'escompter une solution satisfaisante pour que se poursuive et s'affermisse une collaboration déjà ancienne et toujours nécessaire entre différents niveaux de recherche en aquaculture.

Profitant de cette réunion nationale, le Comité d'organisation a estimé opportun de réserver une journée consacrée à une confrontation de nos travaux avec ceux d'un pays parmi les plus avancés en matière d'aquaculture, le Japon. Les présentations très

variées qui seront faites par des spécialistes japonais de différentes universités et de l'Agence des Pêches permettront de prendre connaissance des acquis les plus récents de ce pays non seulement en biologie, mais également en matière de gestion et d'aménagement des ressources naturelles.

Il me reste à remercier tous ceux qui ont apporté leur concours à la préparation de ce colloque, et en particulier Michel AMANIEU qui a proposé dès l'origine de l'ATP que cette réunion ait lieu dans les locaux de l'Université des Sciences et des Techniques du Languedoc. L'importance de votre participation confirme que le choix était judicieux.

Au nom de la Direction de la recherche du Ministère de l'Education nationale, du CNRS et du CNEXO, je déclare ouvert le colloque d'évaluation des résultats de l'ATP Bases biologiques de l'aquaculture.

Lucien LAUBIER





LES CULTURES EN FRANCE  
ET LE DROIT  
CEDEM

Rapport Économique et Juridique n° 11

1 volume 16 x 24

Prix : 120 F

ISBN 2-902721-11-0

Dans ses formes traditionnelles ou nouvelles l'aquaculture est en expansion. Cela exige d'en adapter ou d'en renouveler le régime et aussi de faire évoluer les bases du droit de l'exploitation du domaine public maritime. Trois questions fondamentales sont posées : qui pourra s'installer comme aquaculteur ? où seront situées les exploitations ? comment seront constituées les entreprises ?

Cet ouvrage dresse l'inventaire du Droit positif actuel, et fait percevoir les domaines pour lesquels des adaptations s'imposent. Il dessine les lignes de l'évolution future, aussi bien pour l'exercice de l'activité, que pour la réservation des sites, ou les aspects professionnels. C'est là un document capital pour les réflexions à venir sur les cultures marines, écrit par les spécialistes du Centre de droit et d'économie de la mer de Brest. Un ouvrage indispensable pour les professionnels et les administrations, comme pour les juristes.

TABLE DES MATIERES

*Première Partie : Le cadre général de l'activité*

- Chap. I : Les structures administratives françaises  
Jean MALLEIN
- Chap. II : Le rôle des communautés européennes  
Patrick DAILLIER - Didier LE MORVAN
- Chap. III : Les problèmes de l'organisation professionnelle  
Danièle LE BIHAN

*Seconde Partie : Localisation de l'activité*

- Chap. IV : Le statut des eaux  
Jean-Pierre QUENEUDEC
- Chap. V : La réservation des sites pour l'aquaculture  
Jean-Luc PRAT
- Chap. VI : Aquaculture et occupation du domaine public maritime  
Vinh NGUYEN QUOC
- Chap. VII : Aquaculture et protection de la nature  
Jean-Pierre BEURIER

*Troisième Partie : Régime de l'exploitation*

- Chap. VIII : Les structures juridiques de l'exploitation  
Michel LE ROY
- Chap. IX : La propriété des espèces  
Jean-Paul CORLAY
- Chap. X : La commercialisation des produits  
Hervé CORVEST
- Chap. XI : La salubrité des produits  
Jean-Pierre BEURIER
- Chap. XII : La fiscalité  
Vinh NGUYEN QUOC
- Chap. XIII : Le statut social  
Jacques ALLARY-VALENTIN

Pour toute commande, s'adresser à

IFREMER - Service de la Documentation et des Publications  
Centre de Brest  
B.P. 337 - 29273 BREST CEDEX

JOINDRE LE REGLEMENT

## ALLOCUTION DE CLOTURE

ALAIN GUILLE  
*Chargé de mission au PIROCEAN*

Mesdames, Messieurs, chers Collègues,

Lucien LAUBIER a ouvert votre colloque au nom des trois organismes supports de l'ATP Bases biologiques de l'aquaculture et il m'appartient maintenant, en tant que représentant du PIROCEAN, de conclure vos travaux. Le PIROCEAN, jeune structure âgée de moins de 3 ans, a été en effet chargé de faciliter et de coordonner les recherches en biologie marine et en océanographie menées dans le cadre de ses deux tutelles, le Centre National de la Recherche Scientifique et de la Direction de la Recherche du Ministère de l'Education nationale. Son rôle de coordination a été complété par un accord cadre avec le CNEXO, dont Lucien LAUBIER a déjà évoqué la signature devant vous. Ce partage de nos interventions à l'ouverture et à la clôture de vos travaux illustre bien la réalité, certes à conforter chaque jour, de cet accord cadre.

L'ATP Bases biologiques de l'aquaculture a sans doute représenté un bon modèle d'action concertée entre nos organismes, action je crois à bénéfices réciproques. Le CNRS comme la Direction de la recherche du Ministère de l'Education nationale ont clairement, à plusieurs reprises, affirmé leur rôle vis-à-vis de la recherche finalisée : l'aquaculture et les recherches halieutiques doivent avoir de la part des Universités et du CNRS, comme support, des actions du type de l'ATP Bases biologiques de l'aquaculture. D'autres exemples ont été évoqués : la création de GIS aquaculture sur les trois façades maritimes de notre pays, Méditerranée, Nord et Sud Vilaine, celle du Laboratoire mixte de L'Houmeau près de La Rochelle. De même il peut être annoncé aujourd'hui que le CNEXO participera en 1984 au financement de l'ATP "Biologie des Populations" du Département sciences de la vie du CNRS et contribuera ainsi au développement de cette ATP vers la biologie marine. L'action du PIROCEAN à ce propos doit être bien comprise. Permettez-moi de rappeler notre thématique générale car la jeunesse, le rôle incitatif de notre organisme méritent quelque publicité pour être bien entendu. Le PIROCEAN entend développer une thématique simple vis-à-vis de ce qui vous intéresse directement : la biologie marine et l'aquaculture, les recherches halieutiques.

La vie est née de la mer. L'océanographie biologique et la biologie marine ont pour but de comprendre la plus vaste entité écologique de la planète.

Au plan fondamental, la plus grande diversité et le plus grand conservatisme de la vie marine, par rapport à la vie terrestre, nous donnent une vision plus complète des types actuels et passés d'organisations biologiques. La plus grande homogénéité de son environnement se traduit par une dispersion beaucoup plus vaste, parfois planétaire, des peuplements marins. Ces deux caractéristiques majeures de l'écosystème marin font de l'océanographie biologique/biologie marine une des clés de la progression des idées sur l'évolution et en écologie.



L'écosystème côtier produit et abrite 95 % des ressources marines utiles à l'homme. Au plan finalisé, la connaissance de la structure, du fonctionnement et de l'évolution de la chaîne alimentaire marine, pélagique et benthique, doit permettre de dégager les lois de la concentration et de la migration des espèces (exploitables ou non), en liaison avec les fluctuations naturelles et stochastiques, et ainsi une meilleure appréciation des perspectives de l'aquaculture extensive et de la gestion du potentiel halieutique.

La compréhension des mécanismes intimes de la productivité côtière sera favorisée par l'étude :

- des mécanismes d'interactions compétitives, des réactions synergiques et ou antagonistes entre espèces (plancton, bactéries, méiofaune, macrofaune) ;
- de l'environnement, des cycles et de la dynamique des espèces exploitables (approche démographique, plus particulièrement recrutements - larves et juvéniles -) et des populations d'espèces "leaders" des communautés ;
- des écosystèmes perturbés.

Le PIROCEAN entend promouvoir les thèmes de recherche concernant la biologie des organismes marins devront favoriser le développement des bases fondamentales de l'écologie, de l'aquaculture et de la gestion des stocks halieutiques, et parallèlement celui des apports de la biologie marine aux concepts de la biologie générale par :

- l'élaboration de monographies biologiques des espèces exploitables et plus particulièrement au niveau du déterminisme du recrutement ;
- l'étude de la place de l'organisme dans la population, l'écosystème : morphologie fonctionnelle, physiologie, biochimie de la reproduction, du développement et de la nutrition, autres métabolismes et transferts d'énergie ;
- le développement de la biologie expérimentale marine et celui des modèles biologiques d'origine marine dans les neurosciences, l'hormonologie, la biologie cellulaire et moléculaire.

Revenons maintenant à votre colloque. Lucien Laubier a évoqué au début de vos travaux, et de nombreuses discussions ont eu lieu à ce sujet ensuite, l'avenir des recherches sur les bases biologiques de l'aquaculture. Des programmes sont en cours d'élaboration, toujours en concertation avec le futur IFREMER. Les équipes CNRS et universitaires sont et seront associées à cette élaboration et à cette mise en place de nouveaux programmes qui devront être à bénéfices réciproques tant au plan des concepts de la recherche fondamentale et de la recherche finalisée, qu'à celui des moyens et du fonctionnement des équipes concernées. L'accord cadre CNEXO/CNRS/Universités a été mis en place pour cela.

Votre colloque a bien illustré combien la recherche fondamentale pouvait apporter à l'aquaculture. Il y a donc bien une osmose possible, difficile mais nécessaire, entre recherche fondamentale et recherche appliquée. Cette action thématique programmée "Bases biologiques de l'Aquaculture" sera poursuivie sous d'autres formes. Au nom du CNEXO, du CNRS et de la Direction de la Recherche du Ministère de l'Education Nationale je remercie vivement le comité scientifique de cette ATP, les participants, et plus particulièrement au nom du PIROCEAN, l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc et le CNEXO d'avoir facilité l'organisation de ce colloque dont je déclare clos les travaux.



**ALGUES**

LES BASES EXPERIMENTALES DES HYBRIDATIONS REALISEES  
CHEZ DES LAMINARIALES DES COTES FRANCAISES

J. COSSON et P. GAYRAL

*Laboratoire d'Algologie, 39, rue Desmoueux, 14000 CAEN*

RESUME

Les recherches effectuées au Laboratoire d'Algologie fondamentale et appliquée de l'Université de Caen ont montré que l'hybridation interspécifique et intergénérique au sein des Laminariales est réalisable avec des taux de réussite variables selon les espèces mises en expérience ; ces taux n'ont pu être déterminés avec précision qu'à la suite d'une étude préliminaire permettant d'évaluer le taux de développement parthénogénétique propre à chaque espèce. Par ailleurs, les résultats obtenus concernant l'écophysiologie des Laminaires et plus particulièrement l'action de la température et de la lumière sur la fertilité des gamétophytes conduisent à envisager la réalisation de cultures expérimentales d'hybrides, afin d'obtenir des algues dont les qualités soient supérieures à celles des parents, notamment en ce qui concerne la teneur en acide alginique et la croissance. Les expériences menées en 1983 concernent à la fois la culture à terre de gamétophytes isolés appartenant à différentes espèces de Laminariales, la réalisation de croisements afin d'obtenir des sporophytes hybrides, et le transfert de ceux-ci en mer sur des cordages et des filets, cette étape devant permettre de mesurer la croissance des algues ainsi obtenues et de connaître leurs qualités en fonction des buts recherchés.

ABSTRACT

The research carried out at the Laboratoire d'Algologie fondamentale et appliquée of the University of Caen has shown that interspecific and intergeneric hybridization is possible in the Laminariales with variable rates according to the species used ; these rates were determined precisely only following preliminary study where the rate of parthenogenetic development was evaluated for each particular species. Besides, the results obtained concerning the ecophysiology of the Laminariales and especially the effect of temperature and light on the fertility of the gametophytes, prompt to undertake experimental cultures of the hybrids in order to obtain algae with qualities superior to those of the parents, particularly regarding alginic acid content and growth. The experiments carried out in 1983 concern together the rearing ashore of isolated gametophytes belonging to different species of Laminariales, the realization of crossings in order to obtain hybrid sporophytes, and their transfer into the sea on ropes or nets, this step allowing measurement of the growth of the resulting algae and estimation of their qualities in terms of the ends pursued.

MOTS-CLES

Laminariales, hybridation, parthénogenèse, aquaculture

KEY-WORDS

Laminariales, hybridization, parthenogenesis, aquaculture

\* (avec la collaboration technique de Mme F. Cosson).



L'aquaculture des Laminaires, par rapport aux ressources naturelles que représentent ces algues sur nos côtes, peut être envisagée dans la mesure où il serait possible de cultiver des algues qui auraient été remarquées pour une aptitude à produire de l'acide alginique de qualité dans des conditions de rendement supérieures à celles des populations normalement exploitées. C'est dans cette perspective que nous avons pensé que, si elles étaient possibles, des hybridations pourraient conduire à ce résultat.

Malgré les conclusions négatives qui résultent des tentatives de croisements interspécifiques de Laminariacées effectuées par E. Schreiber (1930), nous avons tenté à nouveau des croisements qui se sont révélés positifs aussi bien entre espèces du même genre *Laminaria* qu'entre espèces de genres différents, *Laminaria* et *Saccorhiza*. Des résultats comparables n'avaient été obtenus jusqu'ici qu'entre espèces du groupe *simplices* que l'on peut a priori considérer comme très proches (K. Lüning et coll., 1978), et entre genres appartenant à une famille de Laminariales localisée dans l'Océan Pacifique, les Lessoniacées (Y. Sanbonsuga et M. Neushul, 1978).

## 1.- Résultats préliminaires justifiant la poursuite d'hybridations

Dans le but d'exploiter valablement les résultats obtenus dans des expériences de croisement, il était indispensable de connaître les possibilités de parthénogenèse des espèces qui seront croisées. Dans un travail de thèse de doctorat d'Université, R. Olivari (1981) a réalisé des expériences relatives au développement des gamétophytes femelles chez des espèces appartenant aux genres *Laminaria* et *Saccorhiza*, et a obtenu les pourcentages suivants (exprimés par rapport au nombre total de gamétophytes femelles) : *L. saccharina*, 28 % ; *L. digitata*, 26 % ; *L. ochroleuca*, 25 % et *S. polyschides*, 23 %.

Le maintien en culture des plantules parthénogénétiques dans les conditions optimales retenues pour le développement des jeunes sporophytes de ces espèces a abouti à l'observation d'algues à développement très lent, anormales dans leur morphologie et finalement non viables.

Ces résultats nous ont donc permis de considérer que, dans les expériences d'hybridation, toute plantule ayant un développement morphologique normal pourrait être considérée comme résultant effectivement d'une fécondation.

## 2.- Méthodologie des hybridations

Elle peut se résumer dans les points suivants :

### 2.1 Constitution de stocks de gamétophytes

Cet objectif implique : a) l'obtention des spores des thalles parentaux (J. Cosson, 1973) ; b) la culture des prothalles dans des conditions contrôlées, en présence en particulier de conditions d'éclairement inhibitrices de la fertilité (J. Cosson et P. Gayral, 1979 ; K. Lüning, 1980) ; c) la séparation rigoureuse des gamétophytes de sexe différent ; d) le maintien de la culture homosexuée et la multiplication des gamétophytes. Ce résultat est obtenu grâce aux propriétés de régénération des gamétophytes.

### 2.2 Hybridation

Cette opération demande la maîtrise de la production simultanée des gamètes des deux sexes. Cette maîtrise a été acquise par des expérimentations préliminaires relatives aux effets des radiations monochromatiques appliquées aux



gamétophytes (J. Cosson, P. Gayral et R. Jacques, 1976). La production de gamètes est accrue par une fragmentation préalablement à l'effet du choc lumineux.

R. Olivari (1981) avait montré la possibilité d'hybridation interspécifique chez *Laminaria* et d'hybridation entre espèces des genres *Laminaria* et *Saccorhiza* selon les pourcentages indiqués dans le tableau n° 1.

<i>L. digitata</i> ♂	x	<i>L. saccharina</i> ♀	63	<i>S. polyschides</i> ♂	x	<i>L. digitata</i> ♀	45
<i>L. digitata</i> ♀	x	<i>L. saccharina</i> ♂	48	<i>S. polyschides</i> ♀	x	<i>L. digitata</i> ♂	77
<i>L. digitata</i> ♂	x	<i>L. ochroleuca</i> ♀	38	<i>S. polyschides</i> ♂	x	<i>L. saccharina</i> ♀	42
<i>L. digitata</i> ♀	x	<i>L. ochroleuca</i> ♂	11	<i>S. polyschides</i> ♀	x	<i>L. saccharina</i> ♂	25
		<i>S. polyschides</i> ♂		x	<i>L. ochroleuca</i> ♀		34
		<i>S. polyschides</i> ♀		x	<i>L. ochroleuca</i> ♂		18

TABLEAU n° 1.- Taux d'hybridation (exprimé en % du nombre total de sporophytes formés) obtenus en cultures interspécifiques et intergénériques (les variations autour de la moyenne sont comprises entre 6 et 11 % de sa valeur). (D'après J. Cosson et R. Olivari, 1982).

Ces résultats conduisent à privilégier dans une perspective de meilleur rendement les croisements suivants :

<i>S. polyschides</i> ♀	x	<i>L. digitata</i> ♂
<i>L. digitata</i> ♂	x	<i>L. saccharina</i> ♀

Dans les travaux en cours, ces deux croisements ont donc été retenus ; ils ont été réalisés à partir des populations gamétiques obtenues selon les techniques ci-dessus, dans des récipients contenant un enroulement de cordage en nylon d'un diamètre de 8 mm, et avec les mêmes résultats positifs.

Dès qu'elles ont atteint des dimensions de l'ordre du mm, les jeunes plantules ne peuvent continuer leur croissance dans des conditions de milieu limité, et la nécessité de leur transfert en milieu marin nous a conduit à envisager une nouvelle phase de l'opération.

### 2.3 Installation en milieu marin

Les jeunes plantules, restant très fragiles au terme des trois semaines qui les ont conduites à ce développement, ne peuvent être directement soumises aux conditions très rudes du milieu marin, en raison en particulier du faible développement des haptères fixatrices.

Une phase intermédiaire a donc été nécessaire et a consisté à disposer les cordes ensemencées dans des bassins d'environ 50 litres où circule en circuit fermé de l'eau de mer enrichie en sels minéraux et en vitamines, et renouvelée tous les 15 jours, sous un éclairage de 4 à 5 W.m<sup>-2</sup> fourni par des tubes Philips "Blanc Industrie", 16 heures par jour. La bonne fixation des algues nécessite la mise en place d'un dispositif assurant une efficace agitation de l'eau.

Quand les plantules ont atteint 1 à 2 cm de longueur et présentent un appareil de fixation suffisant, soit environ 1 mois après leur installation dans les bassins, la transplantation en mer dans un périmètre choisi en fonction

de caractéristiques favorables au développement des Laminaires a permis l'obtention des thalles hybrides. Actuellement âgés de 7 mois, ces thalles ont atteint des dimensions de l'ordre de 40 cm en moyenne. Ces algues sont l'objet d'un suivi concernant leur croissance, leur analyse morphologique et anatomique, leur teneur en acide alginique et la qualité de celui-ci (rapport M/G).

### 3.- Discussion et conclusion

Selon la méthode exposée ci-dessus, les hybrides actuellement à l'étude ont pour origine un seul thalle de chaque espèce. Etant donné la variabilité existante dans chaque stock de gamétophytes mâles et femelles, les thalles résultant des fécondations présentent eux-mêmes une certaine variabilité qui, d'ores et déjà, joue dans l'élimination des thalles les moins résistants, et qui se manifeste au plan morphologique sur les thalles en bon état. Cette variabilité doit également exister au niveau physiologique et biochimique. Il sera intéressant d'analyser statistiquement la croissance et la production d'acide alginique dans cette descendance, mais il sera également intéressant d'évaluer la variabilité de ces paramètres qui pourrait être mise à profit dans des croisements ultérieurs réalisables dans la mesure où les hybrides se révéleraient fertiles.

Quoiqu'il en soit, à court terme, une nouvelle démarche consistera à conduire les hybridations, selon la méthodologie déjà exposée, à partir de gamètes issus de stocks de gamétophytes ayant pour origine des thalles parentaux choisis en fonction de leurs caractères remarquables. Cependant la population issue de cette hybridation présentera encore une certaine amplitude de variabilité qu'il importera d'interpréter et d'exploiter ultérieurement.

---

Cosson J., 1973 - Action des conditions de culture sur le développement de *Laminaria digitata* (L.) Lam., Bull. Soc. Phycol. Fr., 18, p. 104-112.

Cosson J., Gayral P. et Jacques R., 1976 - Action de la composition spectrale de la lumière sur la croissance et la reproduction des gamétophytes de *Laminaria digitata* (L.) Lam. (Phéophycée, Laminariales). C.R. Acad. Sc. Paris, 283, p. 1293-1296.

Cosson J. et Gayral P., 1979 - Optimal conditions for growth and fertility of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) gametophytes. Proc. Int. Seaweed Symp., 9, p. 59-65.

Cosson J. et Oliveri R., 1982 - Premiers résultats concernant les possibilités d'hybridation interspécifiques et intergénériques chez les Laminariales des côtes de la Manche, C.R. Acad. Sc. Paris, 295, p. 381-384.

Lüning K., 1980 - Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* species (Phaeophyceae). J. Phycol., 16, p. 1-15.

Lüning K., Chapman A.R.O. et Mann K.H., 1978 - Crossing experiments in the non digitate complex of *Laminaria* from both sides of the Atlantic. Phycologia, 17 (3), p. 293-298.

Oliveri R. (1981) - Recherches préliminaires sur la parthénogenèse et sur l'hybridation de quelques Laminariales, Thèse Doctorat d'Université, Université de Caen, 79 p.

Sanbonsuga Y. et Neushul M. (1978) - Hybridization of *Macrocystis* (Phaeophyte) with other float-bearing kelps. J. Phycol., 14 (2), p. 214-224.

Schreiber E., 1930 - Untersuchungen über Parthenogenesis, Geschlechtsbestimmung und Bastardierungsmögen bei Laminarien. Planta, 12, p. 331-353.



NUTRITION PHOSPHOREE  
CHEZ *CHONDRUS CRISPUS* STACKH. (RHODOPHYCEES)

T. CHOPIN, J.Y. FLOC'H, C. BODEAU-BELLION et M. PENOT  
Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences  
Université de Bretagne Occidentale, 29283 Brest Cédex, France

RESUME

La nutrition phosphorée de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackh. est étudiée chez deux formes morphologiquement très différentes. Des dosages de phosphore, réalisés mensuellement à différents niveaux du thalle, montrent d'une part que la répartition de cet élément n'est pas homogène le long du thalle et d'autre part que des variations saisonnières se produisent. Relativement stable en ce qui concerne la base du thalle, la teneur en phosphore présente des valeurs élevées pour le sommet à l'automne et en hiver. Pour cette dernière partie et le milieu du thalle, une chute marquée se produit au printemps et les valeurs restent faibles durant l'été. Les résultats n'étant pas identiques pour les deux formes de l'algue, le problème, souvent évoqué, du polymorphisme de cette espèce peut être repris sous l'angle de la physiologie. De plus, les valeurs élevées du facteur de concentration en phosphore par rapport à l'eau de mer (jusqu'à  $17,9 \cdot 10^4$ ) s'expliquent par l'intervention du métabolisme de l'algue comme le montre l'étude de l'absorption et de l'exsorption du phosphore à l'aide de traceurs radioactifs. Par ailleurs, après trois heures d'absorption, le phosphore est incorporé dans des composés qui se révèlent être ceux que l'on rencontre habituellement chez les végétaux supérieurs et d'autres algues.

ABSTRACT

Phosphorated nutrition of the red alga *Chondrus crispus* Stackh. is studied in two morphologically very dissimilar forms of the thallus. Phosphorus measurements, which were monthly carried out at different parts of the alga, showed first that the distribution of this element is not homogeneous along the thallus, and second that seasonal variations occur. In particular while the phosphorus concentration remained roughly the same in the basal part all along the year, on the contrary its amount which was found to be higher in the middle and the upper part of the thallus during the autumn and the winter, sharply fell down in these parts during the spring and remained low during the summer. Because the results were not identical for the two studied forms of the alga, it is suggested that the classical polymorphism of the species can be taken into account as concerns its physiology. Besides, from absorption and exsorption experiments which were performed with  $^{32}\text{P}$  as a tracer, it is shown that the high concentration factor of phosphorus in the alga as compared to the environmental seawater (up to  $17.9 \times 10^4$ ) can be explained as an effect of metabolic process. Moreover it is shown that, after a three hours absorption period, the radioactive phosphorus was incorporated into compounds which are similar to those usually found in higher plants and other algae.



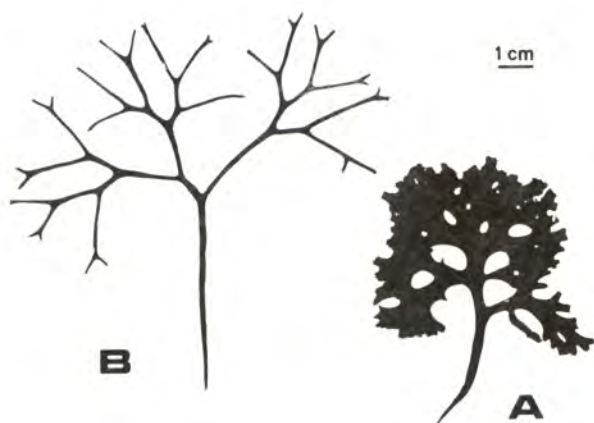


Figure 1 : Deux formes très opposées de *Chondrus crispus* choisies pour cette étude : forme médiolittorale (A), forme infralittorale (B).

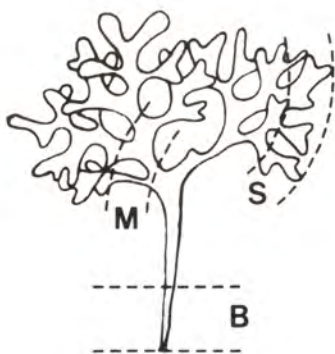


Figure 2 : Localisation des prélèvements à trois niveaux différents du thalle pour le dosage du phosphore total. Base (B), milieu (M), sommet (S).

## INTRODUCTION

*Chondrus crispus* Stackh. est une Rhodophycée de grande importance économique en raison des polyosides particuliers qui en sont extraits : les carraghénanes (Rees, 1969 ; Mac Candless, 1981 ; Bodeau-Bellion, 1983) qui tiennent leur haute valeur commerciale de leurs propriétés gélifiantes et épaississantes.

Parce que la demande mondiale en ces phycocolloïdes ne cesse d'augmenter et que la récolte artisanale ne saurait suffire aux besoins dans l'avenir, beaucoup de travaux se sont orientés vers des études d'aquaculture, notamment au Canada (Chen et Taylor, 1980 a et b). Cependant peu d'entre eux ont été publiés sur la nutrition phosphorée de cette algue (Neish et al., 1977 ; Kornfeldt, 1982).

De plus, *Chondrus crispus* présente un polymorphisme marqué (Newton et al., 1957) qui incite à se demander si les différentes formes présentent la même physiologie.

L'objet de notre étude est de rechercher si les variations dans la nutrition phosphorée sont à relier à la qualité et à la quantité de carraghénanes. Dans le présent travail, nous rapportons les résultats concernant la répartition du phosphore le long du thalle, ainsi que ces variations saisonnières, chez deux formes très opposées de *Chondrus crispus*, les propriétés d'échanges de cet ion avec le milieu marin et le devenir du phosphore absorbé.

## MATERIEL ET METHODES

### MATERIEL

Des thalles de *Chondrus crispus* ont été récoltés mensuellement à Porz Liogan (près du Conquet, Finistère). Deux formes très opposées, au sens de Harvey (1846-1851), ont été distinguées :

- la forme que nous avons appelée "médiolittorale" en raison de sa position sur l'estran (Figure 1 A), et qui, d'après Newton et al. (1957), serait la variété *typica* Turner ;
- la forme "infralittorale" (Figure 1 B), qui serait la variété *aequalis* Turner.

### METHODES

#### Dosage du phosphore total le long du thalle

Les échantillons sont prélevés à trois niveaux différents du thalle (Figure 2) :

- la base (B) : 1,5 cm comprenant le disque de fixation
- le milieu (M) : 1 cm à partir des premières ramifications
- le sommet (S) : 1 cm à l'extrémité du thalle

Après séchage à 105°C jusqu'à poids constant et minéralisation acide, le phosphore total est dosé par colorimétrie suivant la méthode de Charlot (1966).

### ABREVIATIONS

AMP, adénosine monophosphate ; ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; CDP, cytidine diphosphate ; CTP, cytidine triphosphate ; EMF, eau de mer filtrée (filtre AMF Cuno 1 µm) ; GDP, guanosine diphosphate ; GTP, guanosine triphosphate ; HMP, hexoses monophosphate ; Km, constante de Michaelis-Menten ; MF, matière fraîche ; MS, matière sèche ; Nins, teneur en azote insoluble ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PGA, acide phosphoglycérique ; Pi, teneur en phosphore inorganique hydrosoluble ; <sup>32</sup>Pi, fraction phosphorylée inorganique hydrosoluble ; <sup>32</sup>P<sub>ins</sub>, fraction phosphorylée insoluble dans le TCA ; <sup>32</sup>P<sub>lip</sub>, fraction phosphorylée lipidique soluble dans l'éther éthylique ; P<sub>o</sub>, teneur en phosphore organique hydrosoluble ; <sup>32</sup>P<sub>o</sub>, fraction phosphorylée organique hydrosoluble ; <sup>32</sup>P<sub>sol</sub>H<sub>2</sub>O, fraction phosphorylée hydrosoluble ; TCA, acide trichloracétique ; UDP, uridine diphosphate ; UDPG, uridine diphosphoglucose ; UTP, uridine triphosphate ; Vm, vitesse maximale d'absorption.

### Dosage du phosphore minéral dissous dans l'eau de mer et facteur de concentration dans le thalle entier frais

Le phosphore minéral dissous dans l'eau de mer, essentiellement présent sous forme des ions orthophosphates  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  est dosé par la méthode de Murphy et Riley (1962).

La teneur en phosphore total de l'eau de mer ne peut être assimilée en toute rigueur à celle de la fraction minérale de cet ion car les fractions organiques particulière et dissoute, souvent peu importantes, peuvent parfois être non négligeables (Ivanoff, 1972). C'est pourquoi nous avons défini le facteur de concentration en phosphore dans le thalle entier frais par le rapport :

#### Teneur en phosphore total dans le thalle entier frais

Teneur en phosphore minéral dissous dans l'EMF

#### Mesures d'absorption et d'exsorption du phosphore

Des disques de 4 mm de diamètre, découpés à l'emporte-pièce, sont prélevés au sommet de thalles de la forme médiolittorale afin de travailler sur une population homogène.

L'absorption du phosphore est réalisée dans un litre d'EMF marquée au  $^{32}\text{P}$ -acide phosphorique ( $2,96$  à  $9,26 \cdot 10^5 \text{ Bq.l}^{-1}$ ) fourni par le CEA (Saclay). Afin d'observer l'influence de la concentration en phosphate sur la vitesse d'absorption, l'EMF a été enrichie en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La température est de  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  (chambre conditionnée) ou  $2^\circ\text{C}$  (cryomètre Ultra-Kryo TK 30D). L'éclairement est fourni par trois tubes Claude Blanc Z et deux tubes Philipps lumière du jour ; il est de  $243 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Le milieu est agité par bullage d'air comprimé. Après absorption, dix disques sont prélevés, rincés deux minutes dans l'EMF non radioactive, séchés sur papier filtre, pesés, incinérés et la radioactivité est mesurée au compteur Geiger-Müller.

Pour l'étude de l'exsorption, les disques sont d'abord immergés pendant trois heures dans de l'EMF marquée et à  $17^\circ\text{C}$  ; puis, après cette période d'absorption, ils sont rincés deux minutes et immergés dans de l'EMF non radioactive à  $0^\circ\text{C}$ . Le prélèvement des disques et les mesures de la radioactivité résiduelle sont alors effectués comme précédemment.

#### Analyse des composés phosphorylés

L'absorption du phosphore- $^{32}\text{P}$  est de trois heures dans de l'EMF à  $3,70 \cdot 10^7 \text{ Bq.l}^{-1}$ . Après extraction à froid au TCA-éther, le phosphore inorganique est dosé par colorimétrie selon la méthode de Ducet et Vanderwale (1959) ; le phosphore organique par la méthode de Murphy et Riley (1962). La séparation des composés hydrosolubles est réalisée par chromatographie sur papier (Whatman 3MM), descendante, bidimensionnelle, selon la méthode de Cole et Ross (1966). La révélation des chromatogrammes est faite par autoradiographie (contact avec des films Kodak X-Omat S pendant 8 jours). Toutes les mesures de radioactivité sont faites à l'aide d'un compteur Geiger-Müller. Le dosage de l'azote insoluble se fait, après minéralisation acide, à l'appareil de Parnas et Wagner.

Afin d'avoir une indication sur l'état physiologique des tissus prélevés, la charge énergétique, définie par Atkinson et Walton (1967), est calculée à l'aide du rapport :

$$\frac{2 \text{ ATP} + \text{ADP}}{2 (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})}$$



## RESULTATS

### Répartition des teneurs en phosphore le long du thalle et variations saisonnières - Facteur de concentration

En avril 1982, les deux formes de *Chondrus crispus* présentaient un gradient de phosphore total le long du thalle (Figure 3). La teneur en phosphore total est significativement plus élevée au sommet du thalle qu'à la base, quelle que soit la forme considérée ; par contre, le milieu est la zone la plus riche chez la forme médiolittorale, tandis qu'il représente la plus pauvre chez la forme infralittorale.

On pouvait se demander si ces gradients évoluaient au cours de l'année ; c'est pourquoi, d'octobre 1982 à novembre 1983, des dosages ont été réalisés mensuellement dans les différentes parties de l'algue. D'après nos résultats (Figures 4 et 5), il apparaît que le gradient de répartition varie au cours de l'année et d'une manière comparable chez les deux formes. En particulier, une modification importante a lieu au cours du printemps : alors que les teneurs en phosphore sont élevées au sommet de l'algue pendant la période d'hiver, une chute marquée se produit au printemps (avril-juin) et les valeurs restent faibles durant l'été ; à la fin de cette saison, la teneur augmente pour atteindre les valeurs hivernales en janvier. Les variations au milieu du thalle suivent dans le temps une évolution semblable à celles du sommet. Il faut cependant noter un décalage de deux mois pour la forme médiolittorale, et d'un mois pour la forme infralittorale, dans la chute observée au printemps. Quant à la base du thalle, la teneur en phosphore reste relativement stable au cours de l'année.

On observe également que la forme médiolittorale contient toujours plus de phosphore que la forme infralittorale quand on considère le thalle entier (Figure 6). En conséquence, le facteur de concentration calculé par rapport à la teneur en phosphore minéral dissous dans l'eau de mer (Figure 7) est toujours plus élevé pour la première forme (de  $2,4 \cdot 10^4$  à  $17,9 \cdot 10^4$ ) que pour la seconde (de  $2,0 \cdot 10^4$  à  $11,2 \cdot 10^4$ ).

### Etude de l'absorption et de l'exsorption du phosphore

Les valeurs élevées du facteur de concentration, comparables à celles observées chez d'autres algues :  $10^5$  chez *Laminaria hyperborea* (FLOC'H, 1979), ne peuvent pas s'expliquer par le simple jeu des échanges ioniques passifs mais suggèrent l'intervention active du métabolisme de l'algue. C'est ce que nous avons voulu vérifier sur des sommets de thalles de la forme médiolittorale récoltés au printemps.

#### -Influence de la température sur l'absorption

Les cinétiques d'absorption conduites à  $17^\circ\text{C}$  et  $2^\circ\text{C}$  présentent toutes les deux une allure ascendante (Figure 8) et la vitesse est fortement diminuée à basse température ( $30,0 \pm 2,7$  nmol P.g MF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à  $17^\circ\text{C}$  ;  $6,3 \pm 1,6$  nmol P.g MF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à  $2^\circ\text{C}$ ). Ces deux faits montrent que l'absorption est liée au métabolisme de l'algue.

#### -Influence de la concentration en phosphate dans le milieu sur l'absorption

Lorsque l'on enrichit l'EMF en phosphate, la vitesse d'absorption augmente selon un système à deux composantes hyperboliques (Figures 9 et 10). D'après Laties (1967) une relation de ce type est indicatrice d'une absorption métabolique. De plus, pour Epstein (1966), par analogie avec la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten, ces deux hyperboles caractérisent l'intervention de deux systèmes d'absorption saturables, fonctionnant simultanément, la participation de chacun dépendant de la concentration du substrat.

La gamme des faibles concentrations (Figure 9) a été étudiée plus en détail. La représentation selon Lineweaver et Burk (Figure 11) permet la détermination

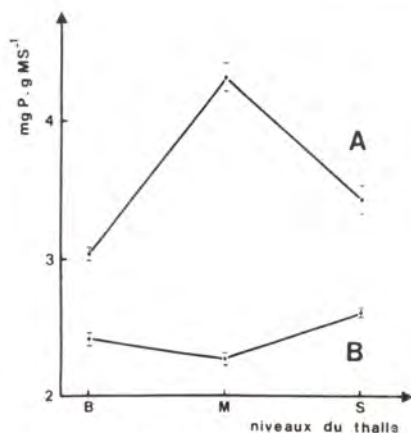


Figure 3 : Répartition des teneurs en phosphore total le long du thalle de *Chondrus crispus* chez la forme médiolittorale (A) et la forme infralittorale (B) en avril 1982. Résultats exprimés en mg P.g MS<sup>-1</sup>. Moyenne de 5 dosages (environ 60 thalles)  $\pm$  l'erreur standard. Pour les niveaux du thalle, voir figure 2.

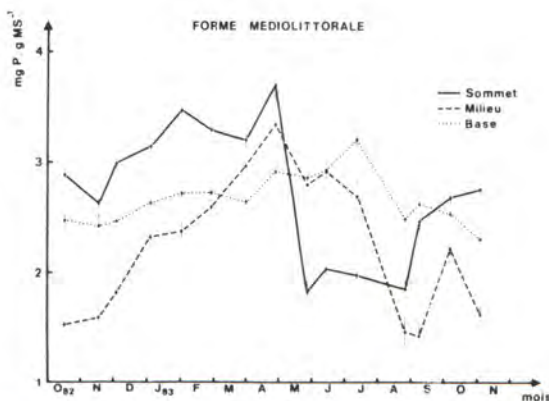


Figure 4 : Variations saisonnières des teneurs en phosphore total dans les différents niveaux du thalle de *Chondrus crispus* chez la forme médiolittorale. Résultats exprimés en mg P.g MS<sup>-1</sup>. Moyenne de 5 dosages (environ 60 thalles)  $\pm$  l'erreur standard.

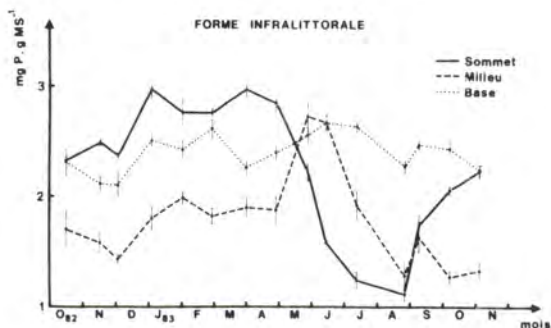


Figure 5 : Variations saisonnières des teneurs en phosphore total dans les différents niveaux du thalle de *Chondrus crispus* chez la forme infralittorale. Résultats exprimés en mg P.g MS<sup>-1</sup>. Moyenne de 5 dosages (environ 60 thalles)  $\pm$  l'erreur standard.

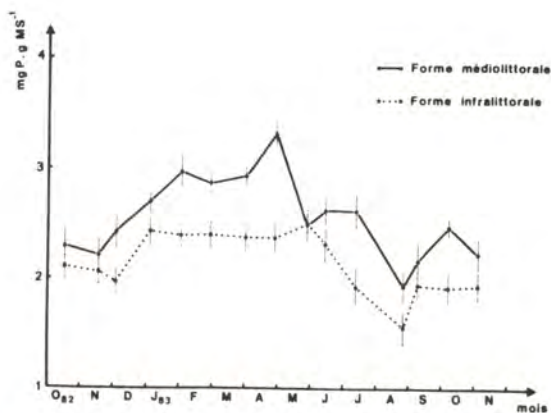


Figure 6 : Variations saisonnières des teneurs en phosphore total dans le thalle entier chez les deux formes de *Chondrus crispus*. Résultats exprimés en mg P.g MS<sup>-1</sup>. Moyenne de 5 dosages (environ 60 thalles) ± l'erreur standard.

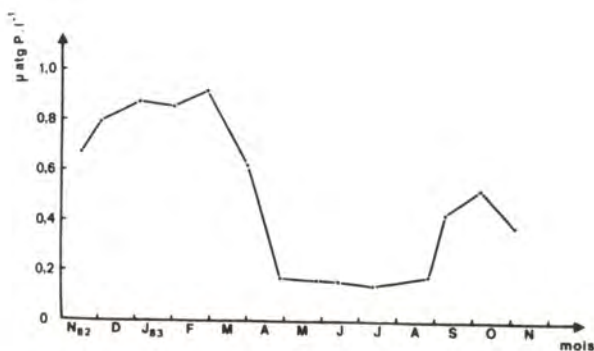


Figure 7 : Variations saisonnières des teneurs en phosphore minéral dissous dans l'EMF à Porz Liogan. Résultats exprimés en µatg P.l<sup>-1</sup>.

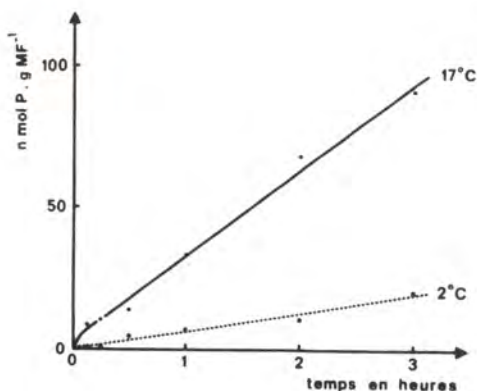


Figure 8 : Absorption du phosphore en fonction du temps par des disques de *Chondrus crispus* à 17°C et 2°C. Milieu d'absorption : EMF non enrichie (0,52 µmol P.l EMF<sup>-1</sup>) et marquée (4,22.10<sup>5</sup> Bq <sup>32</sup>P.l EMF<sup>-1</sup>). Résultats exprimés en nmol P.g MF<sup>-1</sup>. Moyenne de 4 expériences.



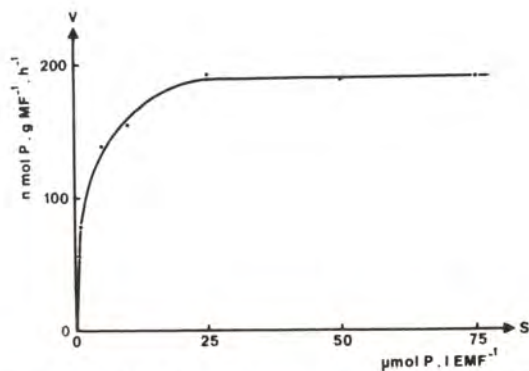


Figure 9 : Influence des faibles concentrations en phosphate du milieu d'absorption (première composante hyperbolique) sur la vitesse d'absorption des disques de *Chondrus crispus*. Résultats exprimés en  $\text{nmol P.g MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Moyenne de 4 expériences.

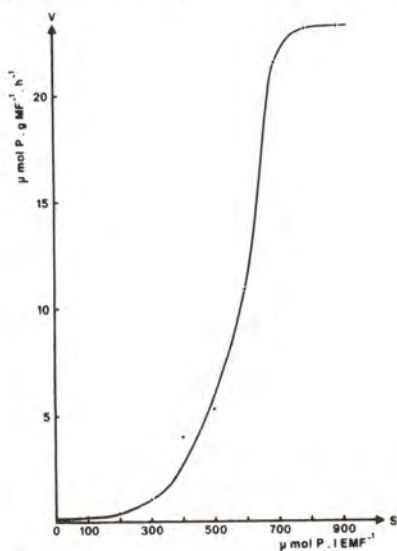


Figure 10 : Influence de la concentration en phosphate du milieu d'absorption (deuxième composante hyperbolique) sur la vitesse d'absorption des disques de *Chondrus crispus*. Résultats exprimés en  $\text{nmol P.g MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Moyenne de 4 expériences.

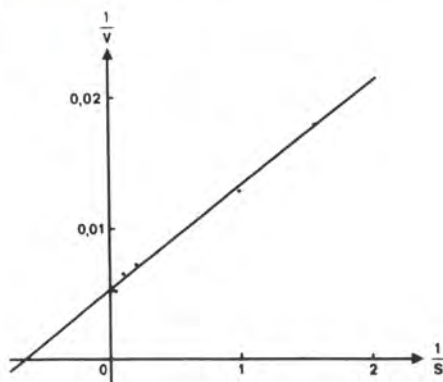


Figure 11 : Représentation en coordonnées inverses selon Lineweaver et Burk des résultats de la figure 9.

de  $V_m$  (189,50 mmol P.g MF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) et de  $K_m$  (1,49  $\mu$ mol P.l EMF<sup>-1</sup>). Ce dernier étant faible, on a donc une composante à forte affinité pour le substrat.

- Exsorption en eau de mer filtrée non enrichie

Après trois heures d'absorption, l'évolution de l'exsorption a été étudiée (Figure 12). Elle est faible (14 %) et analogue à celle observée chez *Laminaria hyperborea* : 5 à 15 % (FLOC'H, 1979). Ce phénomène peut s'expliquer par un simple échange isotopique avec le phosphore de l'EMF (FLOC'H et PENOT, 1976) et traduit un fort pouvoir de rétention des tissus vis-à-vis de cet ion.

#### Analyse des composés phosphorylés

Après avoir caractérisé quelques aspects des échanges du phosphore entre l'algue et le milieu marin, il nous a semblé intéressant, dans le cadre d'une approche du métabolisme phosphoré, d'analyser le devenir et la répartition de cet ion après son absorption.

Après pénétration dans la cellule sous forme inorganique, le phosphore est rapidement incorporé dans des molécules organiques hydrosolubles ( $^{32}P_o = 46,59 \pm 1,73$  % de la radioactivité totale incorporée durant 3 heures d'absorption ; Tableau I). Ceci confirme la liaison étroite entre l'absorption du phosphore et le métabolisme cellulaire et explique, en partie, sa faible exsorption. La radioactivité de la fraction  $^{32}P_{ins}$  représente environ le quart de l'absorption totale tout comme celle de la fraction  $^{32}P_i$ . La radioactivité de la fraction  $^{32}P_{lip}$  est faible ( $3,36 \pm 0,61$  %).

Après 3 heures d'absorption, la teneur en phosphore de la fraction  $^{32}P_o$  est beaucoup plus élevée que celle de la fraction  $^{32}P_i$  (Tableau II) ; ceci s'explique par le fait que de nombreuses substances, impliquées dans différentes voies métaboliques, renferment dans leur structure des atomes de phosphore. L'activité spécifique est beaucoup plus importante pour la fraction  $^{32}P_i$  que pour la fraction  $^{32}P_o$ .

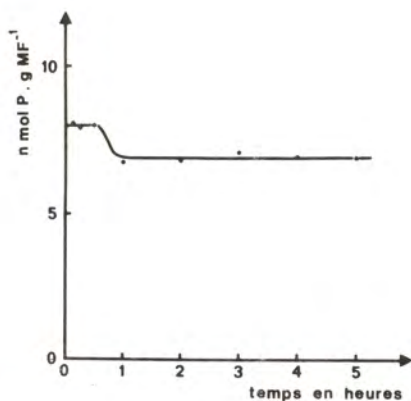
Les composés phosphorylés que nous avons identifiés (Figure 13) sont ceux que l'on trouve également chez les végétaux supérieurs (Cole et Ross, 1966 ; Hourmant et al., 1979) et d'autres algues comme les Laminaires (Floc'h et Penot, 1978).

Parmi les composés phosphorylés hydrosolubles (Tableau III), le  $P_i$  et les HMP représentent à eux seuls plus de 50 % de la radioactivité de la fraction  $^{32}P_{solH_2O}$  ( $53,35 \pm 1,59$  %). Le pourcentage, assez important, de l'ATP ( $11,29 \pm 0,54$  %) et l'estimation de la charge énergétique ( $0,82 \pm 0,02$ ) sont des valeurs normales pour des tissus en métabolisme aérobie et comparables à celles observées chez les végétaux supérieurs (Hourmant et al., 1979 ; Mocquot et al., 1981). Les autres composés ont des pourcentages beaucoup plus faibles que les précédents.

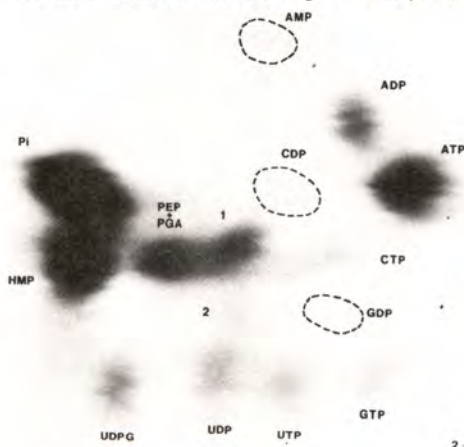
#### DISCUSSION ET CONCLUSION

La répartition des teneurs en phosphore total le long du thalle de *Chondrus crispus* n'est pas homogène. L'âge des tissus est-il responsable de ce fait ou faut-il l'expliquer par une absorption préférentielle le long du thalle ou encore par des mouvements de redistribution de cet ion entre les différentes parties de l'algue ? Des résultats préliminaires d'expériences visant à rechercher l'existence d'un transport à longue distance de  $^{32}P$  le long du thalle de *Chondrus crispus* ne semblent pas indiquer que les accumulations de phosphore froid trouvées dans certaines parties du thalle soient dues à une redistribution orientée de l'élément contrairement à ce qui a été démontré chez les algues brunes Fucales et Laminariales (Floc'h, 1982).

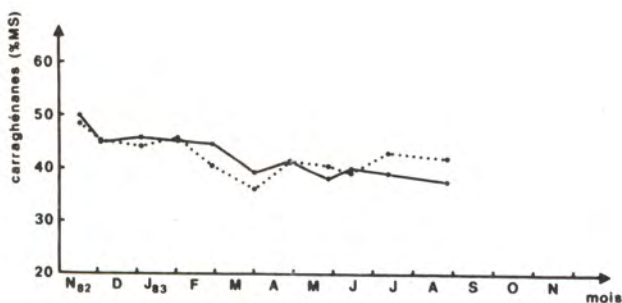
La comparaison des variations des teneurs en phosphore dans l'algue (Figures 4 et 5) avec celles de l'eau de mer (Figure 7) montre que les variations dans l'algue suivent celles de l'eau de mer avec un décalage d'environ deux mois. Il est classiquement reconnu que dans l'eau de mer, la chute des teneurs en phos-



**Figure 12** : Exsorption du phosphore en fonction du temps par des disques de *Chondrus crispus*. Milieu d'absorption : EMF non enrichie (0,40  $\mu\text{mol P.l EMF}^{-1}$ ), marquée ( $3,7.10^5 \text{ Bq } ^{32}\text{P.l EMF}^{-1}$ ) et à 17°C. Milieu d'exsorption : EMF non enrichie (0,40  $\mu\text{mol P.l EMF}^{-1}$ ), non marquée et à 0°C. Résultats exprimés en  $\text{nmol P.g MF}^{-1}$ . Moyenne de 2 expériences.



**Figure 13** : Autoradiographie des chromatogrammes bidimensionnels sur papier des composés hydrosolubles marqués au  $^{32}\text{P}$  de disques de *Chondrus crispus*. Extraction des composés réalisée après 3 heures d'absorption en EMF non enrichie (0,10  $\mu\text{mol P.l EMF}^{-1}$ ), marquée ( $3,7.10^7 \text{ Bq } ^{32}\text{P.l EMF}^{-1}$ ) et à 17°C.



**Figure 14** : Variations saisonnières des teneurs en carraghénanes extraits de gamétophytes de *Chondrus crispus* chez la forme médiolittorale (●—●) et la forme infralittorale (●...●). Résultats exprimés en % MS.



Fractions	% de la radioactivité totale
$^{32}\text{P}_0$	46,59 ± 1,73
$^{32}\text{P}_{\text{ins}}$	27,85 ± 1,62
$^{32}\text{P}_i$	22,20 ± 0,66
$^{32}\text{P}_{\text{lip}}$	3,36 ± 0,61

**Tableau I** : Répartition de la radioactivité entre les différentes fractions phosphorylées. Résultats exprimés en pourcentage de la radioactivité totale. Temps d'absorption : 3 heures. Milieu d'absorption : EMF non enrichie (0,10  $\mu\text{mol P.l EMF}^{-1}$ ), marquée ( $3,70.10^7 \text{ Bq } ^{32}\text{P.l EMF}^{-1}$ ) et à 17°C. Moyenne de 5 expériences ± 1'erreur standard.

Fractions	Teneur en phosphore	Activité spécifique
$^{32}\text{P}_0$	118 ± 24	( 31 ± 4).10 <sup>2</sup>
$^{32}\text{P}_i$	9 ± 0,5	(260 ± 10).10 <sup>2</sup>

**Tableau II** : Teneur en phosphore et activité spécifique des fractions phosphorylées  $^{32}\text{P}_0$  et  $^{32}\text{P}_i$  après 3 heures d'absorption. Résultats exprimés en  $\mu\text{g P.mg Nins}^{-1}$  pour la teneur en phosphore et en  $\text{Bq.}\mu\text{g P}^{-1}$  pour l'activité spécifique. Moyenne de 6 expériences ± 1'erreur standard.

Composés phosphorylés hydrosolubles	% de l'absorption dans la fraction $^{32}\text{P}_{\text{sol H}_2\text{O}}$
$\text{P}_i$	34,89 ± 1,31
HMP	18,46 ± 0,66
ATP	11,29 ± 0,54
PEP + PGA	7,05 ± 0,74
Inconnu 1	4,30 ± 0,34
UTP	4,19 ± 0,48
ADP	4,14 ± 0,41
UDP	3,68 ± 0,29
UDPG	2,73 ± 0,28
Inconnu 2	2,12 ± 0,44
CTP	2,11 ± 0,27
GTP	1,97 ± 0,13
GDP	0,93 ± 0,14
CDP	0,74 ± 0,11
AMP	0,52 ± 0,10
Origine	0,88 ± 0,09

**Tableau III** : Répartition de la radioactivité entre les différents composés phosphorylés hydrosolubles. Résultats exprimés en pourcentage de la radioactivité de la fraction  $^{32}\text{P}_{\text{sol H}_2\text{O}}$ . Temps d'absorption : 3 heures. Milieu d'absorption : EMF non enrichie (0,10  $\mu\text{mol P.l EMF}^{-1}$ ), marquée ( $3,70.10^7 \text{ Bq } ^{32}\text{P.l EMF}^{-1}$ ) et à 17°C. Moyenne de 9 expériences ± 1'erreur standard.

phore au début du printemps, les faibles valeurs de la fin du printemps et de l'été ainsi qu'une chute moins marquée en automne sont à relier essentiellement à l'importante assimilation phytoplanctonique durant ces périodes (Bougis, 1974). La chute marquée au printemps et les valeurs faibles de l'été en phosphore total dans le sommet et le milieu de *Chondrus crispus* sont peut-être la conséquence de cet appauvrissement de l'eau de mer en sels nutritifs, l'algue régulant sa concentration interne en phosphore en fonction de la concentration du milieu externe en cet élément. On peut également supposer que les variations des teneurs en phosphore au sommet et au milieu du thalle sont la conséquence de variations dans la croissance de l'algue, celle-ci pouvant d'ailleurs elle-même être sous le contrôle des concentrations en sels nutritifs du milieu marin. En effet, on admet généralement que la croissance de l'algue est sujette à des variations saisonnières (DeBoer, 1981). De plus, le décalage de la chute printanière des teneurs en phosphore entre le sommet et le milieu du thalle (Figures 4 et 5) pourrait signifier que le rythme de croissance est différent pour ces deux régions de l'algue. Des études sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

Le fait que la forme médiolittorale contienne toujours plus de phosphore que la forme infralittorale lorsque l'on considère le thalle entier (Figure 6), et donc que le facteur de concentration soit toujours plus élevé pour la première forme que pour la seconde, incite à se demander quelle est la signification physiologique des "formes très opposées" de *Chondrus crispus*. Ainsi, le décalage de deux mois pour la forme médiolittorale (Figure 4) et seulement d'un mois pour la forme infralittorale (Figure 5) dans la chute printanière des teneurs en phosphore entre le milieu et le sommet du thalle reste à expliquer.

On a longtemps pensé que les deux formes considérées représentaient une adaptation écologique (notamment vis-à-vis de la durée d'émergence, de l'agitation de l'eau et de l'intensité d'éclairement) de la même espèce (Thomas, 1938 ; MacFarlane, 1968), Newton et al. (1957) allant même jusqu'à nier l'existence de toute variété. Faut-il, au contraire, associer nos résultats à ceux acquis à partir d'expériences de transplantation (Floc'h, 1969), d'hybridation ainsi qu'aux observations sur la structure et l'anatomie (Chen et Taylor, 1980 b), pour suggérer qu'il s'agit de variétés différentes, voire de populations d'une même espèce isolées génétiquement, pouvant présenter des réponses différentes aux variations des facteurs écologiques ?

Les valeurs élevées des teneurs en phosphore total et du facteur de concentration dans l'algue résultent d'une absorption liée au métabolisme comme le montre l'allure ascendante des cinétiques, la diminution de sa vitesse à basse température et son augmentation (selon un système à deux composantes hyperboliques) lorsque l'on enrichit l'eau de mer en phosphate. La première composante possédant une forte affinité pour le phosphore, il n'est pas étonnant que l'absorption de cet ion soit faible.

Au bout de trois heures d'absorption, le phosphore  $^{32}\text{P}$ , après avoir été absorbé dans la cellule sous forme inorganique, est incorporé dans des molécules organiques dont les 3/5 sont hydrosolubles. Les composés phosphorylés que nous avons identifiés par chromatographie se révèlent être ceux que l'on rencontre habituellement chez les végétaux supérieurs et d'autres algues comme les Laminaires.

D'après Neish et al. (1977), les teneurs en carraghénanes de *Chondrus crispus* sont en relation avec les concentrations en sels nutritifs du milieu extérieur. On peut se demander si les variations saisonnières de la teneur en phosphore dans le thalle de cette algue peuvent être liées à celles de la qualité et de la quantité des carraghénanes. C'est pourquoi nous étudions mensuellement depuis novembre 1982 les variations de la teneur en carraghénane K du gamétophyte. Les premiers résultats (Figure 14) semblent indiquer que chez les deux formes celle-ci chute à partir de la fin de l'hiver pour atteindre des valeurs printanières et estivales plus faibles que celles d'automne et du début de l'hiver. Des études de spectroscopie infra-rouge et de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  sont en cours afin de tenter de



préciser le caractère hybride (spectre de différentes fractions) du carraghénane K ainsi que les variations saisonnières de ces fractions.

- 
- Atkinson D.E. et Walton G.M., 1967 - Adenosine triphosphate in metabolic regulation. J. Biol. Chem., 242, p. 3239-3241.
- Bodeau-Bellion C., 1983 - Analysis of carrageenan structure. Physiol. Vég., 21, (4), p. 785-793.
- Bougis P., 1974 - Ecologie du plancton marin, I. Le phytoplancton. Masson éd., Paris, 196 p.
- Charlot G., 1966 - Les méthodes de la chimie analytique. Analyse quantitative minérale. Cinquième édition. Masson éd., Paris, 1023 p.
- Chen L.C.M. et Taylor A.R.A., 1980 a - Investigations of distinct strains of *Chondrus crispus* Stackh. I. Field and laboratory observations. Bot. Mar., 23, (7), p. 435-440.
- Chen L.C.M. et Taylor A.R.A., 1980 b - Investigations of distinct strains of *Chondrus crispus* Stackh. II. Culture studies. Bot. Mar., 23, (7), p. 441-448.
- Cole C.V. et Ross C., 1966 - Extraction, separation and quantitative estimation of soluble nucleotides and sugar phosphates in plant tissues. Analyt. Biochem., 17, p. 526-539.
- DeBoer J.A., 1981 - Nutrients. In : "The biology of seaweeds. Botanical monographs", 17 (chap. 10), p. 356-392. Lobban C.S. et Wynne M.J., Blackwell, Oxford, 786 p.
- Ducet G. et Vandewalle G., 1959 - Nouvelles techniques de dosage du phosphore. Ann. Physiol. Vég., 2, p. 199-206.
- Epstein E., 1966 - Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. Nature, 212, p. 1324-1327.
- Floc'h J.Y., 1969 - Premiers résultats d'une expérience de transplantation du *Chondrus crispus* (L.) Lyngb. In : "Proc. 6th Int. Seaweed Symp.", Santiago de Compostela, p. 171-177. Margalef R., Dirección General de Pesca Marítima, Madrid, 782 p.
- Floc'h J.Y., 1979 - Etude du transport à longue distance des éléments minéraux dans le thalle des algues brunes. Thèse de Doctorat d'Etat, Brest, 2 vol., 83 p.
- Floc'h J.Y., 1982 - Uptake of inorganic ions and their long distance transport in Fucales and Laminariales. In : "Synthetic and degradative processes in marine macrophytes", p. 139-166. Srivastava L.M., De Gruyter W., Berlin, New York, 296 p.
- Floc'h J.Y. et Penot M., 1976 - Etude comparative du transport à longue distance de différents radioéléments dans le thalle de *Laminaria digitata* (Linné) Lamouroux. C.R. Acad. Sci., Paris, 282, série D, p. 989-992.



- Floc'h J.Y. et Penot M., 1978 - Changes in  $^{32}\text{P}$ -phosphorus compounds during translocation in *Laminaria digitata* (L.) Lamouroux. Planta, 143, p. 101-107.
- Harvey W.H., 1846-1851 - *Phycologia Britannica*. London.
- Hourmant A., Pradet A. et Penot M., 1979 - Action de la benzylaminopurine sur l'absorption du phosphate et le métabolisme des composés phosphorylés des disques de tubercule de pomme de terre en survie. Physiol. Vég., 17, (3), p. 483-499.
- Ivanoff A., 1972 - Introduction à l'océanographie. Propriétés physiques et chimiques des eaux de mer. Tome I. Vuibert, Paris, 208 p.
- Kornfeldt R.A., 1982 - Relation between nitrogen and phosphorus content of macroalgae and the waters of northern Oresund. Bot. Mar., 25, (4), p. 197-201.
- Laties G.G., 1967 - Metabolic and physiological development in plant tissues. Aust. J. Sci., 30, p. 193-203.
- Mac Candless E.L., 1981 - Biological control of carrageenan structure : effects conferred by the phase of life cycle of the carrageenophyte. In : "Proc. 8th Int. Seaweed Symp.", Bangor, p. 1-17. Fogg G.E. et Jones W.E., The Marine Science Laboratories, Menai Bridge, 769 p.
- Mac Farlane C.I., 1968 - *Chondrus crispus* Stackhouse - a synopsis. Seaweeds Division, Nova Scotia Research Foundation, Halifax, 44 p.
- Mocquot B., Prat C., Mouches C. et Pradet A., 1981 - Effect of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryo. Plant Physiol., 68, p. 636-640.
- Murphy J. et Riley J.P., 1962 - A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta, 27, p. 31-36.
- Neish A.C., Shacklock P.F., Fox C.H. et Simpson F.J., 1977 - The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. Can. J. Bot., 55, (16), p. 2263-2271.
- Newton L., Devonald V.G. et Jones N.R., 1957 - Recherches sur *Chondrus crispus* (L.) Stackh. et quelques unes de ses soi-disant variétés. In : "81ème Colloque International du CNRS, Ecologie des Algues Marines", Dinard, p. 121-139. CNRS, Paris, 276 p.
- Raes D.A., 1969 - Polysaccharide gels and networks. Carrageenans and other natural sulphates. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 24, p. 267.
- Thomas M., 1938 - Der Formenkreis von *Chondrus crispus* und seine ökologische Bedingtheit. Hedwigia, 77, p. 137-210.

## "LES MAREES VERTES"

Premier bilan concernant les essais de valorisation

D. BRAULT, X. BRIAND, P. GOLVEN -

Centre d'Expérimentation et de Recherche Appliquée en Algologie BP 3 22610 PLEUBIAN

-----  
Les côtes bretonnes, et plus précisément les zones estuariennes et les baies, sont depuis 1968 le siège de l'arrivée régulière et saisonnière de quantité importante d'algues vertes *Ulva lactuca*.

Ce phénomène inhabituel, nouveau, a tout naturellement pris pour nom, sur ces côtes habituées aux marées noires, celui de "marée verte". Ceci représente bien l'importance du phénomène aux yeux des riverains qui, mieux que quiconque, savent que la seule solution actuelle réside dans le ramassage.

### Un exemple : la Baie de LANNION en 1982

#### Les faits :

Cette zone touristique est la plus touchée, elle se situe sur la côte nord Bretagne, dans le département des côtes-du-Nord.

Sur 8 km de plages, les services de l'équipement ont fait procéder à l'enlèvement de 25 000 m<sup>3</sup> de ces algues vertes, extrêmement fermentescibles, entre les mois de Mai et de Septembre, c'est-à-dire en pleine saison estivale.

#### Conséquences

- Désaffectation des estivants (odeur pestilentielle, 2000 rotations de camions... ) en zone touristique : la côte de Granit Rose.
- Coût élevé : 600 KF en 1982, pour 3 communes de petite taille (3447, 398, 156 habitants respectivement) uniquement pour la collecte.
- Un ramassage qui ne constitue qu'un transfert de pollution : en effet, pour restreindre les frais, les algues sont stockées, en décharge contrôlée, proche des zones touchées. On assiste alors à une liquéfaction rapide de l'algue, et au bout de un an, on ne retrouve plus que du sable. Les jus très riches en matière organique et acides gras volatils retournent dans la Baie par l'intermédiaire des cours d'eaux douces et participent au phénomène d'eutrophisation de la baie.

#### Causalités

Pas de certitudes à ce jour. Un simple faisceau de présomptions concernant l'enrichissement des eaux estuariennes en sels nutritifs. N'oublions pas que le département des Côtes-du-Nord est le premier département avicole français, que ce même département et le Finistère produisent 30 % de porc charcutier français, et que nous nous trouvons en pleine zone légumière.

Des études menées actuellement par différentes équipes devraient nous éclairer rapidement sur ce dernier point.

## Perspectives

Les échouages semblent se stabiliser notamment pour les zones les plus anciennement touchées (baie de LANNION, baie de ST BRIEUC). Cependant, le phénomène serait en expansion (baie de CONCARNEAU, baie de DOUARNENEZ, rade de BREST). A ce jour, 45 % des communes littorales du Finistère et des Côtes-du-Nord sont concernées.

## Objectifs

S'il n'est pas concevable d'agir aujourd'hui efficacement en amont du phénomène, c'est-à-dire sur les techniques culturales (épandage d'engrais, de lisier, remembrement, arasement des talus...), les techniques piscicoles, les rejets industriels et urbains, il apparaît nécessaire de tenter de valoriser, ou du moins de traiter cette matière première qui possède, ne l'oublions pas, comme tout déchet une valeur négative, et ainsi de proposer aux communes touchées des solutions quant au traitement de la matière première. Ces solutions ne peuvent être que multiples afin de s'adapter aux situations de terrain qui sont très diverses et fonction de l'équipement actuel des communes (moyens de ramassage et usine de traitement des ordures...), ainsi que de l'intensité du phénomène "marée verte".

### TRAITEMENT DE L'ALGUE VERTE : ESSAIS DE VALORISATION

#### 1) Fabrication d'amendements organiques

Les essais d'épandage direct sur les cultures de l'algue verte récoltée sur les plages polluées, suivis par la Chambre d'Agriculture des Côtes-du-Nord, montrent que ceux-ci, contrairement aux épandages d'algues brunes qui se font depuis des temps immémoriaux, ont pour des doses supérieures à 50 tonnes/ha un effet dépressif sur les cultures (PELEE, 1982), tandis qu'en dessous de 50 tonnes/ha les quantités de matière organique, N, P, et K apportées ne justifient en aucune façon le temps passé par l'agriculteur à l'épandage.

Dès lors, la stabilisation de la matière première par compostage, c'est-à-dire la dégradation des composantes biodégradables de déchets organiques en conditions contrôlées, s'est avérée nécessaire avant toute utilisation agronomique.

Autres avantages de cette opération :

- Elimination possible de 100% de la matière première collectée,
- opération facilitée par le caractère éminemment fermentescible de l'algue verte
- opération facile à mettre en oeuvre par une collectivité.

Dans un premier temps, les opérations ont consisté à conférer à la matière première les caractéristiques physico-chimiques les plus proches des caractéristiques théoriques optimales de compostage (tableau 1).

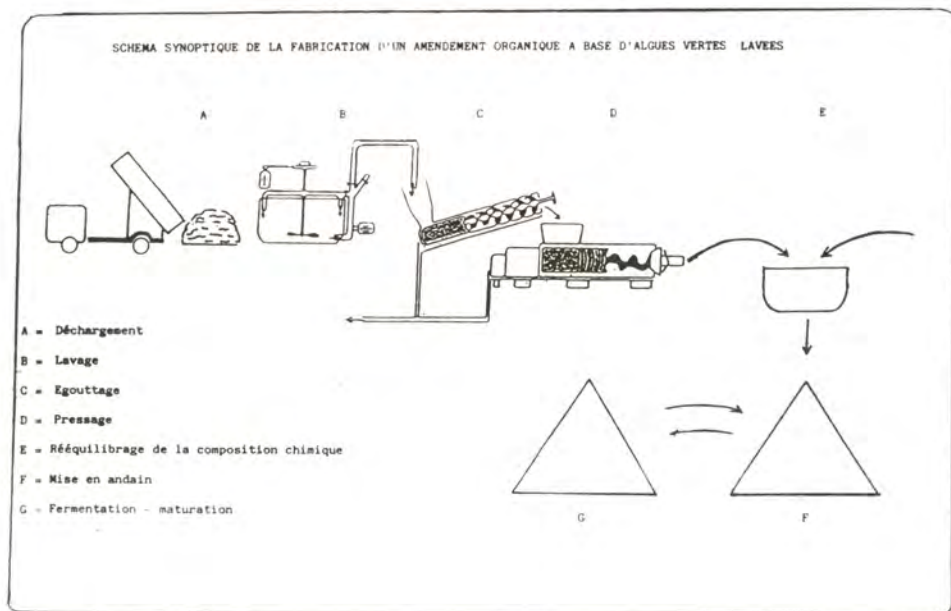
Tableau 1 : caractéristiques physico-chimiques de l'algue verte (Ulva) et du produit prêt à composter

Matière première Paramètre	ULVA	Produit prêt à composter (optimum)
Matière sèche	12 - 20 %	30 - 50 %
Matière minérale	30 - 40 % MS	-
C/N	9 - 19 %	25 - 35 %
Densité	0,5	0,3
Structure	Compacte	Fine et aérée



Différentes opérations, telles que la déshydratation et l'incorporation de substrat carboné (figure 1) s'avèrent indispensables pour arriver aux valeurs optimales de 30 % et 35, respectivement pour la siccité et le rapport C/N.

Figure 1



Les paramètres intervenant sur le déroulement de la fermentation et sur la valeur du produit final, que nous avons suivi durant notre expérimentation, sont les suivants :

- la présence de sel, en lavant au préalable les algues à l'eau douce. Cette opération augmente très sensiblement les coûts de l'opération et enlève une partie non négligeable de sels nutritifs et de sable, mais diminue très sensiblement la résistivité.
- la matière sèche de l'ulve en début d'opération, en fonction du type de presse utilisée (à vis, à filtre...). Celle-ci apparaît cependant très dépendante de la fraîcheur de l'algue.
- la nature du substrat carboné, dont le rôle est bien sûr celui d'apport de carbone mais également de desséchant. Ces substrats carbonés sont représentés par des sciures de résineux, de feuillus, des écorces, des copeaux, des litières, du compost urbain. En fait, pour des caractéristiques équivalentes en matière sèche et en carbone, on observe des comportements très différents, d'où la notion de qualité de substrat carboné.
- L'aération des andains, forcée ou par retournement.

Le compost obtenu (tableau 2) est de qualité très satisfaisante, si ce n'est la résistivité trop élevée, et devrait convenir parfaitement à son utilisation en maraîchage. L'absence de matières indésirables (verre, plastique) ou de graines devrait être un atout supplémentaire face à ses concurrents.

Notre prochaine étape concernant ce procédé consistera dès 1984 en la mise sur pied d'un test de vente en relation avec un professionnel de l'amendement organique.

Tableau 2 : comparaison des caractéristiques physicochimiques de différents composts (BRAULT D., GOLVEN P., BRIAND X., 1983)

Caractéristiques générales	Compost d'algues vertes non lavées (sciure)	Compost d'algues vertes non lavées (écorce)	Compost d'ordures ménagères	Gadoues	Fumier de champignonnière	Compost d'écorce
Siccité (%)	64	50	56,3	-	-	33
pH	7,8	8,5	7,6	-	5,8 - 6,2	6
Densité apparente	0,38	0,29	-	-	-	0,5
C/N	19	25	22,3	21,4	-	-
Caractéristiques sur sec (%)						
Matières minérales Totales	43	48			42 - 53	
Insolubles chlorhydriques	12	12,4				
Matières organiques	57	52		49,8	47 - 58	31
Carbone organique	21	22,4	21,37	21		
Azote total	11	0,89	0,96	0,98	1,8 - 2,2	0,45
Azote ammoniacal	7					
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,18	0,2	0,24	0,71		0,09
K <sub>2</sub> O	1,3	1,4	0,24	0,18		0,20
CaO				4,52		1,6
MgO				0,53		0,04
Na <sub>2</sub> O	2,4	2,6				
Chlorure (NaCl)			0,48			
Soufre (SO <sub>3</sub> )						
Caractéristiques sur sec ppm						
Fer	65-61		977	5300	2500-4000	
Manganèse	17-15		40,3	400	200-300	
Nickel			8,12		6 - 7,5	
Cadmium			115	400	0,12 - 0,25	
Zinc	37-47				50-200	
Iode						
Cobalt			17,1			
Cuivre	21-31		325	50	10-25	
Plomb			1001		2,5-4	
Mercure			3,62		0,03-0,08	
Bore			18,6		11-18	
Chrome	14-20		148,1		8-12	
Molybdène					1-1,5	
Arsenic						
Sélénium						

## 2) Production d'énergie

Suivant en cela l'exemple de leurs homologues américains et à leur échelle, différentes équipes françaises se sont lancées, voici quelques années, dans la méthanisation de la biomasse végétale marine. Si la faisabilité technique d'une telle opération (BORIES A et al., 1983) n'est plus à démontrer, les rendements obtenus en infiniment mélangés sur les digesteurs actuels sont trop réduits pour que l'opération "passe" au niveau économique. Des études, concernant une meilleure connaissance des populations bactériennes responsables de la méthanisation des algues, sont en cours dans le but d'améliorer les rendements.

Compte-tenu de ces impératifs financiers, des recherches sont actuellement menées afin de séparer l'opération en 2 phases - liquéfaction et gazéification - ce qui devrait nous permettre de travailler en continu sur une phase liquide, sur lit bactérien. Pour y parvenir, différents prétraitements, tant thermiques que chimiques ou enzymatiques, ont été étudiés (BROUARD, 1983). Le Centre d'Algologie s'est attaché pour sa part à suivre ce qui se passe dans les carrières, où s'effectue le stockage de l'algue ramassée sur les plages polluées. En effet, on assiste dans ces carrières à une disparition totale de la matière organique (tableau 3) au bout de un an de stockage.

Tableau 3 : Evolution de la composition chimique du dépôt au cours du stockage

Date de prélèvement Composition	Début de stockage	Fin de stockage
Matière sèche % MS	12	60,9
Matières minérales % MS	57	92,4
Matières organiques % MS	44	7,6
insoluble chlorhydrique %MS	13,5	31,3
N (Kjeldahl) % MS	1,9	0,07
P % MS	0,26	0,08
K % MS	1,5	0,2
Ca % MS	-	22,3
Na % MS	2,5	0,55

Cette liquéfaction nous a semblé intéressante à suivre afin de déterminer à cette échelle "industrielle", si les jus obtenus sont un substrat potentiellement intéressant pour la méthanisation et s'il est possible d'améliorer cette production de jus (tableau 4).



Tableau 4 : caractérisation des essais de prétraitements

N° de l'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Charge (tonnes)	25	2,5	0,1	0,073	0,05	0,1 + 10 Kg sable	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Volume (litres)	30 000	5 000	195	235	111	195	177	195	221	195	195	195
Traitement						sable	lessivage forcée	sous abri	lisier	soude	ammo- niac	carbo- nate de calcium
facteurs testés	Influence de la charge					Influence des précipitations		Maintien du pH				

Le protocole expérimental suivi devrait nous permettre d'apporter rapidement une solution. La méthanisation des jus obtenus apparaîtrait ainsi comme un traitement qui diminue la charge polluante tout en produisant de l'énergie. Il est à signaler que les jus obtenus ainsi que la phase solide sont tout à fait aptes au compostage, ce qui fait que méthanisation et compostage sont deux opérations qui ne s'excluent aucunement.

### 3) L'alimentation

L'ulve, étant donné sa composition chimique (tableau 5), n'apparaît pas être un aliment très énergétique bien que les teneurs en protéines soient du même ordre de grandeur que celles de la luzerne (jusqu'à 18 % de la matière sèche).

Tableau 5 : valeur nutritive de l'Ulva lactuca

CARACTERISTIQUES	TENEUR/MS
<u>Valeur énergétique</u>	
Protéines %	14,7
Matières grasses %	2,8
Cellulose %	6,3
Extractif non azoté %	41
<u>Vitamines</u>	6050
A (UI)	
B1 mg/kg	3,98
B12 mg/kg	0,0545
C mg/kg	19,9
D mg/kg	864
E mg/kg	33,7
<u>Matières minérales %</u>	35,3
Phosphore total %	0,24
Calcium %	2
Magnésium %	2,2
Sodium %	0,9
Soufre %	7
Fer mg/Kg	1570
Zinc mg/Kg	16
Manganèse mg/Kg	57
Cuivre mg/Kg	9
Iode mg/Kg	220
Cobalt mg/Kg	0,45
Sélénium mg/Kg	0,063
<u>Acides aminés</u>	
Méthionine + Cystine %	0,52
Lysine %	0,68
Caroténoïdes mg/Kg	230

Les "marées vertes" d'aujourd'hui ne remplaceront pas les spirulines d'hier en tant qu'apport de protéines. Cependant, étant donné son origine marine, diverses utilisations semblent possibles.

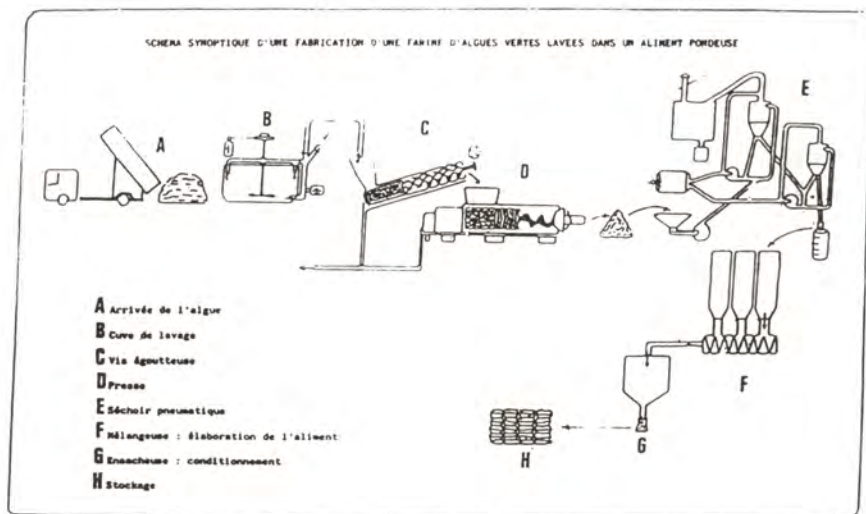
- La présence de ces algues dans la ration alimentaire de certaines populations du Brésil ou d'Indonésie, bien qu'effective, ne peut se concevoir actuellement en France compte-tenu des habitudes alimentaires, même limitées à certains consommateurs bien particulier (macrobiotiques, végétariens...), et se heurtent d'une part à l'utilisation d'algue fraîche de pleine eau (coût élevé) et d'autre part à la législation française.
- En alimentation animale, les impératifs énergétiques demeurent et font que l'Ulve ne peut intervenir que par des composés spécifiques ou par des teneurs élevées, qui puissent concurrencer les productions terrestres.

C'est l'implantation du Centre d'Algologie sur le Département des Côtes-du-Nord (premier département français pour la production d'oeufs) qui nous a naturellement orienté vers les problèmes rencontrés par les aviculteurs dans la production d'oeufs "fermiers". La charte qui lie tous ces producteurs n'autorise pas entre autre l'utilisation de pigments synthétiques dans la ration alimentaire des pondeuses. Or, pour rentrer sur certains marchés (Sud-Ouest, Suisse, RFA...), il est nécessaire de posséder une certaine pigmentation du vitellus de l'oeuf.

Les valeurs à atteindre sont fréquemment de 11 sur l'échelle ROCHE, et cette valeur, aisée à atteindre pour les oeufs de consommation courante, devient problématique pour l'oeuf fermier. Les fabricants d'aliments ont à leur disposition la luzerne et le gluten de maïs, mais ces colorants, outre leur coût, leur composition variable, les difficultés d'approvisionnement, sont d'une efficacité limitée (9-10 avec la luzerne, 10-11 avec le gluten de maïs) et ne donnent pas une garantie de résultat.

Connaissant les teneurs en pigments de l'ulve, les quantités disponibles et le coût négatif actuel de celle-ci, nous avons testé l'incorporation de la farine d'Ulve à la ration alimentaire des pondeuses. Le procédé de fabrication de la farine est résumé dans le schéma suivant (figure 2).

Figure 2



L'expérimentation, qui a été mise en place à la Station d'Aviculture de Ploufragan, a consisté à vérifier entre autre :

- l'appétence du produit,
- la digestibilité,
- la coloration du vitellus,
- la tenue du blanc,
- la solidité de la coquille.

Les résultats sont les suivants :

Tableau 6 : Influence de l'incorporation d'Ulves dans l'alimentation des pondeuses sur la qualité de l'oeuf

Nombre d'oeufs contrôlés par lot	Facteurs étudiés	Témoin	Maïs : 53 % Luzerne : 5%	Maïs : 53 % Luzerne:2,5 % Ulves : 5 %	Maïs : 53 % Ulves : 10 %	Maïs : 51 % Ulves : 10 %	Valeurs F
		110	Unités Haugh (1)	64,7a ± 12,8	68,3b ± 11,2	71,9b ± 9,7	69,1b ± 13,0
110	Pigmentation du vitellus	9,4a ± 0,7	11,15b ± 0,7	11,6c ± 0,6	12,0d ± 0,5	327,5	
110	Oeufs avec taches (%)	52,3	51,8	46,8	52,4	< 1 N.S.	
110	Avec taches n° 2 (%)	20,2	27,3	18,9	20,9	< 1 N.S.	
110	Avec taches n° 3 (%)	11,9	9,1	12,6	12,4	< 1 N.S.	
30	Déformation des coquilles (µ)	21,1 ± 2,7	23,1 ± 3,2	22,7 ± 2,6	21,8 ± 2,5	2,62	
110	Proportion de coquille (%)	9,02 ± 0,94	8,97 ± 0,90	9,01 ± 0,91	9,03 ± 0,91	< 1 N.S.	

\*\*\* hautement significatif (p < 0,001)  
tache n° 2 = tache moyenne  
tache n° 3 = grosse tache

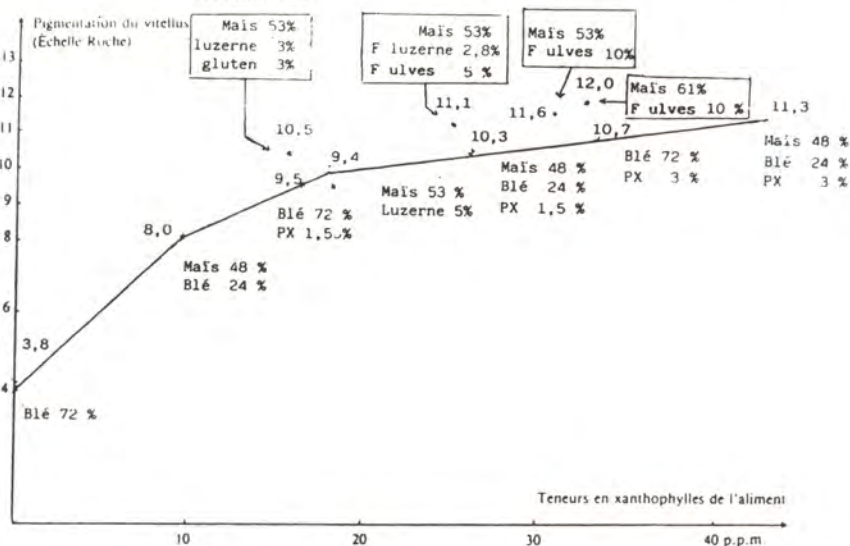
La poule accepte très bien cet aliment et ne souffre pas de problème digestif. Les deux concentrations testées (5 et 10 %) donnent de bons résultats sur la pigmentation du vitellus, entre 11 et 12 sur l'éventail colorimétrique.

Il apparait que l'efficacité des Xanthophylles d'Ulve (figure 3) est nettement supérieure à celle de la luzerne.



Figure 3

- Pigmentation du vitellus en fonction de la quantité de xanthophylles dans l'aliment  
(BOUGON, 1982)



On note également une meilleure tenue du blanc, mais celle-ci n'a pas encore de valeur commerciale. Aucune amélioration de la texture de la coquille n'est observée.

Devant ces premiers résultats encourageants, il s'agit maintenant de vérifier sur une année de ponte si la poule ne subit pas de désordre métabolique important pouvant se traduire par une diminution de la production d'oeufs, une perte du poids de l'oeuf, etc... Cette expérimentation est actuellement en cours, de même que la recherche de la concentration optimale de farine d'Ulve et celle d'un séchoir plus adapté que celui actuellement utilisé.

Bien entendu, nous ne limitons pas notre intérêt aux seules algues vertes, mais essayons d'appliquer nos acquis aux autres algues (Sargasses, algues brunes d'échouage...) en tenant compte de leur spécificité.

BORIES A., SAUZE F., BROUARD F., 1983 - Digestion anaérobie de biomasses végétales aquatiques. Biomasse actualités, 3, 31-34

BOUGON M., PROTAIS J., 1982 - Influence d'extraits de luzerne (pxl) employés seuls ou en association avec du carophyll rouge sur la pigmentation du vitellus. Bull. Inform. Stat. Avic. Ploufragan, 22, 66-69

BRAULT D., GOLVEN P., BRIAND X., 1983 - Compostage d'algues vertes. Etude expérimentale. Biomasse actualités, 3, 36-37

BROUARD F., 1983 - Digestion anaérobie de la biomasse végétale aquatique. Thèse Docteur-Ingénieur, 120 p., Université de Toulouse.

PELE E., 1982 - Compte-rendu des épandages d'algues vertes, campagne agricole 1981-1982, Chambre d'Agriculture des Côtes-du-Nord, 14 p.

PRODUCTION DE JEUNES ORMEAUX  
A LA  
STATION EXPERIMENTALE D'ARGENTON  
par Jean-Pierre FLASSCH et Charles AVELINE

Rapports scientifiques et techniques n° 50

1 volume 21 x 29,7 - 72 p.

Prix : 70 F

ISSN 0339-2899

Pour le démarrage et le développement des expériences d'élevage de l'ormeau, *Haliotis tuberculata*, sur les côtes de Bretagne, il a fallu en priorité dominer la production de juvéniles, introuvables en nombre suffisant dans le milieu naturel. Après des études préliminaires en laboratoire, cette démarche a été menée, de 1976 à 1981, à 30 km au nord de Brest sur le site d'Argenton.

L'écloserie de production expérimentale est décrite en détail : installations de production d'électricité, d'air, d'eau douce, d'eau de mer, de filtration et thermorégulation, unités biotechniques d'algues, d'aires de ponte, d'élevage larvaire, de métamorphose, d'élevage jusqu'au sixième mois, d'aires de grossissement.

Les techniques d'élevage correspondant à chaque stade sont analysées. La biotechnie de production mise au point s'avère originale par rapport aux techniques d'inspiration japonaise : bacs à fond nu, contrôle de la production primaire pendant les vingt premiers jours (deux séquences algues unicellulaires, *Platymonas suecica* et *Pavlova lutheri*, puis *Prasinocladus marinus*, étape suivie d'une phase nourriture composée jusqu'au troisième mois, et enfin cycle normal, algues rouges naturelles en morceaux (*Palmaria palmata*).

Les bilans de croissance, de mortalité et de production de juvéniles par bac sont détaillés par année. Le rendement moyen de juvéniles de 8 à 10 mm, espéré au m<sup>2</sup>, est à six mois de 5 000, résultat largement atteint en 1980 et 1981. La production peut être étalée sur deux cycles par an. La production par personne et par an devrait dépasser les 200 000 juvéniles de 2 cm pour un personnel compétent. La dépense énergétique annuelle pour une production de plus de 100 000 juvéniles par an est de 0,1 l de fuel et de 0,5 kWh par juvénile.

Service de la Documentation  
et des Publications (SDP)  
IFREMER - Centre de Brest  
B.P. 337 - 29273 BREST CEDEX  
Tél. (98) 45.80.55 - Téléx 940.627 F

ETUDE ECOPHYSIOLOGIQUE DE QUELQUES MOLLUSQUES BIVALVES

A. RIVA (1) , H. MASSE (2)

R E S U M E

En utilisant un dispositif expérimental à flux continu, le taux de filtration de Mytilus galloprovincialis, Ostrea edulis, Ruditapes decussatus et Ruditapes aureus a été mesuré par une méthode indirecte, pour des conditions thermiques méditerranéennes côtières de mer ouverte. Les taux de consommation d'oxygène et d'excrétion d'azote ammoniacal ont été évalués en fonction de la température et de la salinité pour M. galloprovincialis. Les résultats sont discutés par rapport aux données de la littérature.

A B S T R A C T

Using an experimental flowing system, the filtration rate of Mytilus galloprovincialis, Ostrea edulis, Ruditapes decussatus and Ruditapes aureus has been measured by an indirect technique under Mediterranean thermal conditions in coastal open sea. The oxygen consumption and excretion rate of ammonia have been estimated and influence of temperature and salinity tested for M. galloprovincialis. The results are discussed and compared to literature data.

M O T S - C L E S : Bivalves, Filtration, respiration, excrétion, Méditerranée.

K E Y - W O R D S : mediterranean Bivalve, filtration, respiration, excretion.

---

(1) Fondation Océanographique Ricard, Ile des Embiez, 83140 Six-Fours-les-Plages et Laboratoire Biologie Marine, Faculté Sciences St-Jérôme 13394 Marseille Cedex 4

(2) Centre d'Océanologie de Marseille. Station Marine d'Endoume 13007 Marseille.



## INTRODUCTION

Dans le cadre des études sur les transferts d'énergie dans une chaîne trophique simple composée de microphytes et de bivalves filtreurs, il est essentiel d'évaluer les différents éléments du bilan énergétique. De telles études connaissent depuis longtemps un grand développement dans les pays anglo-saxons d'Europe notamment : Kruger (1960), Jorgensen (1966), Widdows et Bayne (1971), Vahl (1972, 1973), Forster-Smith (1975), Bayne et al. (1976 a et b), Winter (1976), Hildreth et Crisp (1976), Møhlenberg et Riisgard (1978), Kjørboe, Møhlenberg et Møhr (1980), etc ...

En France, peu d'équipes travaillent sur ces problèmes de manière soutenue: Lubet et Chappuis (1966), Fiala-Medioni (1973, 1979), Amouroux (1980), Shafee (1982), Shafee et Lucas (1982), Fiala-Medioni et Copello (1984).

Il s'ensuit que les espèces cultivées et adaptées aux conditions des eaux méditerranéennes sont peu étudiées et peu connues. Ainsi, alors qu'il existe une littérature considérable sur la moule commune *Mytilus edulis* (Bayne, 1976), il existe relativement peu de données sur *Mytilus galloprovincialis* qui fait l'objet d'une culture importante en Méditerranée (Lubet, 1973). C'est pourquoi nous avons proposé de commencer à combler cette lacune à partir d'une étude écophysiological, en conditions expérimentales contrôlées, portant sur quelques espèces communes d'intérêt commercial exploitées en Méditerranée. Dans un premier temps, le but est de rodier des méthodes permettant d'obtenir des données sur le taux de filtration, la consommation d'oxygène et l'excrétion azotée.

## MATERIEL ET METHODES

Deux espèces de mollusques bivalves endogés *Ruditapes aureus* (Gmelin) et *Ruditapes decussatus* (Linné) ainsi que deux espèces épigées sessiles de substrats durs *Mytilus galloprovincialis* Lamarck et *Ostrea edulis* var. *lamellosa* Linné ont été testées. Elles proviennent des fonds infralittoraux situés entre le Golfe de Fos et celui de Marseille, ou de l'étang de Thau.

Les expériences ont été menées sur des individus en dehors des périodes de maturation et de ponte.

Avant d'être placés dans les conditions expérimentales, les individus sont nourris *ad libitum* pendant quelques jours avec un mélange d'algues monocellulaires (*Pavlova lutheri* et *Tetraselmis suecica*). Ensuite, ils sont soumis à une acclimatation préalable ; pour cela, ils sont placés dans un bac thermostaté annexe, à la température de l'expérience sans apport de nourriture.

Le nettoyage des bacs ainsi que le renouvellement de l'eau de mer filtrée sont réalisés tous les jours. Les premières mesures sont effectuées une semaine après ce traitement. On peut donc considérer que, pour la consommation d'oxygène et l'excrétion, les mesures correspondent au niveau du métabolisme standard selon Fry (1947).

Lors des mesures du métabolisme de routine, les animaux sont continuellement nourris.

### Etude sur la filtration

Parmi les différentes méthodes directes ou indirectes, en circuits fermé ou ouvert, nous avons choisi une méthode indirecte avec un circuit à flux continu. L'appareillage est dérivé de celui conçu par Bayne et al. (1977).

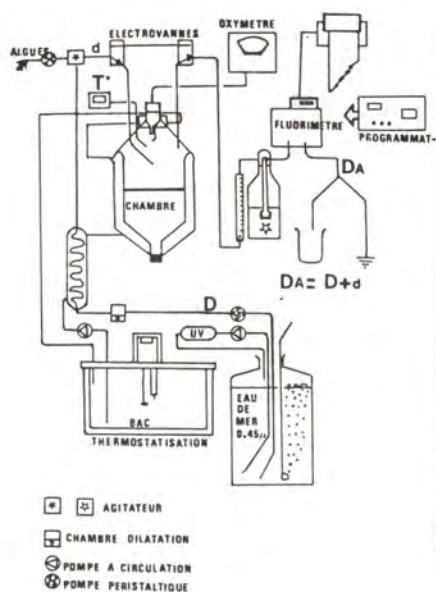


FIGURE 1: Dispositif expérimental

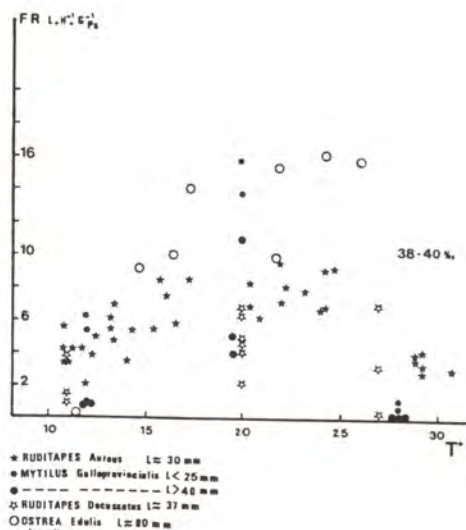


FIGURE 2: Evolution du taux de filtration en l.h-1.g-1 de poids sec pour quelques espèces méditerranéennes en fonction de la température.

Le principe en est simple : il s'agit de mesurer la densité des particules inertes ou vivantes à l'entrée et à la sortie d'une chambre où sont placés les animaux à tester. Cette méthode pallie aux inconvénients du confinement et permet des expériences d'assez longue durée, d'où une meilleure adaptation avant une mesure ponctuelle.

#### Description de l'appareillage (Fig. 1)

La chambre de mesure thermostatée est traversée par de l'eau de mer filtrée à 0,45 µm à la même température et à la même salinité que celle du bac de maintenance des animaux avant l'expérience.

La température est régulée grâce à un circuit secondaire de thermostatisation. L'oxygénation est maintenue à un taux de saturation supérieur à 95 % par bullage permanent dans la cuve de réserve d'eau de mer vieillie, stabilisée bactériologiquement (Mengus, 1978). A ce système est adjoint une pompe de circulation qui fait passer continuellement l'eau de la réserve devant une lampe à ultra-violet.

Sur le couvercle de la chambre est adaptée une sonde à oxygène Orbisphère couplée à un agitateur rotatif qui assure le renouvellement de l'eau devant la membrane et homogénéise l'ensemble du volume de la chambre. L'efficacité de cette agitation a été vérifiée à l'aide d'un colorant, ainsi l'animal se trouve dans un milieu homogène quelle que soit sa position dans la chambre.

Une suspension algale, obtenue par dilution d'une culture en phase de croissance, est prélevée grâce à une pompe péristaltique et injectée dans le flux entrant. Les flux entrant et sortant sont homogénéisés par brassage à l'aide d'agitateurs magnétiques (Fig. 1). On estime la concentration cellulaire dans



le courant d'eau à l'aide d'un fluorimètre Turner en flux continu. Celui-ci est étalonné grâce à un compteur de particules "Coulter Counter" permettant de calculer le nombre de cellules par ml.

Cet étalonnage permet d'obtenir un enregistrement graphique continu, la hauteur du tracé donné par le fluorimètre étant proportionnelle au nombre de cellules algales. La concentration cellulaire dans le flux entrant est constante et le système atteint un état d'équilibre marqué par un plateau du graphique.

Deux électrovannes permettent soit de faire circuler l'eau de la chambre, soit d'isoler celle-ci, le flux est alors direct. Lorsque le courant d'eau passe par la chambre en l'absence de bivalve, la concentration cellulaire du flux sortant atteint un nouvel état d'équilibre dont le plateau est identique à celui observé en flux direct.

En présence d'organismes filtreurs, si la rétention des cellules est constante dans le temps, le plateau reflétant la concentration cellulaire se situe à un niveau inférieur à celui du flux direct. La différence entre ces deux états d'équilibre fournit une estimation du nombre de cellules algales retenues par les organismes filtreurs.

#### Protocole expérimental

De manière à aborder une étude comparative du taux de filtration à différentes températures, il était indispensable de fixer certaines caractéristiques du système, afin d'expérimenter à chaque fois dans les mêmes conditions. Ainsi, le débit théorique du flux entrant d'eau de mer a été fixé à  $40 \pm 2 \text{ ml.m}^{-1}$ . Cette valeur tient compte des taux de filtration mesurés par d'autres auteurs de façon à rester légèrement supérieur aux taux de filtration moyens.

La souche algale sélectionnée est le *Tetraselmis suecica* dont les tailles des cellules sont comprises entre 6,5 et 11,5  $\mu\text{m}$  avec un mode de 8-9  $\mu\text{m}$ . Ceci garantit, d'après les observations faites sur *M. edulis*, une rétention pratiquement à 100 % si l'on se réfère aux travaux de Vahl (1972) et de Møhlenberg et Riisgard (1978).

Au départ, en fonction des données de la littérature, nous avons souhaité avoir, dans la chambre expérimentale, autour du bivalve testé, une concentration algale comprise entre  $10$  et  $13,5 \times 10^6$  cellules par litre.

En fonction du volume de la chambre de mesure et en partant d'une concentration cellulaire  $C^0$  dans la culture, il s'agit de connaître le rapport de dilution  $C^0/C_1$  pour obtenir  $C_1$  la concentration souhaitée à l'entrée de la chambre de mesure. La quantité d'algues à injecter dans le circuit est déterminée d'une manière théorique par la relation suivante  $C_0 = DA.C_1/d$ , avec  $DA = D + d$ ,  $D$  est le débit d'eau de mer,  $d$  celui de la culture algale diluée,  $C_1$  est fixé entre 1,2 et  $1,5 \cdot 10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

A signaler que toutes les expériences se sont déroulées dans la même marge horaire afin d'éliminer l'influence d'éventuels rythmes circadiens dans les valeurs du taux de filtration. A noter que de telles fluctuations connues chez certains bivalves n'ont pas été mises en évidence chez *M. galloprovincialis*.

#### Etude de la consommation d'oxygène

Le dispositif expérimental tel qu'il est décrit permet la mesure de la consommation d'oxygène en isolant la chambre de mesure pendant un certain temps par le jeu des électrovannes. Ceci a été réalisé pour *Ruditapes aureus* et permet



de mesurer le métabolisme de routine. Cependant, ce système ne fournit que des mesures individuelles. Aussi, dans le but d'obtenir un grand nombre de valeurs sur une gamme de tailles aussi large que possible, la majeure partie des études sur la respiration et l'excrétion ont été entreprises par la méthode classique en flacon D.B.O. (Ansell, 1973). Chaque individu est placé dans un flacon rempli d'eau de mer filtrée saturée en oxygène et portée à la température expérimentale. Seuls sont pris en compte les animaux dont les valves sont bien ouvertes car de nombreux bivalves peuvent avoir un métabolisme anaérobie (de Zwaan et Wijsman, 1976) en maintenant leurs valves closes. Ce phénomène ne peut pas être pris en compte dans nos mesures de consommation d'oxygène et peut induire de fortes différences (McLusky et Stirling, 1975).

La durée des incubations est fonction de la température, mais dépend également de la tension en oxygène dissous. En effet, dans des conditions hypoxiques, certaines espèces modifient leur métabolisme respiratoire pour s'adapter aux faibles teneurs d'oxygène. Ces espèces sont définies comme des organismes oxy-régulateurs Van Winkle et Mangum (1975), McMahon et Wilson (1981), Shumway (1982).

Pour pallier à cet inconvénient, la durée de l'expérience est choisie de manière à ce que la consommation ne dépasse pas 30 % de l'oxygène initialement présent.

Les concentrations en oxygène dissous sont déterminées selon la méthode polarographique à l'aide d'une électrode de Clarke pourvue d'un agitateur (Sonde orbisphère modèle oxygenindicator 2603). L'étalonnage en fonction de la pression atmosphérique est réalisé avant chaque série de mesures. L'évaluation de la consommation d'oxygène de chaque individu est obtenue par comparaison entre trois flacons témoins placés dans les mêmes conditions de température et la diminution de la teneur en oxygène pendant la durée de l'incubation du bivalve.

#### Etude de l'excrétion

D'une manière générale, on considère que l'essentiel de l'excrétion azotée se fait sous forme d'azote ammoniacale ( $N-NH_4$ ) chez ces bivalves immergés en permanence.

Nous n'avons donc pris en compte que cette forme d'excrétion azotée.

Le protocole expérimental est le même que celui utilisé pour les mesures de la consommation d'oxygène. Une attention particulière est portée au rinçage des flacons lors de séries de mesures successives.

Les dosages sont réalisés selon la technique de Treguer et Le Corre (1975) sur une chaîne d'analyse Technicon.

## R E S U L T A T S

### Taux de filtration

Dans cette première démarche, compte tenu des résultats disponibles dans la littérature, nous avons fixé le débit de l'eau circulant dans la chambre d'expérience et la concentration en cellules algales. Nous avons ensuite considéré comme taux de filtration la quantité d'eau épurée en totalité de ses cellules en suspension, par unité de temps.

Les mesures ont été réalisées sur 4 espèces et, pour M. galloprovincialis,

sur deux lots de tailles différentes respectivement inférieures à 25 mm et supérieures à 40 mm.

Dans un dispositif expérimental à flux continu, le taux de filtration FR peut être calculé selon diverses formules. Nous avons retenu celle proposée par Hildreth et Crisp (1976):

$$FR = DA (C_1 - C_2) / C_2$$

dans laquelle DA exprimé en  $l.h^{-1}$  correspond au débit total du flux traversant le système,  $C_1$  à la concentration initiale en particules du flux entrant et  $C_2$  à celle du flux à la sortie.

Ceci suppose que l'animal testé baigne dans un milieu où la concentration en particules est homogène.

Les résultats individuels sont exprimés en litre par heure et par gramme de poids de tissus secs ; ils sont regroupés dans la figure 2.

Dans l'ensemble, les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celles disponibles dans la littérature sauf pour *M. galloprovincialis* et *Ostrea edulis* qui présentent des taux de filtration au-dessus des valeurs moyennes généralement observées sur *M. edulis*. Cependant, Winter (1976) donne des valeurs comparables et même plus élevées pour de très jeunes moules de 5 à 50 mg.

Il convient de signaler qu'il existe une grande variabilité dans les réponses individuelles des bivalves. Notamment l'influence du bruit et de l'éclairage sur le comportement des huîtres et des moules est importante au point d'obtenir une fermeture complète des valves pendant plusieurs heures chez *O. edulis*.

Chez *M. galloprovincialis*, les petits individus ont un taux de filtration plus important que celui des grands individus.

L'influence de la température est assez bien marquée avec un optimum du taux de filtration très net à 20°C de  $12,72 \pm 3,76 l.h^{-1}.g^{-1}$ . A 28°C, on observe pratiquement un arrêt de la filtration.

A 12°C, le taux de filtration varie de  $7,21 \pm 2,17 l.h^{-1}.g^{-1}$  chez les jeunes individus à  $1,09 l.h^{-1}.g^{-1}$  chez les grands individus.

Chez *O. edulis*, nous avons obtenu peu de points car cette espèce présente quelques difficultés à être manipulée compte tenu de sa tendance à fermer ses valves à la moindre perturbation. Ceci fait qu'aux basses températures entre 10 et 12°C, l'activité valvaire est pratiquement nulle.

Par contre, entre 20 et 28°C, la filtration est importante avec un taux de  $14,38 \pm 3,06 l.h^{-1}.g^{-1}$ .

Chez *R. aureus*, le taux de filtration augmente régulièrement de 10°C ( $4,79 l.h^{-1}.g^{-1}$ ) jusqu'à un plateau situé entre 20 et 25°C avec respectivement des valeurs de  $7,42 \pm 0,66$  et  $8,31 \pm 2,51 l.h^{-1}.g^{-1}$  pour redescendre à 30°C à une valeur de  $3,43 l.h^{-1}.g^{-1}$ .

Chez *R. decussatus*, la filtration est nettement moins importante avec des taux de filtration variant de  $2,12 \pm 1,55$  à 12°C,  $3,8 \pm 1,49$  à 20°C et  $3,54 \pm 2,88 l.h^{-1}.g^{-1}$  à 27°C. La différence d'activité de filtration entre les deux espèces est dans un rapport de 2 pour les températures inférieures à 25°C. *R. aureus* paraît plus eurytherme que *R. decussatus*.



TABLEAU I

Relations entre la Respiration et le Poids sec ( $\text{ml/h}^{-1}$  et g en métabolisme standard)

Espèces	Gamme de poids	n	S %	T°	R = $aw^b$	r	$\frac{p}{>0.01}$	Auteurs
<i>Ruditapes decussatus</i>	0.005-0.32	30	39	25	0.208 $w^{0.593}$	0.82	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.06 -0.15	12	39	10	0.219 $w^{1.204}$	0.88	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.17	25	39	15	0.109 $w^{0.623}$	0.70	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.18	14	39	20	0.225 $w^{0.740}$	0.87	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.12	17	39	25	0.538 $w^{0.819}$	0.78	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.14	16	39	30	0.692 $w^{0.805}$	0.91	*	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0.08 -1.4	20	39	17	0.205 $w^{0.407}$	0.78	*	
-----								
<i>Mytilus edulis</i>	0.11-1.68	24	16	16	0.698 $w^{0.660}$			Rotthauwe (1958)
<i>Mytilus edulis</i>	0.20-4.00	25	16	12	0.559 $w^{0.595}$			Read (1962)
<i>Mytilus edulis</i>	0.07-3.00	44	16	15	0.263 $w^{0.724}$	(hiver)		Bayne et al. (1973)
<i>Mytilus edulis</i>	0.07-3.00	42	16	15	0.164 $w^{0.670}$	(été)		Bayne et al. (1973)

TABLEAU II

Relations entre le taux d'excrétion d'azote ammoniacal et le Poids sec ( $\text{mg.h}^{-1}$  et g en métabolisme standard)

Espèces	Gamme de poids	n	S %	T°	E = $aw^b$	r	$\frac{p}{>0.05}$	
<i>Ruditapes decussatus</i>	0.005-0.32	22	39	25	0.011 $w^{0.761}$	0.71	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.06 -0.15	13	39	10	0.005 $w^{1.196}$	0.74	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.17	23	39	15	0.012 $w^{0.841}$	0.50	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.18	13	39	20	0.020 $w^{1.068}$	0.30	-	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.12	15	39	25	0.046 $w^{0.909}$	0.77	*	
<i>Ruditapes aureus</i>	0.07 -0.14	14	39	30	0.056 $w^{0.685}$	0.88	*	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0.08 -1.4	15	39	17	0.058 $w^{1.091}$	0.84	*	



### Consommation d'oxygène

Les mesures sur la consommation d'oxygène ont été faites de préférence le matin pour éviter l'interférence de variations circadiennes. En effet, quelques essais de mesures réalisées en continu pendant des cycles de 24 heures sur le dispositif expérimental ont montré, chez R. decussatus, un cycle dans la consommation d'oxygène. Ce cycle se caractérise par un maximum de consommation entre 10 et 15 heures et un minimum nocturne, ceci aussi bien à 12°C qu'à 20°C.

La consommation d'oxygène a été mesurée successivement en fonction de la taille des individus, de la température et de la salinité.

Le tableau I regroupe un certain nombre de résultats obtenus chez R. decussatus, R. aureus et M. galloprovincialis. A titre de comparaison sont reportées des valeurs tirées de la littérature et concernant M. edulis.

Nous avons choisi, à la suite de nombreux auteurs, de présenter les résultats sous la forme de la relation allométrique existant entre la consommation d'oxygène (R) et le poids sec des tissus (W). Les termes de cette relation ont été largement revus et discutés par Ansell (1973) et Bayne et al. (1976 a).

Les valeurs du coefficient b sont dans la gamme de celles connues pour les bivalves.

Tous les coefficients de corrélation correspondant à la régression poids sec en g. sur consommation d'oxygène en ml.h<sup>-1</sup> sont significativement différents de zéro au seuil de 1 %.

Il convient de signaler, pour R. aureus, un coefficient de corrélation faible malgré un nombre d'expériences et d'individus testés important, à 15°C.

Chez cette espèce, la consommation la plus élevée par unité de poids est située entre 15 et 20°C correspondant aux plus petits coefficients b.

La figure 3 présente la consommation d'oxygène par unité de poids. Nous avons regroupé toutes les mesures faites à chaque température. D'autre part, une analyse de covariance (Snedecor et Cochran, 1977) effectuée sur les logarithmes des données permet de dire que les valeurs du coefficient b ne sont pas significativement différentes de 0,8 au seuil de 5 % quelles que soient l'espèce et les températures, dans la gamme expérimentale considérée. Ceci permet de présenter les résultats sous la forme  $R/W^{0,8} = a$ .

La figure 3 regroupe donc les valeurs moyennes et les intervalles de confiance correspondants aux différentes espèces et aux différentes températures. La respiration est exprimée en  $\mu\text{g.h}^{-1}$  et le poids en mg de poids sec libre de cendre.

Pour M. galloprovincialis, deux lots d'individus de tailles respectivement inférieures à 25 mm et supérieures à 40 mm ont été testés. Les valeurs obtenues n'étant pas significativement différentes, elles ont été regroupées et la moyenne correspond à l'ensemble des données.

Il ressort que le métabolisme de M. galloprovincialis est plus élevé que celui des palourdes. Le métabolisme de ces dernières évolue parallèlement avec un avantage à R. aureus. Cette espèce semble mieux adaptée aux températures élevées puisqu'à 30°C la consommation d'oxygène augmente encore alors qu'elle fléchit nettement pour R. decussatus. Le même phénomène a été observé avec une

ampleur encore plus grande chez R. philippinarum (Bodoy et Riva, résultats non publiés).

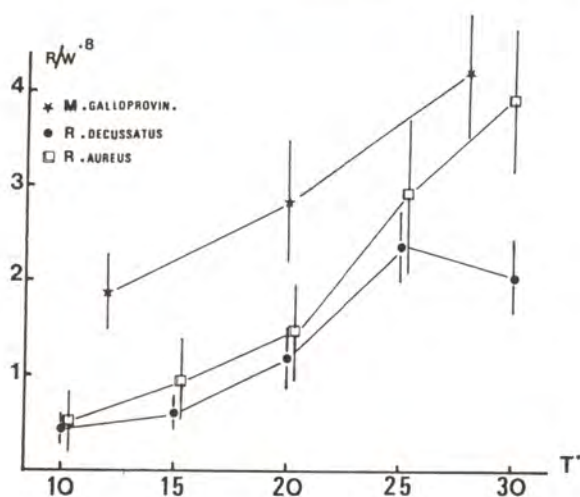


FIGURE 3: Evolution du rapport  $R/W^{0.8}$  en fonction de la température.

Pour l'espèce R. aureus, la consommation d'oxygène en métabolisme de routine a été suivie dans la chambre de mesure du dispositif expérimental en présence d'algues en suspension. L'évolution des rapports  $R/W^{0.8}$  en métabolisme standard et en métabolisme de routine est donnée dans la figure 4.

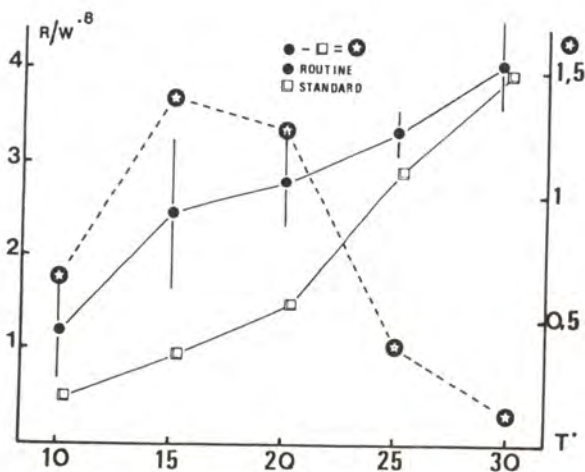


FIGURE 4: Rapport  $R/W^{0.8}$  en fonction de la température pour R. aureus en métabolisme standard et de routine. (champ d'activité = routine - standard)

La différence entre ces deux types de métabolisme permet de définir le "champ d'activité" (Scope for activity, selon Fry, 1947). Cet indice permet de se faire une idée de l'énergie disponible pour le déroulement des processus physiologiques liés à la production.

La courbe obtenue montre une augmentation du champ d'activité jusqu'à un plateau entre 15-20°C, puis une chute rapide avec l'augmentation de la température.

Selon Fry, le point le plus haut marquerait l'optimum physiologique de l'espèce en fonction de la température du milieu. Pour *R. aureus*, il se situerait donc entre 15 et 20°C.

Chez *M. galloprovincialis*, l'influence combinée de la température et de la salinité sur la consommation d'oxygène ont été expérimentées en utilisant trois températures (12, 20 et 28°C) et trois salinités (20, 30 et 38 ‰). Deux lots de moules de tailles différentes respectivement de tailles inférieures à 25 mm et de tailles supérieures à 40 mm ont été testés. Toutefois, devant la cohésion des résultats, les moyennes des mesures n'étant pas significativement différentes, l'ensemble des résultats a été regroupé. Ils sont présentés dans le tableau III.

TABLEAU III - Evolution du rapport  $R/W^{0,8}$  en  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , en fonction de la température et de la salinité (S‰) chez *M. galloprovincialis*.

S ‰	12°			20°			28°		
	$\bar{x}$	$\pm$ SD	n	$\bar{x}$	$\pm$ SD	n	$\bar{x}$	$\pm$ SD	n
38 ‰	1.89	0.38	21	2.84	1.21	14	4.19	1.22	21
30 ‰	1.66	0.67	17	4.93	0.68	14	4.28	1.56	12
20 ‰	1.48	0.45	14	4.84	1.35	23	3.34	1.33	21

Des analyses de corrélation ont été établies entre l'ensemble des valeurs pour chaque salinité à une température donnée et, pour chaque température, à une salinité donnée (Tableau IV).

TABLEAU IV - Analyse des corrélations entre le rapport  $R/W^{0,8}$  et la salinité en fonction de la température (A) et la température en fonction de la salinité (B) chez *M. galloprovincialis*. n nombre de mesures, r coefficient de corrélation, N.S. non significatif, \* significatif, t°C température, S‰ salinité.

A	t°C	r	n	P>0,05
	12	- 0,218	52	N.S.
	20	- 0,416	52	*
	28	- 0,151	46	N.S.
B	S‰	r	n	P>0,05
	20	0,304	55	*
	30	0,420	47	*
	38	0,612	51	*



L'influence de la salinité sur la respiration ne se fait sentir de façon significative qu'à 20°C. Elle se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène en fonction de l'abaissement de la salinité. L'effet de la température est significatif quelle que soit la salinité, l'accroissement de la température entraînant une augmentation de la consommation d'oxygène dans la gamme de température considérée.

#### Excrétion d'azote ammoniacale

Les résultats sont présentés de la même manière que pour la consommation d'oxygène en partant de la relation allométrique  $E = aW^b$  dans laquelle E représente l'excrétion en  $mg.h^{-1}$  et W le poids sec des tissus en g (Tableau II).

Les coefficients de corrélation sont significativement différents de zéro au seuil de 5 % excepté pour R. aureus à la température de 20°C.

Au niveau de l'excrétion d'azote ammoniacale, la réponse physiologique à une élévation de la température est sensiblement différente de celle de la consommation d'oxygène. Il semble que, pour une espèce donnée, la réponse physiologique lors d'une mesure du métabolisme standard, en condition de jeûne, dépende de l'état du cycle biologique et de la nature des réserves biochimiques disponibles. Ceci implique une grande influence du passé nutritionnel récent de l'individu sur la réponse physiologique et l'excrétion en particulier (Baghdigian et Riva, 1984).

Pour M. galloprovincialis, l'évolution du rapport  $E/W^{0,8}$  a été suivie en fonction de la température et de la salinité. Ces expériences ont été conduites en parallèle avec celles sur la consommation d'oxygène.

Les résultats du Tableau V regroupe les données obtenues sur les deux lots de tailles.

TABLEAU V - Evolution du rapport  $E/W^{0,8}$  en  $\mu g.h^{-1}.mg^{-1}$ , en fonction de la température et de la salinité (‰) chez M. galloprovincialis.

S ‰	12°			20°			28°		
	$\bar{x}$	$\pm$ SD	n	$\bar{x}$	$\pm$ SD	n	$\bar{x}$	$\pm$ SD	n
38 ‰	0.38	0.14	21	0.37	0.18	14	1.07	0.33	21
30 ‰	0.39	0.14	17	0.86	0.33	14	0.81	0.24	12
20 ‰	0.49	0.13	14	1.61	0.33	23	0.86	0.39	21

Les analyses de corrélation en fonction des deux paramètres ont donné les résultats regroupés dans le tableau VI.

Il apparaît qu'à une température élevée de 28°C la corrélation n'est plus significative quelle que soit la salinité, alors qu'à 12 et 20°C, une dessalure entraîne une augmentation du taux d'excrétion. De même, à une salinité de 20‰, l'effet de la température n'est plus corrélé avec l'excrétion, alors qu'à 30 et 38‰ l'augmentation de la température entraîne une élévation du taux d'excrétion.

TABLEAU VI - Analyse des corrélations entre le rapport  $E/W^{0,8}$  et la salinité en fonction de la température (A) et de la température en fonction de la salinité (B) chez *M. galloprovincialis*. n nombre de mesures, r coefficient de corrélation, N.S. non significatif, \* significatif, t°C température, S‰ salinité.

A	t °C	r	n	P>0,05
	12	- 0,346	52	*
	20	- 0,866	52	*
	28	- 0,007	46	N.S.
B	S‰	r	n	P>0,05
	20	0,143	55	N.S.
	30	0,680	47	*
	38	0,615	51	*

## DISCUSSION

Il convient de rappeler que nous n'avons pas recherché, dans cette démarche écophysiological, l'étude fondamentale des phénomènes. C'est pourquoi nous avons considéré des températures et des salinités dans une gamme correspondant à celle du milieu marin côtier, sans aborder ce qui se passe dans des conditions extrêmes. Il s'agissait avant tout de tester des techniques permettant de se faire une idée de la part d'énergie liée au métabolisme, dans le but de dresser des bilans énergétiques au niveau de populations de bivalves.

En ce qui concerne le taux de filtration, il apparaît que les espèces sessiles épigées telles *M. galloprovincialis* et *O. edulis* sont beaucoup plus actives que les espèces endogées telles *R. aureus* et *R. decussatus*. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Forster-Smith (1975) dans sa comparaison entre *M. edulis* et *Venerupis pullastra*.

On peut penser que les premières filtrant en pleine eau traitent une eau beaucoup moins chargée en matériel particulaire que les secondes qui filtrent l'eau à l'interface eau/sédiment. Rappelons à ce sujet que la part du microphytobenthos dans l'alimentation des palourdes a été montrée par Plante-Cuny (1981). Il est certain que la charge particulaire peut compenser un faible taux de filtration, au niveau de la ration alimentaire.

Si l'on considère les fortes valeurs du taux de filtration de *M. galloprovincialis* et de *O. edulis*, on peut se demander si le dispositif expérimental intervient pour une part. Il serait souhaitable d'établir une intercalibration avec d'autres dispositifs expérimentaux. Il paraît plus vraisemblable d'invoquer un léger artéfact lié au fait que notre méthode surévalue légèrement la détermination du taux de filtration, en ce sens que les animaux sont à jeun pendant la phase d'acclimatation à la température expérimentale. Toutefois, il convient de rappeler que les mesures des taux de filtration ne sont faites qu'après un certain temps, lorsque l'on observe une stabilisation des valeurs de la concentration  $C_2$  à la sortie du dispositif.

Par ailleurs, comme le signalent Bayne et al. (1976a), il faut considérer que de nombreuses méthodes directes ou méthodes indirectes en milieu statique sous-estiment les taux de pompage et les taux de filtration, par rapport à la méthode indirecte en système ouvert à flux continu. Seuls les systèmes clos à circulation entretenue par une pompe, dans lesquels la concentration particulaire est maintenue constante par un apport de particules (Winter, 1973 ; Riisgard et Møhlenberg, 1979 ; Fiala-Médioni, 1973) donnent des résultats comparables à ceux obtenus avec un circuit ouvert.

Il faut rester prudent dans la comparaison des résultats en raison de nombreux facteurs intervenant au niveau des conditions d'expérience. Nous ne citerons



que la vitesse d'écoulement de l'eau, la quantité de cellules ou de matériel particulaire par litre, Widdows et Bayne (1971), Forster-Smith (1975), Riisgard et Randløv (1981), et enfin la taille des cellules, comme le souligne Fiala-Médioni (1979).

Compte tenu du fait qu'il est admis, d'après les travaux de Rao (1953), que pour une espèce donnée le taux de filtration est d'autant plus élevé que la latitude de la population est grande, il serait intéressant de comparer le taux de filtration des M. galloprovincialis de la côte atlantique à celui des populations méditerranéennes.

En ce qui concerne M. galloprovincialis, on observe une différence sensible entre le taux de filtration des jeunes individus de moins de 25 mm et ceux d'une taille supérieure à 40 mm. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lubet et Chappuis (1966) qui constatent une diminution du taux de filtration chez les individus d'une taille supérieure à 30 mm.

Si l'on considère l'influence des conditions du milieu sur le taux de filtration de M. galloprovincialis, il convient de souligner deux faits. D'une part, la température de 28°C semble constituer une limite pour l'activité de filtration. Ceci est en accord avec les observations de Massé et Parache (1984) sur la tolérance thermique de cette espèce. Ces auteurs ont déterminé une température létale moyenne comprise entre 29 et 31°C et une température limite moyenne comprise entre 28 et 29,5°C pour la sécrétion du byssus.

Ces différentes valeurs sont légèrement supérieures (environ 2°C) de celles données pour M. edulis.

D'autre part, pour une salinité de 20 ‰, il semble également que l'on observe des perturbations au niveau de la filtration, de la respiration et de l'excrétion. Ces observations sont en accord avec celles de Bouxin (1931), Mars (1960), Lubet et Chappuis (1966). On peut considérer que M. galloprovincialis est moins euryhaline que M. edulis surtout pour les faibles valeurs de la salinité.

En ce qui concerne la respiration, il existe dans la littérature de très nombreuses données sur les bivalves. Il faut considérer que le fonctionnement du système de renouvellement de l'eau qui assure à la fois l'approvisionnement en oxygène et la ration alimentaire consomme une grande partie de l'oxygène disponible. Il existe donc pour chaque espèce un équilibre et une limite correspondant à son adaptation physiologique en fonction des conditions du milieu.

Parmi les facteurs les plus étudiés jouant un rôle important dans la consommation d'oxygène, on peut citer la taille des individus, la température, la salinité, mais également la tension partielle de l'oxygène dissous dans l'eau, la quantité de nourriture disponible dans l'eau qui influence directement le taux de pompage et de filtration, et enfin, d'une manière générale, tous les stress environnementaux liés ou non à la pollution qui peuvent entraîner, à la limite, une fermeture des valves et le passage à un métabolisme anaérobie.

Au niveau de l'influence de la taille, il existe une littérature considérable et les résultats sont souvent présentés selon la relation d'allométrie  $R = a W^b$ . Pour les moules, Bayne et al. (1976 b) ont regroupé un grand nombre de mesures d'où il ressort qu'il existe peu de variations dans les valeurs du coefficient b. On peut considérer que la valeur moyenne de 0,8 est une bonne estimation (Krüger, 1960). Il devient ainsi commode d'exprimer, à des fins de comparaison, les taux de respiration sous la forme  $R/W^{0,8}$ , W correspondant au poids sec du tissu.

Si l'on considère les bivalves appartenant à différentes familles, la valeur de 0,7 a été avancée par Ansell (1973).

Les valeurs de la constante a sont beaucoup plus variables. Elles correspondent à une réponse aussi bien spécifique qu'individuelle aux conditions écologiques du milieu ou aux conditions expérimentales.



Nous ne reprendrons pas ici les discussions sur les différentes valeurs des constantes a et b ; nous renvoyons à Ansell (1973) et Bayne et al. (1976 b). Il est intéressant de noter les valeurs relativement élevées du taux de consommation d'oxygène de M. galloprovincialis par rapport à M. edulis. Ceci ajouté au taux de filtration élevé de M. galloprovincialis semble indiquer un métabolisme supérieur à celui de M. edulis chez les individus de cette espèce provenant d'une population méditerranéenne. Ces deux espèces sont très proches et souvent les individus des populations septentrionales ont un métabolisme comparativement plus élevé que ceux des populations méridionales comme l'ont montré Macé et Ansell (1982) pour le taux de consommation d'oxygène du gastéropode Polinices alderi. Il semble donc intéressant de voir, lors de l'établissement de bilans énergétiques chez M. galloprovincialis, si ce taux de filtration et de respiration élevé constitue un avantage au niveau de l'énergie disponible pour la production de tissus et de gamètes.

En ce qui concerne l'influence de la température et de la salinité sur la consommation d'oxygène, il convient de souligner qu'à 28°C il n'existe pas de relation entre la consommation d'oxygène et la salinité. Ceci ne semble pas surprenant dans la mesure où la température de 28°C peut être considérée, à long terme, comme sub-léthale (Massé et Parache, 1984). Par contre, la température de 12°C est couramment supportée en hiver dans les conditions de mer ouverte qui sont celles du site d'où proviennent les M. galloprovincialis testées. Par ailleurs, dans les étangs méditerranéens, l'espèce supporte chaque hiver des conditions proches des conditions septentrionales avec des températures pouvant atteindre 5°C (Hamon, 1983). Il est donc plus surprenant de ne pas obtenir de corrélation entre la salinité et le taux de consommation d'oxygène de M. galloprovincialis à 12°C.

En ce qui concerne l'excrétion, il existe moins d'informations sur l'excrétion azotée que sur la respiration. Dans cette approche préliminaire, nous avons considéré seulement l'azote ammoniacal considéré comme le mode d'excrétion principal chez les bivalves subtidiaux par rapport à l'azote lié à l'urée ou à l'acide urique.

Toutefois, il apparaît que l'importance de l'azote lié aux acides aminés est loin d'être négligeable puisqu'il peut représenter entre 5 et 55 % de l'azote total excrété selon Bayne et al. (1976 b). Il conviendra donc de prendre en compte cette forme de l'excrétion dans un bilan énergétique.

Il est connu que le taux d'excrétion peut varier de manière importante en fonction des conditions saisonnières du milieu et spécialement sous l'effet de stress (température, salinité, jeûne, etc ...).

D'une manière générale, le taux d'excrétion de l'azote ammoniacal augmente avec la température et avec l'abaissement de la salinité chez M. edulis (Bayne et al., 1976 b).

Les résultats obtenus chez M. galloprovincialis confirment ces données ; toutefois, à 28°C, l'influence des variations de salinité n'est pas significative et de même, à la salinité de 20 ‰, l'influence des variations de la température ne montre pas de corrélation significative. Ceci confirme ce que nous avons constaté au niveau du taux de filtration et de celui de la consommation d'oxygène. La température de 28°C et la salinité de 20 ‰ constituent des limites écologiques ultimes pour M. galloprovincialis.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier MM. A. Bodoy, R. Bador, M. Sacher et S. Baghdiguian pour leur participation à la mise au point du dispositif expérimental et à l'acquisition des données, ainsi que Mesdames A.M. Macé et B. Tanguy. Ce travail a été réalisé dans le cadre des contrats de la D.E.S.T.I. N° 82/P0037 et 82/P0038, au titre de son Action en Conchyliculture .

- 
- Amouroux J.M., 1982 - Utilisation d'une suspension monospécifique d'algues par Venus verrucosa (Bivalve) en milieu confiné. Malacologia, 22, p.659-666.
- Ansell A.D., 1973 - Oxygen consumption by the bivalve Donax vittatus (Da Costa). J. exp. mar. Biol. Ecol., 11, p. 311-328.
- Baghdiguian S., Riva A., 1983 - Etude écophysiological chez la palourde Venerupis decussata au cours d'un jeûne prolongé. Haliotis, 14 (sous presse).
- Bayne B.L., 1976 - Ed. Marine mussels their ecology and physiology. Cambridge University Press 506 p.
- Bayne B.L., Thompson R.J., Widdows J., 1976<sup>a</sup> - Physiology I p. 121-206. In : Marine Mussels, their ecology and physiology. Bayne B.L. (Ed.) Cambridge University Press 506 p.
- Bayne B.L., Widdows J., Thompson R.J., 1976<sup>b</sup> - Physiology II p. 207-260. In : Marine Mussels, their ecology and physiology. Bayne B.L. (Ed.) Cambridge University Press 506 p.
- Bayne B.L., Widdows J., NEWELL R.I.E., 1977 - Physiological measurements on estuarine bivalve Molluscs in the field, p. 57-68. In : Biology of benthic organisms (ed. B.F. Keegan, P.O. Ceidigh and P.J.S. Boaden). Pergamon Press, Oxford 630 p.
- Bouxin H., 1931 - Influence des variations rapides de la salinité sur la consommation d'oxygène chez Mytilus edulis var. galloprovincialis (Lmk). Bull. Inst. Oceanogr. Paris, 565, p. 1-11.
- Fiala-Medioni A., 1973 - Ethologie alimentaire d'Invertébrés benthiques filtreurs (Ascidies). I. Dispositif expérimental. Taux de filtration et de digestion chez Phallusia mammillata. Mar. Biol., 45, p. 137-145.
- Fiala-Medioni A., 1979 - Influence de la concentration algale du milieu sur le pompage, la filtration et l'absorption de Phallusia mammillata (Cuvier, 1815) (Ascidie simple). Ann. Inst. Oceanogr., 55 (2), p. 155-162.
- Fiala-Medioni A., Copello M., 1984 - Relations trophiques entre huître et milieu, influence de la concentration de la taille et de la nature des particules. (Ce volume).
- Forster-Smith, R.L., 1975 - The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for Mytilus edulis L., Cerastoderma edule (L) and Venerupis pullastra (Montagu). J. exp. mar. Biol. Ecol., 17, p. 1-22.



- Fry F.E.J., 1947 - Effects of environment on animal activity. Univ. Toronto Stud. Biol. 55, p. 1-62. The University Toronto Press.
- Hamon P.Y., 1983 - Croissance de la moule Mytilus galloprovincialis (Lmk) dans l'étang de Thau. Estimation des stocks de Mollusques en élevage. Thèse d'Etat, U.S.T.L. Montpellier, 331 p.
- Hildreth D.I., Crisp D.J., 1976 - A corrected formula for calculation of filtration rate of bivalve molluscs in an experimental flowing system. J. mar. biol. Ass. U.K. 56, 111-120.
- Jorgensen L.B., 1966 - Biology of suspension feeding. Pergamon Press, Oxford, 357 p.
- Kjørboe T., Møhlenberg F. and Møhr O., 1980 - Feeding, particle selection and carbon absorption in Mytilus edulis in different mixtures of algae and resuspended bottom material. Ophelia, 19 (2), p. 193-205.
- Krüger F., 1960 - Zur Frage der Grössenabhängigkeit der Sauerstoffverbräuch von Mytilus edulis L. Helgölander wiss. Meeresunters., 7, p. 125-148.
- Lubet P., 1973 - Exposé synoptique des données biologiques sur la moule Mytilus galloprovincialis (Lamarck 1819). Synopsis F.A.O. sur les pêches N° 88 (SAST Moule, 3 16 (10), 028 08 pag. var.) FA.O. Rome.
- Lubet P. et Chappuis J., 1966 - Etude du débit palléal et de la filtration par une méthode directe chez Mytilus edulis et M. galloprovincialis. Bull. Soc. Linnéenne Normandie, 10, p. 210-216.
- Macé A.M. and Ansell A.D., 1982 - Respiration and nitrogen excretion of Polinices alderi (Forbes) and Polinices catena (da Costa) (Gastropoda : Naticidae). J. exp. mar. Biol. Ecol., 60, p. 275-292.
- Mars P., 1950 - Euryhalinité de quelques mollusques méditerranéens. Vie Milieu, 1, p. 441-448.
- Massé H. et Parache A., 1984 - Evolution de la tolérance thermique de Mytilus galloprovincialis Lmk en fonction des températures saisonnières ; comparaison de la sensibilité thermique d'individus provenant de populations différentes. Haliotis, 14 (sous presse).
- McLusky D., Stirling A., 1975 - The oxygen consumption and feeding of Donax incarnatus and Donax spiculum from tropical beaches. Comp. Biochem. Physiol., 51A, p. 943-947.
- Mc Mahon R.F., Wilson J.G., 1981 - Seasonal respiratory responses to temperature and hypoxia in relation to burrowing depth in three intertidal bivalves. J. therm. Biol., 6, p. 267-277.
- Mengus B., 1978 - Rôle des bactéries dans l'alimentation de larves de mollusques bivalves marins en élevages expérimentaux. Thèse 3ème Cycle, Université d'Aix-Marseille II, 156 p.



- Møhlenberg F., Riisgard H.U., 1978 - Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves. Ophelia, 17 (2), p. 239-246.
- Plante-Cuny M.R., 1981 - Consommation de diatomées par deux espèces de pélecypodes filtreurs vivant dans les sables fins marins. Cryptogamie Algologie, 2 (2), p. 147-148.
- Rao K.P., 1953 - Rate of water propulsion in Mytilus californianus as a function of latitude. Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole Mass. 104, p. 171-181.
- Riisgard H.U., Møhlenberg F., 1979 - An improved automatic recording apparatus for determining the filtration rate of Mytilus edulis as a function of size and algal concentration. Mar. Biol., 52, p. 61-67.
- Riisgard H.U., Randløv A., 1981 - Energy budgets, growth and filtration rates in Mytilus edulis at different algal concentrations. Mar. Biol., 61, p. 227-234.
- Shafee M.S., 1982 - Variations saisonnières de la consommation d'oxygène chez le pétoncle noir Chlamys varia (L.) de Lanvéoc (Rade de Brest). Oceanologica Acta, 5 (2), p. 189-197.
- Shafee M.S., Lucas A., 1982 - Variations saisonnières du bilan énergétique chez les individus d'une population de Chlamys varia (L.): Bivalvia, Pectinidae. Oceanologica Acta, 5 (3), p. 331-338.
- Shumway S.E., 1982 - Oxygen consumption in oysters : an overview. Mar. Biol. Letters, 3 p. 1-23.
- Snedecor G.W., Cochran W.G., 1956 - Statistical methods. The Iowa State University Press, 534 p.
- Treguer, Le Corre, 1975 - Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer, utilisation de l'autoanalyseur Technicon. Laboratoire Oceanographie Chimique, Univ. Bretagne Occidentale, Brest, 110 p.
- Vahl O., 1972 - Efficiency of particle retention in Mytilus edulis L. Ophelia, 10, p. 17-25.
- Vahl O., 1973 - Pumping and oxygen consumption rates of Mytilus edulis L. of different sizes. Ophelia, 12, p. 45-52.
- Van Winkle W., Mangum C., 1975 - Oxyconformers and oxyregulators : verification of an index. J. exp. mar. Biol. Ecol., 17, p. 103-110.
- Widdows J., Bayne B.L., 1971 - Temperature acclimation of Mytilus edulis, with reference to its energy budget. J. mar. biol. Assoc. U.K., 51, p. 827-843.
- Winter J.E., 1973 - The filtration rate of Mytilus edulis and its dependence on algal concentration measured by or continuous automatic recording apparatus. Mar. Biol., 22, p. 317-328.
- Winter J.E., 1976 - A critical review on some aspects of filter-feeding in Lamellibranchiate bivalves. Haliotis, 7, p. 71-87.
- Zwann (de) A., Wijsman T.C.M., 1976 - Anaerobic metabolism in bivalvia (Molluscs). Comp. Biochem. Physiol., 54 B, p. 313-324.



## LA CONCHYLICULTURE FRANÇAISE

sous la direction de L. MARTEIL

3 volumes 21 x 29,7 - 135 F.

**1ère partie** - Le milieu naturel et ses variations  
1974, 124 p., 55 fig.

**2ème partie** - Biologie de l'huître et de la moule  
1976, 200 p., 113 fig.

**3ème partie** - L'ostréiculture et la mytiliculture  
1979, 128 p., 110 fig.

La conchyliculture (l'élevage des huîtres en particulier) est une des formes les plus anciennes de l'aquaculture. Ces trois volumes traitent de l'ensemble des techniques d'élevage adaptées à la fois aux conditions naturelles du milieu et aussi à la biologie des mollusques.

## CULTURE OF BIVALVES IN FRANCE

**1** - Natural environment and its variations

**2** - Biology of the oyster and mussel

**3** - Culture of oyster and mussel

The culture of oysters and other bivalves was one of the earliest forms of aquaculture and here one can review its survey conditions of rearing techniques.

RELATIONS TROPHIQUES ENTRE HÙITRE ET MILIEU ;  
INFLUENCE DE LA CONCENTRATION ET DE LA TAILLE DES  
PARTICULES

A. FILA-MEDIONI, M. COPELLO, J.C. COLOMINES  
Laboratoire ARA 0-66650 Banyuls-sur-Mer

RESUME

Des huîtres adultes *Crassostrea gigas* ont été soumises à un régime alimentaire monospécifique (*Phaeodactylum tricorutum*) à différentes concentrations et à la température de 15°C. Les taux d'ingestion, de filtration, de biodéposition ainsi que de respiration et d'excrétion ammoniacale ont été mesurés pour chaque condition expérimentale. Toutes les réponses écophysiologicals sont fonction de la concentration en nourriture du milieu à l'exception du taux d'excrétion dissoute. Les conditions optimales de niveau trophique semblent se situer à la concentration de  $10.10^6$  cellules par litre soit 0.7 mg de matière sèche d'algues ou 161 µg de carbone organique. Des bilans énergétiques ont pu être déterminés et un phénomène de sélectivité de la taille particulaire a également été mis en évidence.

MOTS CLEFS : Huître  
Ecophysiological  
Bilan énergétique

INTRODUCTION

De par leur rôle écologique et économique important, les organismes filtreurs ont fait l'objet de nombreux travaux (voir synthèses : Jørgensen, 1966 ; Thomson & Bayne, 1974 ; Pruder et Al, 1976 ; Bayne, 1976 ; Riisgård, 1977 ; Widdows, 1978 a ; Winter, 1978 ; Fiala-Medioni, 1978, 1981 ; Møhlenberg & Riisgård 1979). Afin de comprendre leur adaptation ainsi que leur impact dans les écosystèmes naturels des études sur les paramètres écophysiologicals ont été menées expérimentalement sur de nombreuses espèces : *Mytilus edulis* (Thomson & Bayne, 1972 ; Bayne et Al., 1973 ; Thomson, 1974 ; Schulte, 1975 ; Riisgård & Randløv, 1981 ; Navarro & Winter, 1982), *Chlamis islandica* (Vahl, 1978), *Chlamis varia* (Shafee & Lucas, 1982), *Crassostrea commercialis* (Wisley & Reid, 1978, Wisley et Al, 1979), *Ostrea edulis* (Newkirk & Haley, 1982), *Crassostrea virginica* (Epifanio & Ewart, 1977), et *Crassostrea gigas* (Deslous-Paoli, 1982, Gerdes, 1983 I et II) et plusieurs modèles généraux de comportement ont été proposés (Lehman, 1976, Hughes, 1980). *Crassostrea gigas* fait depuis très longtemps l'objet d'une aquaculture intensive en plusieurs pays et plus particulièrement en France depuis 1967. Cependant, peu de données sont connues dans la littérature sur ses caractéristiques physiologiques et ses besoins énergétiques (Bernard, 1974, Deslous-Paoli, 1982, Gerdes, 1983 I et II).

Cette étude propose une approche expérimentale des réponses physiolo-



giques de cette espèce aux variations des paramètres écologiques, afin de mieux définir ses besoins énergétiques ainsi que son adaptation aux conditions écologiques des étangs méditerranéens.

#### MATERIEL ET METHODES

Les huîtres utilisées lors des expériences étaient prélevées dans l'étang de Salses-Leucate (Languedoc-Roussillon). Afin d'éviter les effets saisonniers sur les taux de croissance (Deslous-Paoli, 1982) d'excrétion (Bayne & Scullard, 1977) et sur le métabolisme basal (Vahl, 1978), tous les prélèvements ont été effectués au cours des mois de Juin et Juillet 1982 et 1983 (animaux âgés de 18 mois), époque correspondant dans le milieu d'origine à une période de croissance rapide (Deslous-Paoli, 1982).

Les animaux nettoyés de leurs épibiontes ont été soumis au laboratoire à une période d'acclimatation en eau courante aérée. Ils ont été ensuite transférés dans un aquarium de 60 litres en circuit semi-fermé, thermostaté à 15°C et maintenus en concentration algale constante. Afin d'éviter une surcharge du milieu, le nombre d'individus acclimatés ne dépassait pas les 15-20 par série d'acclimatation. Parallèlement un deuxième lot était placé dans les mêmes conditions mais sans apport de nourriture.

Le dispositif d'acclimatation en concentration algale constante est dérivé du montage expérimental de Winter (1969) et modifié par Fiala-Medioni (1974).

Les fécès étaient prélevées toutes les 24 heures, pesées après lyophilisation pour dosages du C organique au Leco et de leur contenu calorifique à la microbombe calorimétrique. Après une période d'acclimatation de 10 à 15 jours, les animaux étaient transférés dans une enceinte de 4.5 l. reliée à un montage expérimental analogue à celui utilisé en acclimatation. Dès que l'animal ouvrait les valves (1/2 à 1 h après l'introduction) la consommation d'oxygène était mesurée grâce à une sonde polarographique montée sur la chambre expérimentale et reliée à un oxymètre orbisphère. L'excrétion ammoniacale était dosée par la méthode de Koroleff à la fin de chaque expérience. Un deuxième circuit identique au premier mais sans animaux servait de témoin et permettait la correction des valeurs expérimentales.

En fin d'expérience les animaux étaient disséqués pour la détermination du poids sec des organes.

Une deuxième série d'expériences a été effectuée dans la même cellule expérimentale mais en circuit fermé pour mesurer la décroissance de la concentration algale dans de l'eau de mer filtrée à 0.45 µ et enrichie d'une suspension de *Phaeodactylum tricornutum* ( $30 \times 10^6$  cell  $\times l^{-1}$  équivalant à 2.10 mg. P.S.  $\times l^{-1}$ ). Les premiers échantillons d'eau étaient prélevés environ 1/2 h après l'introduction des animaux, quand ceux-ci avaient repris une activité normale de filtration. La densité de la suspension algale des échantillons prélevés toutes les 1/2 heures était mesurée au COULTER COUNTER et l'expérience arrêtée dès que la concentration tombait au dessous des 500.000 cell  $\times l^{-1}$  (0.035 mg P.S.).

## RESULTATS

Dans le système d'acclimatation, les taux d'ingestion ont été calculés d'après la consommation en algues enregistrée pour chaque concentration utilisée (Tableau 1).

La récolte systématique des fécès émises toutes les 24 heures a permis de calculer des valeurs de biodéposition en acclimatation. Les teneurs en C organique et les poids secs des fécès récoltés ont été comparés aux valeurs d'ingestion relatives aux 24 heures précédant la récolte des fécès afin d'établir l'efficacité d'assimilation. (Tableau 1).

Afin de comparer les résultats de taux d'ingestion, de filtration, de respiration et d'excrétion ammoniacale obtenus lors des expériences en concentration algale constante, aux poids secs des animaux (organes seuls) des régressions linéaires du type  $Y = aW^{b-1}$  ont été établies pour chaque série expérimentale (Tableau 2, Fig. 1).

Toutes les valeurs relatives à une concentration algale donnée ont été recalculées pour un exposant  $b-1$  commun de  $-0.7$  afin d'éliminer la variabilité due à la taille des animaux et de pouvoir comparer l'évolution des paramètres physiologiques aux différentes concentrations algales (Tableau 3 et 4, Fig. 2).

Les résultats des expériences en circuit fermé ont été calculés d'après la formule :

$$F = V/t \log (C_o/C_t) \quad (\text{Fuller \& Clarke, 1936 ; Nimura 1980})$$

avec :

- F = taux de filtration
- t = temps d'expériences (en minutes)
- C<sub>o</sub> = concentration algale au temps 0
- C<sub>t</sub> = concentration algale au temps t

Cette formule ne tient pas compte des variations de concentration algale dues à des raisons autres que la filtration. Des expériences témoin ont cependant montré que la concentration algale ne varie pas d'une manière significative dans les enceintes sans animaux.

Les valeurs d'ingestion et de filtration obtenues sur des temps d'une 1/2 heure avec cette méthode sont tout à fait comparables à celles obtenues dans les expériences de concentration algale constante. (Tableau 3 et figure 2).

La fourchette de taille particulièrement étendue de la culture de *Phaeodactylum tricoratum* utilisée dans cette série d'expériences (3 - 9 µm de diamètre) nous a aussi permis de mettre en évidence une filtration sélective pour *Crassostrea gigas*. Les valeurs de filtration et d'efficacité de rétention pour différentes tailles des cellules sont groupées dans le tableau 5.

Les bilans énergétiques ont été calculés d'après l'équation :

$$P + G = Ab - (R + U) \quad (\text{Warren \& Davis 1967})$$

Concentration algale			Taux d'ingestion			Taux de biodéposition		Efficacité d'absorption %	Taux d'absorption $\mu\text{gC.org.xh}^{-1}$ gPS.
Cell.x $10^6/l$	P.S. $\text{mgxl}^{-1}$	C. org. $\mu\text{gCx1}^{-1}$	Cellx $10^6\text{x1}^{-1}$	mg PSxl <sup>-1</sup>	$\mu\text{g C.org}$	mg/h	$\mu\text{gC.org.xh}^{-1}$		
0.1	0.007	0.16	2.15	0.15	34.6	0.36	10.92	68	22.89
1.0	0.07	1.61	22.9	1.60	368.7	0.654	13.47	96	353.53
10.0	0.7	16.10	55.2	3.85	888.7	0.953	131.51	85	753.99
20.0	1.4	32.20	57.4	4.02	924.1	1.416	321.90	65	602.10

Tableau 1  
Evolution des taux d'ingestion x gramme (Poids Sec d'organes) et des taux de biodéposition x gramme (Poids sec) d'organes

Concentration algales en cellules x $10^6$	Ingestion				Filtration				Respiration				Excrétion			
	a	b-1	r	n	a	b-1	r	n	a	b-1	r	n	a	b-1	r	n
0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38	-0.75	0.79	10	1.33	-0.81	-0.84	10
0.1	1.36	-0.60	-0.94	13	13.5	-0.61	-0.94	13	0.91	-0.62	0.94	15	3.31	-0.53	-0.70	15
1.0	9.55	-0.76	-0.89	20	9.55	-0.76	-0.89	20	0.92	-0.62	0.89	17	2.04	-0.61	-0.76	15
10.0	42.45	-0.64	-0.81	15	4.29	-0.61	-0.83	15	1.45	-0.62	0.72	15	2.80	-0.05	n.s.	15

Tableau 2  
Valeurs des coefficients de l'équation  $Q_x = aU^{b-1}$

Concentration des algues dans le milieu en cell. x $10^6$	Taux de filtration $l \times h^{-1} \text{ xgPS}^{-1}$	E.S. + -	Taux d'ingestion en cellules x $10^6 \text{ xh}^{-1} \text{ xg PS}^{-1}$	E.S. + -	N	Intervalle de confiance
0.10	12.26	2.39	1.26	0.24	13	0.01
1.0	10.35	1.79	10.35	1.79	20	0.01
2.5	12.37	3.79	30.94	9.44	12	0.01
7.5	6.82	2.05	51.18	16.10	12	0.01
10.5	5.76	1.70	57.60	17.20	15	0.01
12.5	4.42	1.48	55.33	18.54	10	0.01
17.5	2.82	1.55	49.40	26.39	10	0.01
22.5	2.49	0.98	56.07	22.22	10	0.01
27.5	2.10	0.98	57.90	26.50	10	0.01

Tableau 3  
Moyennes des rapports  $F^{-0.7}$  et  $I^{-0.7}$



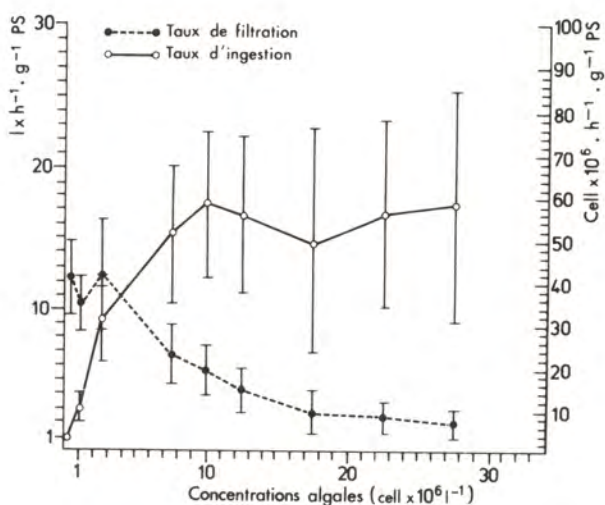


Figure 2. Evolution des taux de filtration et d'ingestion en fonction de la concentration algale

Ingestion en  $\text{cell} \times 10^6 \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  P.S. d'animaux

Filtration en  $1 \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  P.S. d'animaux

Concentrations en $\text{cell} \times 10^6$ $\times 1^{-1}$ Taille des particules	Concentrations totales des particules en $\text{cell} \times 10^6 \times 1^{-1}$						Efficacité max. de ré- tention en %
	1 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	
3 $\mu\text{m}$	2.47	2.76	1.58	0.82	0.05	0	42
3.8 $\mu\text{m}$	8.86	9.22	5.97	1.91	0.23	0.21	70
4.8 $\mu\text{m}$	8.5	13.56	12.15	7.73	3.56	0.13	74
6 $\mu\text{m}$	6.68	17.07	20.30	15.36	14.47	3.61	76
7.6 $\mu\text{m}$	2.41	7.56	21.56	21.0	35.8	18.8	100
9.6 $\mu\text{m}$	1.96	4.25	4.25	9.59	28.6	35.16	100

Tableau 5

Evolution des taux d'ingestion en fonction de la taille des particules.  
Taux d'ingestion exprimés en  $\text{cell} \times 10^6 \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  P.S. d'animaux

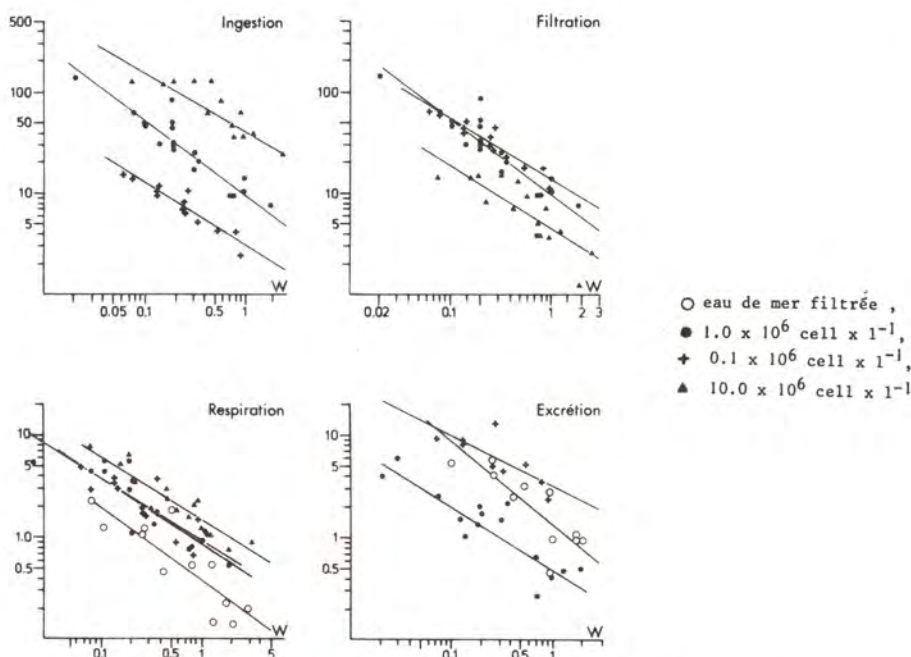


Figure 1. Droites de regression des taux d'ingestion, filtration, respiration et excrétion ammoniacale en fonction de la taille des animaux (W)

Ingestion : exprimé en  $cell \times 10^6 \times h^{-1} \times g^{-1}$  de poids sec d'animaux

Filtration : exprimé en  $l \times h^{-1} \times g^{-1}$  P.S. d'animaux

Respiration : exprimé en  $mg O_2 \times h^{-1} \times g^{-1}$  P.S. d'animaux

Excrétion : exprimé en  $\mu at. g N-NH_4^+ \times h^{-1} \times g$  P.S. d'animaux

Concentration d'algues dans le milieu Cell. $10^6 \times l^{-1}$	$QO_2$ $mgO_2 \times h^{-1}$ $\times g.P.S.^{-1}$	erreur standard	n	Ex $\mu atg N-NH_4^+$ $h^{-1} \times g P.S.^{-1}$	erreur standard	n
0	0.371	0.125	10	1.85	0.18	10
0.1	0.852	0.164	14	3.89	0.22	15
1.0	0.935	0.200	20	2.45	0.30	15
10.0	1.453	0.24	15	2.81	2.05	15
20.0	1.38	0.42	5	3.02	2.31	5

Tableau 4

Valeurs de consommation d'oxygène ( $QO_2 / W^{-0.7}$ ) et des taux d'excrétion (Ex) pour différentes valeurs de concentration algale ambiante.

où  $Ab = I - F$

$P + G$  = Gain net d'énergie disponible pour la croissance et la reproduction

$Ab$  = Energie absorbée par la nutrition

$I$  = Apport énergétique brut de l'ingestion

$F$  = Energie perdue à travers les fécès

$R$  = Coût énergétique de la respiration

$U$  = Coût énergétique de l'excrétion dissoute.

Le tableau 6 donne les valeurs des termes de cette équation pour les différentes valeurs de concentration algale testées.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Les taux d'ingestion de *Crassostrea gigas* varient avec la taille des animaux selon une fonction allométrique du même genre que celle établie pour la respiration (Zenthen, 1947 ; 1953) et la filtration (Winter, 1973 ; Pruder et Al., 1976 ; Epifanio & Ewart, 1977) et qui est généralement représentée par les formules  $I = aW^b$  ou  $I/W = aW^{b-1}$  (Tableau 2), où  $I$  est le taux d'ingestion (ou de filtration),  $W$  le poids de l'animal,  $a$  le taux d'ingestion (ou filtration) par poids unitaire et  $b$  une constante. Cette relation est particulièrement importante car l'exposant  $b-1$  généralement négatif indique que les animaux de petite taille filtrent et ingèrent plus par unité de poids que les grands, l'ampleur de la différence étant indiquée par la valeur absolue de  $b-1$ .

Les taux d'ingestion sont aussi fonction de la concentration de nourriture dans le milieu (Tableau 3, Fig. 2), cette relation n'est pas linéaire et la courbe plafonne à partir de la concentration de  $10 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$  (0.7 mg P.S.  $\times$   $l^{-1}$ ) et jusqu'à la concentration de  $30 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$  (2.1 mg P.S.  $\times$   $l^{-1}$ ) qui est la concentration maximale testée. Par ailleurs l'on observe une diminution progressive du taux de filtration (Tableau 3, Fig. 2) pour des valeurs croissantes de concentration algale dans le milieu expérimental. Des résultats analogues ont été obtenus par Riisgård & Randløv (1981) pour *Mytilus edulis* et Wisley & Reid (1978) pour *Crassostrea commercialis*. D'après Epifanio & Ewart (1977) les taux de filtration de *Crassostrea virginica* à haute concentration algale sont une fonction inverse de la densité de la suspension algale. Winter (1973) indique des maxima de taux de filtration à  $10 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$  pour *Mytilus edulis* nourri avec *Dunaliella marina* et des valeurs décroissantes pour des concentrations plus élevées. Loosanoff & Engle (1947) et Davids (1964) indiquent une diminution des taux de filtration pour *Crassostrea* et *Mytilus edulis* à partir respectivement de  $10 \times 10^6$  et  $100 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$ . Ces données sont cependant difficilement comparables entre elles dans la mesure où les concentrations algales sont exprimées en cellules par litre ; or les volumes, les poids et les teneurs en C organique sont variables d'une espèce d'algue à une autre et même à l'intérieur d'une même espèce, fonction de la phase de croissance de la culture.

L'analyse des résultats des taux d'ingestion et de filtration semble indiquer chez *Crassostrea gigas* l'existence d'un mécanisme de régulation de la filtration en fonction de la concentration algale, ce qui permet d'optimiser le gain énergétique en économisant la dépense liée à l'activité de filtration. En effet, d'après les hypothèses de Lehman (1976) et Hughes (1980), dès que le



tube digestif est complètement rempli, le gain énergétique est limité par la vitesse du transit intestinal et la vitesse de digestion. Un taux de filtration trop important entraînerait un dépassement des capacités d'assimilation de l'animal et représenterait une dépense énergétique inutile.

Par ailleurs, à la concentration de  $10 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$  (0.7 mg P.S.  $\times$   $l^{-1}$ ) qui correspond au maximum du taux d'ingestion et à des valeurs proches du minimum du taux de filtration, il y a apparition de la production des pseudofécès. Le remplissage du tube digestif de *Crassostrea gigas* serait donc total pour des valeurs proches de cette concentration.

Les taux de respiration en fonction du poids sont traduits par la même fonction allométrique (Tableau 2, Fig. 1) et ne dépendent de la concentration algale que lorsque celle-ci est insuffisante à assurer le minimum de la demande énergétique de maintien. On observe alors un métabolisme ralenti, permettant la survie des animaux en condition de carence alimentaire. Dès que la densité de la suspension algale du milieu atteint le "seuil minimum", les taux de respiration se stabilisent sur des taux de "routine" (au sens de Bayne et Al., 1973), variant très peu en fonction de la concentration algale. (Tableau 4).

Lors des expériences en circuit fermé, un phénomène de sélection des particules en fonction de leur taille a pu être mis en évidence. A haute concentration algale ( $10 - 30 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$ ) seules les cellules supérieures à  $6 \mu m$  de diamètre sont filtrées efficacement (Tableau 5). Le seuil de filtration descend vers des tailles moindres lorsque la concentration en particules de plus grande taille diminue. L'efficacité de rétention pour les particules de plus grande taille ( $> 6 \mu m$ ) n'est cependant jamais atteinte pour les plus petites cellules. Ceci confirme les résultats de Tammes & Dral (1955) qui ont décrit un comportement sélectif de *Mytilus edulis* ; de même Ali (1970) indique pour *Hiatella arctica* des efficacités de rétention plus grandes pour *Phaeodactylum tricorutum* que pour *Isochrysis galbana* en raison de la taille des particules. Vahl (1972) au contraire décrit un comportement non sélectif pour *Mytilus edulis* qui serait capable de filtrer des particules de  $1-2 \mu m$  de diamètre. Nos données nous permettent de considérer *Crassostrea gigas* comme étant un filtreur sélectif. La capacité de faire varier l'efficacité de rétention de particules en fonction de la composition du mélange présent dans le milieu expérimental indique un mécanisme de régulation particulier.

Les valeurs du bilan énergétique qui ont pu être calculées sur les données expérimentales obtenues semblent confirmer également l'hypothèse de l'optimisation du gain énergétique. Le gain net (P + G) est en effet maximal à la concentration de  $10 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$  et varie peu au delà de cette valeur. (Tableau 6). La légère diminution observée au delà de l'optimum est due à une diminution de l'efficacité d'absorption et non à une augmentation du coût énergétique de la filtration.

Par ailleurs, le seuil de concentration algale dans le milieu au-dessous duquel le bilan énergétique de *Crassostrea gigas* est négatif se situerait aux alentours de  $1 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$  (0.08 mg P.S.  $\times$   $l^{-1}$  ou  $16.1 \mu g$  C organique).

Pour *Mytilus edulis* la charge minimale d'algues permettant son maintien est de  $0.28$  mg PS  $\times$   $l^{-1}$  (Widdows et Al., 1979), pour *Chromomytilus meridionalis* elle serait de  $0.2$  mg PS  $\times$   $l^{-1}$  (Griffiths, 1980). Le taux de filtration

particulièrement élevé de *Crassostrea gigas* à faible concentration algale semble lui permettre une meilleure adaptation à des conditions trophiques plus faibles.

Les valeurs optimales de densité algale permettant un comportement normal semblent se situer autour de 0.7 mg P.S.  $\times$   $l^{-1}$  ( $10 \times 10^6$  cell  $\times$   $l^{-1}$ ) ; des valeurs semblables (0.8 mg P.S.  $\times$   $l^{-1}$  de phytoplancton) ont été trouvées par Navarro & Winter (1982) pour *Mytilus chilensis*.

La capacité d'utilisation optimale du potentiel trophique du milieu et l'optimisation de ses gains énergétiques expliqueraient le fait que *Crassostrea gigas* a une vitesse de croissance supérieure aux autres mollusques filtreurs (Deslous-Paoli, 1982).

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'ATP Bases Biologiques de la Conchyliculture grâce à un financement MRT - DGRST (Contrat N° 82,P0043)

Concentrations algales cell $\times 10^6 \times l^{-1}$	I	F	Ab	R	U	P+G
0.1	2.70	0.50	2.2	10.94	0.03	- 8.77
1.0	28.8	0.62	28.1	12.01	0.02	16.07
10.0	69.36	6.04	63.3	18.66	0.02	44.62
20.0	72.43	14.80	57.63	17.7	0.03	39.9

Tableau 6

Valeurs du bilan énergétique à différentes concentrations algales en Joule  $\times$   $h^{-1} \times g^{-1}$  P.sec (organes seuls) d'animaux.

- Ali, R.M. The influence of suspension density and temperature on the filtration rate of *Hyatella arctica*. Mar. Biol., 6 : 291-302 (1970).
- Bayne, B.L. , R.J. Thompson and J. Widdows. Some effects of temperature and food on the rate of oxygen consumption by *Mytilus edulis* L. Effects of temperature on ectothermic organisms. Ed. Wieser, pp. 181-193. (1973).
- Bayne, B.L. Marine mussels, their physiology and ecology Cambridge Univ. Press 17 : 506 pages (1976).
- Bayne B.L. & C. Scullard. Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia : mollusca). J. mar. biol. Ass. U.K. 57 : 355-369 (1977).
- Bernard, F.R. Particle sorting and labial palp function in the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1795). Biol. Bull. 146 (1) : 1-10 (1974).
- Davids, C. The influence of suspension of micro organisms of different concentrations on the pumping and retention of food by the mussel (*Mytilus edulis* L.) Neth. J. sea Res. 2 : 233-249 (1964).
- Deslous-Paoli, J.M. Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin et les claires de Marennes-Oléron. Thèse 3e cycle Univ. d'Aix-Marseille U.E.R. des Sciences de la mer et de l'environnement (1980).
- Epifanio, C.E. and J. Ewart : maximum rate of four diets for the Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Aquaculture 11 : 13-29 (1977).
- Fiala-Medioni, A. Ethologie alimentaire d'invertébrés benthiques filtreurs (Ascidies) II variations des taux de filtration et de digestion en fonction de l'espèce. Mar. Biol. 28 : 198-296 (1974).
- Fiala-Medioni, A. Nutrition d'invertébrés benthiques filtreurs (Ascidies). Données éthologiques, écophysiologicals et écologiques. Thèse Doc. Etat, Paris : 223 p.
- Fiala-Medioni, A. Synthèse sur la nutrition d'invertébrés benthiques filtreurs, rôle écologique et utilisation des données dans les bilans énergétiques. Oceanis, 7 : 787-892 (1981).
- Fuller J.L. & G.L. Clarke. Further experiments on the feeding of *Calanus finmarchicus*. Biol. Bull. 70 : 308-320 (1936).
- Gerdes, D. The pacific oyster *Crassostrea gigas* Part I Feeding behaviour of larvae and adults. Aquaculture, 31 : 195-219 (1983).
- Gerdes, D. The pacific oyster *Crassostrea gigas* Part II oxygen consumption of larvae and adults. Aquaculture, 31 : 221-231 (1983).



- Griffiths R.J. Filtration, respiration and assimilation in the black mussel *Choromytilus meridionalis*. Mar. ecol. prog. ser. 3 : 63-70 (1980).
- Hughes, R.N. Optimal foraging theory in the marine context. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 18 : 423-481 (1980).
- Jørgensen, C.B. Biology of suspension feeding. In : International series of monographs in pure and applied Biology. Ed. by Kerkut C.A. : 357 p. (1966).
- Lehman, J.T. The filter feeder as optimal forager and the predicted shapes of feeding curves. Limn. and Oceanogr., 21 (4) : 501-516 (1976).
- Loosanoff, V.L. and J.B. Engle. Effects of different concentrations of microorganisms on the feeding of Oysters. Fishery. Bull. Fish. Wildl. ser. V. U.S. 51 (42) 31-57 (1947).
- Møhlenberg, F. and H.U. Riisgård. Filtration rate, using a new indirect technique in thirteen species of suspension feeding bivalves. Mar. Biol., 54 : 143-148 (1979).
- Navarro J.M. and J.E. Winter. Ingestion, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. Mar. Biol. 67,255-266 (1982).
- Newkirk G.F. and L.E. Haley, Progress in selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 10 : 77-79 (1982)
- Nimura, Y. A new filter feeding model incorporating the critical food concentration. Bull. of the Japanese Soc. of Sci. Fish., 46 (7) : 787-795 (1980).
- Pruder, G.D., Botton, E.T., Greehaugh, E.E. and Borgalley, R.E. Engineering aspects of molluscan mariculture : Progress at Delamare Proc. 7th Ann Workshop World Maricult. Soc.
- Riisgård, H.U. On measurements of the filtration rates of suspension feeding bivalves in a flow system. Ophelia 16, 167-173 (1977).
- Riisgård H.U. and A. Randløv. Energy budgets, growth and filtration rate in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. Mar. Biol. 61, 2/3 : 227-234 (1981).
- Schulte, E.H. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis* Mar. Biol. 30, 331-341 (1975).
- Shafee, M.S. Variations saisonnières du bilan énergétique chez les inocividus d'une population de *Chlamis varia* (L). Bivalvia pectinidae. Oceanologica Acta. 5 (3) : 331-338 (1982)
- Tammes, P.M.L. and A.D.G. Dral. Observations on the straining of suspension by mussels. Arch. Neerland. Zool., 11 : 87-112 (1955).

- Thomson, R.J. and B.L. Bayne. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. J. exp. mar. Biol. Ecol., 9 : 111-124.
- Thomson, R.J. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 27 : 317-326 (1974).
- Thomson R.J. and B.L. Bayne. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*., Mar. Biol., 27 : 317-326 (1974).
- Vahl, O. Efficiency of particle retention in *Mytilus edulis* L. Ophelia, 10(1) : 17-26 (1972).
- Vahl, O. Seasonal changes in oxygen consumption of the iceland scallop (*Chlamys islandica*) from 7°N. Ophelia, 17 (1) : 143-154 (1978).
- Warren, C.E. and G.E. Davis. Laboratory studies of the feeding, bioenergetics growth of fish. In : The biological Basis of freshwater fish production Ed. by Gerking S.D. : 175-214. Blackwell Scientific Publication. (1967).
- Widdows, J. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. J. mar. biol. Ass. U.K., 58 : 109-124 (1978a).
- Widdows, J., P. Fieth and C.M. Worrall. Relationship between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 50 : 195-207 (1979).
- Winter J.E. Über den Einfluß der Nahrungskonzentration und andere Faktoren auf Filtrierungsleistung und Nahrungsausnutzung der Muscheln *Artica islandica* und *Modiolus demissus*. Mar. Biol., 4 : 87-135 (1969).
- Winter J.E. The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. Mar. Biol., 22 : 317-328 (1973).
- Winter J.E. A review of the knowledge of suspension feeding in Lammelibranchiate Bivalves with special reference to artificial aquaculture systems. Aquaculture, 13 : 1-33 (1978).
- Wisley B. and B.L. Reid. Experimental feeding of Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis* = *Succostrea cucullata*) I. Optim particle size and concentrations. Aquaculture, 15 : 319-331 (1978).
- Wisley B., J.E. Holliday and B.L. Reid. Experimental deep water culture of the Sydney rock Oyster (*Crassostrea commercialis*). Aquaculture, 17 : 77-83 (1979).
- Zeuthen, E. Body size and metabolic rate in the animal kingdom. Compt. rend. Lab. Carlsberg, ser. chim. 26 : 17-161 (1947).
- Zeuthen, E. Oxygen uptake as related to body size in organisms. The quarterly review of Biology. 28 (1) : 1-12 (1953).



DYNAMIQUE ET ENZYMOLOGIE DE LA DIGESTION CHEZ L'HUITRE  
CRASSOSTREA GIGAS (THUNBERG)

E. BOUCAUD-CAMOU, C. LEBESNERAIS, P. LUBET et I. LIHRMANN

Laboratoire de Zoologie, Université de Caen, 14032 CAEN CEDEX

CONTRAT 82/P/0042

**RESUME** Chez Crassostrea gigas (Thunberg) des expériences d'alimentation contrôlée ont permis d'établir les modalités et la chronologie du transit alimentaire. Différentes activités enzymatiques en relation avec la digestion (glycosidases, estérases et peptidases) ont été localisées dans l'appareil digestif et ont permis de préciser les sites de digestion des glucides et des protides et les sites d'absorption. Un schéma explicatif des différentes étapes de la digestion est proposé.

Feeding experiments carried out on Crassostrea gigas (Thunberg) allowed to set up the stages and the timing of the movement of food throughout the digestive tract. Various activities involved in digestion (glycosidases, esterases, and peptidases) were investigated histochemically in the digestive tract in order to localize the sites of absorption and the sites of protein and carbohydrate digestion. An explicative model of the different stages of digestion is proposed.

**MOTS CLES** : Crassostrea gigas, Huitre, Digestion, Transit digestif, Enzymes.

**KEY WORDS** : Crassostrea gigas, Oyster, Digestion, Movement of food, Enzymes.

**INTRODUCTION**

L'étude de la digestion chez les Bivalves a donné lieu à de nombreux travaux. Dans une récente revue, Morton (1983) cite plus de 400 titres parmi lesquels seulement moins de trente sont consacrés aux Ostréidés. Chez ces derniers, l'huitre japonaise, Crassostrea gigas a relativement peu retenu l'attention des auteurs, tant au point de vue de l'anatomie et de la cytologie du tractus digestif que de celui du transit des aliments, des modalités de la digestion ou de la nature des activités enzymatiques, (Mathers, 1973 ; Morton, 1977). Il était donc indispensable que de nouvelles recherches portent sur une espèce d'intérêt économique mondial. En particulier, il convenait de préciser les séquences et les modalités du transit digestif, la nature, l'origine et la sécrétion des différentes enzymes car la localisation de ces dernières n'avait pas été faite jusqu'ici par les auteurs.

Ce travail a été entrepris dans le cadre de "l'A.T.P. Bases biologiques de l'Aquaculture" (Contrat 82/P/0042). Dans l'ensemble des recherches effectuées sur les Mollusques, il s'intègre à la suite du programme portant sur la quantification de la prise de nourriture et de l'énergie absorbée par les huîtres. Il permettra de mieux apprécier l'utilisation du matériel particulaire absorbé comme la nature des déchets (fèces) libérés dans le milieu (biodéposition). En effet la quantification, dans ces derniers, des matériaux réutilisables constituera un des éléments permettant d'établir des bilans énergétiques. Il importe en effet d'apprécier dans les différents bassins ostréicoles français les potentialités nutritionnelles du milieu afin d'adapter la charge en mollusques cultivés aux possibilités naturelles. Enfin, la connaissance des rythmes de prise de nourriture, de transit et de digestion permettront la réalisation de distributions efficaces d'aliments et de régimes adaptés en nurseries pour les animaux en pré-grossissement.



## MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Matériel

Les Huîtres utilisées pour cette étude sont des Crassostrea gigas (Thunberg) de 70 à 100 g. provenant des parcs d'élevage des côtes du Cotentin (côte ouest : Blainville, côte est : Saint-Vaast-La-Hougue, Baie des Veys). Pour la reconstitution du tractus digestif, nous avons utilisé du naissain en provenance de la Gironde (taille : 1 cm).

### 1.2. Méthodes histologiques et histochimiques

L'anatomie microscopique (reconstitution du tractus digestif par des coupes sériées) et l'étude histologique de l'appareil digestif ont été réalisées sur des pièces fixées au liquide de Bouin-Hollande, incluses à la paraffine, coupées à 6  $\mu\text{m}$  et colorées au trichrome de Prenant-Gabe (Gabe, 1968).

Les polysaccharides ont été recherchés par la méthode à l'acide périodique-Schiff et par le bleu alcian (Gabe, 1968) sur des pièces fixées au liquide de Gendre et incluses à la paraffine.

Les protéines ont été recherchées sur des pièces fixées au formol salé, incluses à la paraffine et traitées par la méthode de Deitch (acidophilie totale), le vert solide FCF (protéines basiques) (selon Gabe, 1968) et le bleu de bromophenol (Mazia et al., 1953).

La localisation des lipides a été réalisée au moyen des colorants lysochromes (rouge à l'huile, noir soudan) et du bleu de Nil (lipides à caractère acide) selon Gabe (1968) sur des coupes à congélation de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de pièces fixées au formol salé ou au formol calcium. Des contrôles ont été réalisés par extraction des lipides sur coupes par un mélange (v/v) de méthanol et de chloroforme.

### 1.3. Méthodes cytologiques

La fixation de petites pièces de glande digestive a été réalisée par du glutaraldéhyde à 2 % dans un tampon au cacodylate de sodium : HCl (pH 7,4) additionné de saccharose. Une post-fixation au tétr oxyde d'osmium à 2 % dans le même tampon a suivi. Les pièces ont été ensuite déshydratées et incluses dans l'épon.

L'étude cytologique a été réalisée sur des coupes semi-fines (0,5 à 1  $\mu\text{m}$ ) colorées au bleu de toluidine boraté et des coupes ultrafines, contrastées par de l'acétate d'uranyle suivi de citrate de plomb et observées au microscope électronique.

### 1.4. Expériences d'alimentation contrôlée

Les Huîtres de 90 à 100 g. provenant de l'Est Cotentin (Baie des Veys) sont mises à jeûner pendant 48 heures, puis émergées quelques heures, ce qui provoque le déclenchement immédiat et simultané de la filtration dès la remise en eau. Elles sont alors placées dans des conditions contrôlées d'oxygénation (saturation) de salinité (30 ‰), de luminosité (obscurité), de température (variant de 9 à 25° selon les expériences) et de nourriture (mélange de Dunaliella sp., Chlorophycée et de Phaeodactylum tricornutum, Diatomée). Au bout d'un temps variant de 3 à 22 heures suivant les expériences, les Huîtres sont placées dans des bacs dépourvus

d'algues. Tout au long de l'expérience, pseudofèces et les fèces sont constamment prélevées pour limiter le "recyclage" et observées au microscope afin de déterminer le stade de digestion des algues. Dans la troisième série d'expériences, des coupes à congélation ont été réalisées toutes les heures sur 2 Huîtres afin d'observer l'état des algues à différents niveaux du tractus digestif.

Trois séries d'expériences ont été réalisées afin d'étudier :

- 1) l'effet de la durée de la prise alimentaire : 3 h et 5 h 30 (temps courts) et 22 h (temps long) (température de l'eau 9-10°).
- 2) l'effet de la température sur la digestion (température d'expérience : 10° - 14° - 20° - 25° ; durée de la prise alimentaire : 3 heures). (Tableau I)
- 3) l'évolution du contenu du tube digestif pendant les 8 premières heures de digestion (température d'expérience : 18-20° ; durée de la prise de nourriture : 4 heures).

## 1.5. Méthodes enzymologiques

### 1.5.1. Détection d'activités enzymatiques in vitro

19 activités enzymatiques (tableau II) ont été recherchées à partir d'un extrait brut de tissu suivant une méthode mise au point par Plantevin et al. (1972) et commercialisée sous le nom d'"apizym".

L'activité amylasique a été mesurée, selon la méthode de Bernfeld (1955) légèrement modifiée, sur des extraits obtenus par broyage et homogénéisation de tractus digestif entier dans un tampon phosphate additionné de Na Cl. La proportion de tissu frais était d'environ 100 mg/ml. Les protéines extraites ont été dosées par la méthode de Lowry et al. (1951).

L'activité protéasique totale a été recherchée selon la méthode de Rinderknecht et al. (1968) utilisant comme substrat le "Hide powder azure" de Calbiochem sur des extraits obtenus selon Boucaud-Camou (1974). Comme précédemment, la proportion de tissu frais était d'environ 100 mg/ml et les protéines extraites dosées selon Lowry et al. (1951).

### 1.5.2. Méthodes histo-enzymologiques

Toutes les recherches enzymatiques in situ ont été réalisées sur des tissus frais, non fixés. L'appareil digestif de l'Huître est rapidement congelé dans du fréon liquide, puis débité dans un cryomicrotome en coupes de 12 à 14 µm d'épaisseur.

#### 1.5.2.1. Méthodes d'empreintes

Ces méthodes utilisent l'action directe des coupes à congélation sur un film de substrat (Daoust, 1957, 1965). Les protéases ont été recherchées selon la méthode de Chrétien (1965) modifiée, l'amylase selon Shear et Pearse (1963), la laminarinase et la cellulase selon Arnould et Bouchez-Decloux (1978), l'alginase selon Arnould et Jeuniaux (1982).

#### 1.5.2.2. Méthodes de précipitation

Toutes les méthodes que nous avons appliquées dans cette étude utilisent comme substrat un dérivé naphtolique couplé à un sel de diazonium. 15 enzymes en



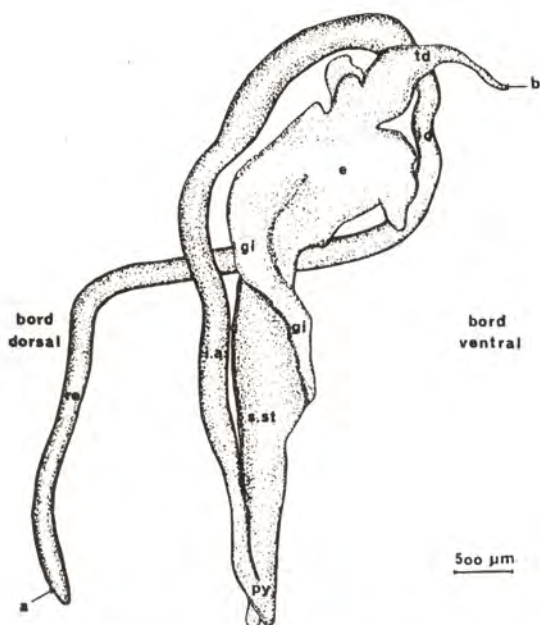


FIGURE 1 : Reconstitution du tractus digestif de *Crassostrea gigas* juvénile vu sur la face droite. La glande digestive n'est pas figurée.

a : anus ; b : bouche ; gi : gouttière intestinale ;  
 ia : intestin ascendant ; id : intestin descendant ; py : pylore ;  
 re : rectum ; sst : sac du stylet ; td : oesophage .

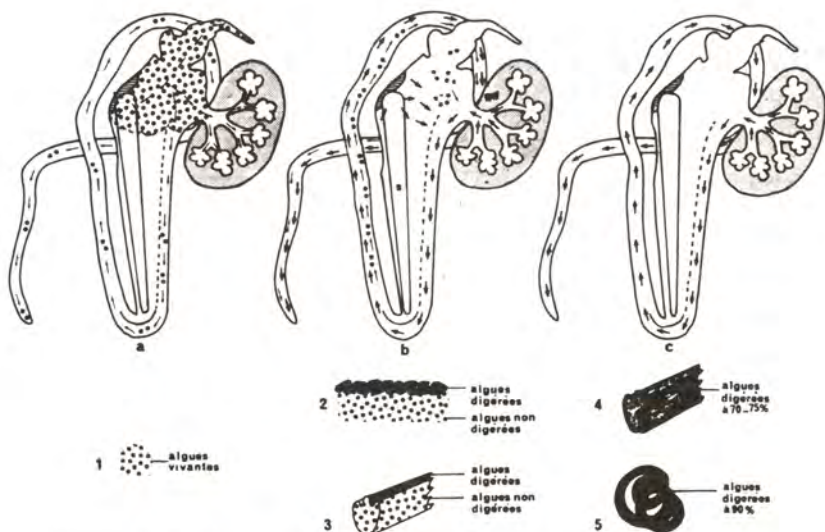


FIGURE 2 : Représentation schématique du transit digestif chez *Crassostrea gigas* (résultats des expériences d'alimentation contrôlée).

- a : remplissage du tube digestif : le tube digestif se remplit complètement d'algues dont une bonne partie est émise par l'anus(1)
- b : digestion : les résidus de la digestion en provenance de la glande digestive et de l'estomac se mêlent aux algues non digérées. Les fèces d'abord rubannées (2) se moulent à la forme du rectum (3).
- c : fin de digestion : la proportion des résidus de digestion l'emporte sur celle des algues intactes (4). En fin de digestion, il n'y a pratiquement plus d'algues dans le tube digestif. Les fèces se déshydratent et s'enroulent en cordons (5).
- ( s : stylet cristallin ; g. d : glande digestive ;  
 -•- : trajet des algues vivantes.  
 ->- : trajet des algues digérées ).



relation avec la digestion ont été recherchées (la méthode suivie est indiquée entre parenthèses, le substrat utilisé figure sur les tableaux III, IV et V) :

$\beta$  N-acétylglycosaminidase et  $\beta$  glucuronidase (Lowe *et al.*, 1982) ; estérases non spécifiques (Gomori, 1952 selon Lojda *et al.*, 1979) ; lipase (Abé *et al.*, 1963) ; phosphatase acide (Grogg et Pearse, 1952, selon Gabe, 1968) ; phosphatase alcaline (Pearse, 1953, selon Lojda *et al.*, 1979) ; chymotrypsine (Lagunoff, 1967) ; cathepsine B (Graf *et al.*, 1979) ; cathepsine D (Smith et Van Frank, 1975, modifiée) ; cathepsine C ou D.A.P. I, D.A.P. II et D.A.P. IV (Lojda *et al.*, 1979) ; D.A.P. III (Mac Donald *et al.*, 1971) ; aminopeptidase M ou leucine aminopeptidase (Moore *et al.*, 1980). (1)

## RESULTATS

### 1. ORGANISATION DE L'APPAREIL DIGESTIF

#### 1.1. Anatomie

Des dissections et des coupes sériées ont permis de reconstituer très précisément l'anatomie de l'appareil digestif (fig. 1).

La bouche s'ouvre entre les palpes labiaux. A la bouche, fait suite l'oesophage, légèrement courbé qui aboutit à l'estomac. Celui-ci communique, par des canaux, avec la glande digestive, masse pigmentée de couleur kaki.

L'estomac se prolonge, postérieurement par un cœcum cylindrique, disposé obliquement : le sac du stylet (= estomac tubulaire) dans lequel se trouve un batonnet translucide et de consistance molle : le stylet cristallin, faisant largement saillie dans la cavité stomacale (fig. 2).

A demi séparée du sac du stylet par deux typhlosoles, majeur et mineur, provenant de l'estomac, la gouttière intestinale (ou gouttière gastrique de l'intestin moyen) décrit une spirale très lâche le long du sac du stylet (fig. 1). A l'extrémité postérieure du tractus, la gouttière intestinale s'ouvre dans l'intestin, dans un sillon correspondant, tandis que le sac du stylet se prolonge un peu plus postérieurement et s'ouvre dans l'autre sillon de l'intestin (fig. 2) ; les deux organes, gouttière et sac du stylet, étant alors séparés dans leur région terminale.

Dès son départ, l'intestin présente un trajet récurrent (branche ascendante), décrit une boucle dorso-ventrale autour de l'estomac et de la glande digestive et se dirige alors (branche descendante) vers l'extrémité postérieure de l'animal. A l'intestin, fait suite le rectum qui longe la face externe dorsale du muscle adducteur et se termine par l'anus, s'ouvrant dans la cavité palléale (fig. 1).

#### 1.2. Structure histologique

##### 1.2.1. Tractus digestif

A l'exception du bouclier gastrique, le tractus digestif (oesophage, estomac, sac du stylet, intestin) est tapissé par un épithélium cilié contenant

(1) D.A.P. : Dipeptidylaminopeptidase, M.N.A : 4 méthoxy- $\beta$ -naphtylamide.

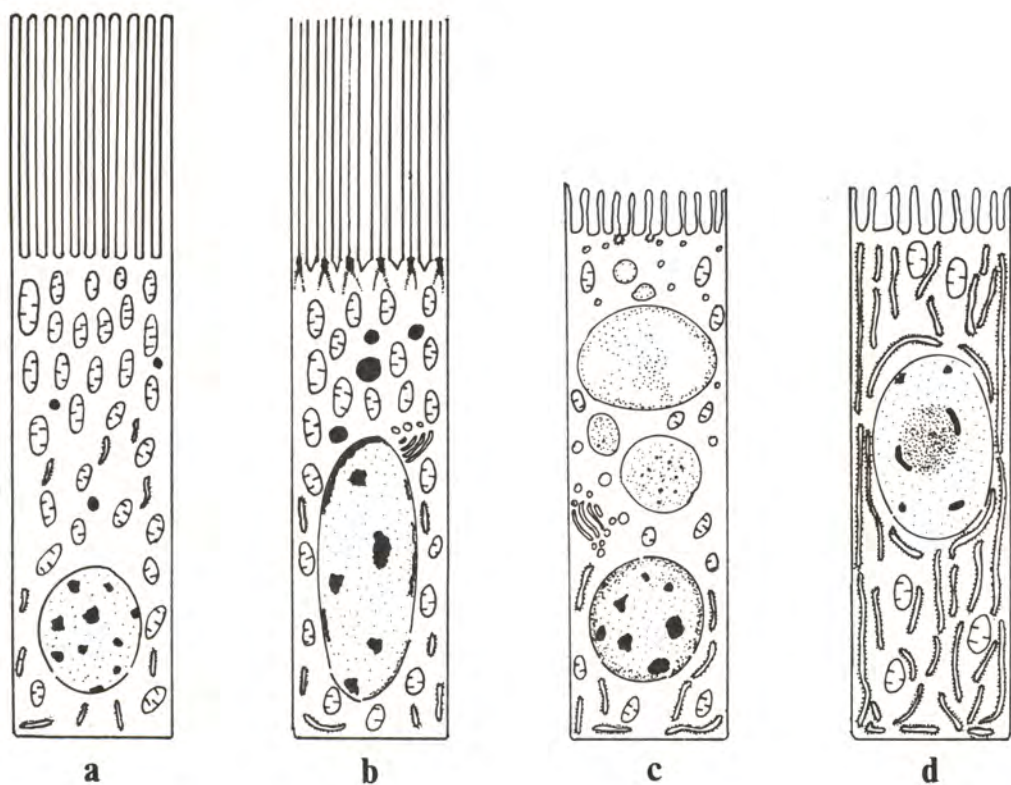


FIGURE 3 : Principaux types cellulaires rencontrés dans la glande digestive de Crassostrea gigas.

- a : cellule à bordure en brosse (canaux principaux, voie inhalante et canaux secondaires).
- b : cellule ciliée (canaux principaux, voie exhalante).
- c : cellule digestive (tubules glandulaires).
- d : cellule basophile (tubules glandulaires).



de nombreuses cellules glandulaires à sécrétion glycoprotéique. La paroi musculaire est très peu développée. Ainsi, la structure histologique du tractus digestif paraît très uniforme : seules varient, suivant les régions, la hauteur des cellules ciliées et de leurs cils et la densité des cellules glandulaires (Pl. I, fig. 1).

Le bouclier gastrique fait exception. Il est constitué d'une couche de cellules hautes, revêtues d'une cuticule épaisse, chitineuse et sclérotisée (Arnould, 1976).

### 1.2.2. Glande digestive

La glande digestive consiste en un grand nombre de tubules à extrémité aveugle communiquant avec l'estomac par une série de canaux ramifiés.

Les tubules glandulaires débouchent dans un court canal secondaire (commun à plusieurs tubules), ce dernier aboutissant dans un canal principal. Les canaux principaux confluent en des canaux de diamètre de plus en plus important avant de déboucher dans l'estomac.

Les canaux principaux sont divisés en deux régions : l'une est tapissée par un épithélium à bordure ciliée, l'autre, par un épithélium à bordure en brosse (Pl. I, fig. 2).

Dans les deux épithéliums sont disséminées des cellules glandulaires, plus nombreuses cependant dans l'épithélium à bordure en brosse.

Les cellules ciliées (fig. 3, b) sont de hautes cellules munies de nombreux cils, à racine ciliaire développée, alternant avec des microvillosités. Le noyau est basal. Dans la partie apicale de la cellule, on observe de nombreuses mitochondries et quelques granulations denses aux électrons.

Les cellules à bordure en brosse (fig. 3, a) sont frangées à leur partie apicale de nombreuses microvillosités très hautes et très serrées. Les mitochondries sont très abondantes ; quelques granules électro-denses sont visibles.

Les cellules glandulaires ont un aspect caliciforme typique. Leur noyau est refoulé à la base de la cellule. Le cytoplasme est rempli de grains de sécrétion, peu denses aux électrons et de nature glycoprotéique.

Les canaux secondaires sont tapissés par un épithélium formé de cellules à bordure en brosse identiques à celles des canaux principaux.

Les tubules glandulaires contiennent deux catégories de cellules qui ne se distinguent facilement qu'en microscopie électronique :

a) Les cellules digestives sont les plus nombreuses. Ce sont des cellules hautes, dont la partie apicale porte quelques microvillosités (fig. 3, c). Le noyau est basal, les mitochondries assez nombreuses. La présence de vacuoles hétérophagiques à divers stades d'évolution caractérise ces cellules.

b) Les cellules basophiles sont caractérisées par un cytoplasme riche en vésicules de réticulum endoplasmique rugueux. Le noyau possède un nucléole développé. Toutefois, les grains de sécrétion y sont rares. Quelques microvillosités et cils bordent la partie apicale de ces cellules (fig. 3, d).

Les différents canaux et tubules de la glande digestive sont entourés par du tissu de réserve formé de cellules de nature conjonctive chargées d'abondants granules lipidiques et de glycogène.



	+ 10°	+ 14°	+ 20°	+ 25°
Apport de nourriture (Algues)	0 à + 3h	0 à + 3h	0 à + 3h	0 à + 3h
Emission d'algues intactes	+ 5h		+ 3h	+ 2h
Emission des premiers résidus de la digestion (fécès en rubans)	+ 6h	+ 6h	+ 4h30	+ 3h 30
Fécès "moulées" (30 - 40 % algues digérées)	+ 8h30	+ 8h30	+ 6h15	+ 4h40
> 70 à 95 % de résidus de la digestion dans les fécès	+ 13h à + 40h	+ 13 à + 40h	+ 8h 30 à + 33h	+ 8h30 à + 33h
100 % résidus de la digestion	+ 60h	+ 45h	+ 37h	+ 37h
Plus de fécès (T.D. vide)	→ 75h	→ 60h	→ 50h	→ 50h

Tableau I : Influence de la température sur les différentes phases de la digestion chez

Crassostrea gigas.

ENZYME RECHERCHEE	SUBSTRAT	RESULTAT
Phosphatase alcaline	2-naphthyl phosphate	+++
Estérase (C4)	2-naphthyl butyrate	++
Estérase lipase (CB)	2-naphthyl caprylate	+++
Lipase (C14)	2-naphthyl myristate	0
Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	+++
Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	+++
Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	+++
Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	+/-
Chymotrypsine	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphthylamide	-/-
Phosphatase acide	2-naphthyl phosphate	+++
Phosphoamidase	Naphthol-AS-B1-phosphodiamide	+++
$\alpha$ Galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-galactopyranoside	+
$\beta$ Galactosidase	2-naphthyl- $\beta$ D-galactopyranoside	+++
$\beta$ Glucuronidase	Naphthol-AS-B1- $\beta$ D-glucuronate	+++
$\alpha$ Glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	++
$\beta$ Glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ D-glucopyranoside	++
N-acétyl- $\beta$ glucosaminidase	1-naphthyl-N-acétyl- $\beta$ D-glucosaminide	++
$\alpha$ mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	+
$\alpha$ Fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside	+++

Tableau II : résultat des tests apizym

## 2. DYNAMIQUE DU TRANSIT DIGESTIF

Les expériences d'alimentation contrôlée nous ont permis d'établir une chronologie précise des différentes étapes de la digestion (fig. 2 et Tableau I).

### 1ère étape : remplissage du tractus digestif (fig. 2, a)

Le tube digestif se remplit complètement d'algues, assez rapidement : on observe des algues intactes dans l'estomac, les canaux principaux de la glande digestive et l'intestin. Il faut 5 à 3 heures environ entre 10 et 20° pour que les algues aient complètement traversé le tube digestif. Celles-ci sont alors émises par l'anus, mêlées à un abondant mucus (fig. 2, a<sub>1</sub>).

Cette étape est nettement influencée par la température (tableau I).

### 2ème étape : début de la digestion (fig. 2, b)

Dès leur entrée dans les canaux de la glande digestive (lors de la première heure de digestion), les algues sont attaquées, alors que des algues vivantes sont observées assez longtemps dans l'estomac (pendant environ 6 heures) et surtout dans l'intestin (8 à 16 heures après le début de l'alimentation). 3 à 6 heures après le début des expériences, les premiers résidus de la digestion apparaissent dans les fèces, mêlés à de nombreuses algues vivantes (fig. 2, b 2).

Progressivement, le pourcentage de résidus va augmenter, tandis que les fèces se solidifient et se moulent à la forme du rectum. Les résidus sont accumulés en un ruban plissé, nettement séparé du ruban droit formé par les algues, intactes (fig. 2, b 3). L'ensemble est probablement moulé dans la gouttière rectale, ce qui suppose des voies de transit séparées pour les algues et les résidus, au moins au début de la digestion.

### 3ème étape : fin de la digestion (fig. 2, c)

Les résidus vont dominer sur les algues intactes, envahissant toute la lumière du rectum, et l'on obtiendra, au bout d'une dizaine d'heures environ, des fèces homogènes (fig. 2, c 4), mais il faudra attendre environ 40 heures pour ne plus trouver d'algues vivantes dans les fèces. Celles-ci alors durcissent et s'enroulent en tortillons (fig. 2, c 5). Elles ne vont plus être émises de façon continue, mais par intermittence, mêlées à un abondant mucus. Le tractus digestif s'est totalement vidé au bout de 50 heures à 20° C, mais la digestion peut durer jusqu'à 75 heures à 10° C (tableau I).

## 3. LOCALISATION D'ACTIVITES ENZYMATIQUES

### 3.1. Résultats des tests "apizym"

Ces résultats sont consignés dans le tableau II. Les activités glycosidiques et estérasiques (à l'exception de la lipase) sont importantes, alors que les activités protéolytiques de type chymotrypsine ou trypsine sont très faibles.

### 3.2. Activités glycosidiques

Des activités  $\alpha$  et  $\beta$  glucanasiques (amylase, cellulase et laminarinase) ont été décelées dans tout l'appareil digestif, au niveau des épithéliums et dans la région luminale proche des épithéliums (tableau III et Pl. I, fig. 3). De même, une activité acétylglucosaminidase est présente dans tout l'appareil

ENZYMES	SUBSTRATS	GLANDE DIGESTIVE		ESTOMAC		INTESTIN	
		Canaux	Tubules	Cellules ciliées	Bouclier gastrique	Ascendant	Descendant
Amylase	Amidon	+++	+++	+	+	+	+
Cellulase	Cellulose	++	++	++		++	++
Laminarinase	Laminarine	+	+	+		+	+
Alginate	Alginat de Na	-	-	-	-	-	-
$\beta$ . N. acétylglucosaminidase	Naphtol AS.BI $\beta$ . N. acétyl glucosamine	++	++	++	+++	++	++
$\beta$ . glucuronidase	Naphtol AS.BI $\beta$ . glucuronide	-	-	-	-	-	-

Tableau III : Localisation d'activités glycosidasiques dans l'appareil digestif de Crassostrea gigas.

ENZYME	SUBSTRAT	GLANDE DIGESTIVE		ESTOMAC		INTESTIN	
		Canaux	Tubules	Cellules ciliées	Bouclier gastrique	Ascendant	Descendant
Estérases non spécifiques	acétate d' $\alpha$ naphtyle	+++	++	+++		+	
Lipase	nonanoate de naphtol AS	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acide	phosphate d' $\alpha$ naphtyle	+	+++	++		++	
Phosphatase alcaline	phosphate d' $\alpha$ naphtyle	++	+	-	-	+ faible	+ faible

Tableau IV : Localisation d'activités esterasiques dans l'appareil digestif de Crassostrea gigas.

ENZYMES	SUBSTRATS	GLANDE DIGESTIVE		ESTOMAC		INTESTIN	
		Canaux	Tubules	Cellules ciliées	Bouclier gastrique	Ascendant	Descendant
Protéases	Gélatine	-	++	-	-	-	-
Chymotrypsine	Propionate de Naphtol AS	++	faible +	+		faible +	faible +
Cathepsine B	Cbz.Ala.Arg.Arg. MNA	+		++		++	++
Cathepsine D	Bz.Arg.Gly.Phe.Phe Pro. MNA	-	-	-	-	-	-
Cathepsine C ou D.A.P.I.	Pro.Arg.MNA	+++	-	++	-	+	-
DAP II	Lys.Ala.MNA	+++	-	++	-	++	++
DAP III	Arg.Arg.MNA	-	-	-	-	++	++
DAP IV	Gly.Pro.MNA	+	-	++	-	-	-
Amino-peptidase M	Leu.MNA	++	++	++	+	+++	+++

Tableau V : Localisation d'activités peptidasiques dans l'appareil digestif de Crassostrea gigas.



digestif. Elle est particulièrement forte au niveau du bouclier gastrique et dans les cellules des tubules digestifs (tableau III).

### 3.3. Activités estérasiques

Une forte activité estérasique non spécifique a été détectée dans la glande digestive (surtout au niveau des canaux) et dans l'estomac (tableau IV). Dans l'intestin et dans l'estomac, cette activité a été localisée dans la partie apicale de l'épithélium. La phosphatase acide s'est révélée très active dans les tubules de la glande digestive alors que la phosphatase alcaline a été localisée au niveau de la bordure en brosse des canaux de la glande digestive et à la base des tubules (Pl. I, fig. 4).

### 3.4. Activités peptidasiques

L'activité protéasique est faible : elle a été mise en évidence uniquement au niveau des tubules de la glande digestive (Pl. II, fig. 1) et parfois dans la lumière intestinale. L'activité de type chymotrypsine se localise différemment (tableau V). En fait, la mesure in vitro de l'activité protéolytique de l'appareil digestif montre que le pH optimal se situe aux environs de 5,5 (fig. 4) qui est le pH optimal d'activité des enzymes à localisation lysosomale. Cependant, la plus grande partie des peptidases intracellulaires recherchées (cathepsines et dipeptidyl-aminopeptidases) a été décelée selon une localisation différente : ces enzymes se rencontrent au niveau de la bordure en brosse des canaux de la glande digestive (Pl. II, fig. 2) et dans la région apicale de l'épithélium cilié de l'estomac et de l'intestin (Pl. II, fig. 3) bien qu'il existe des différences entre leur distribution respective (tableau V).

### 3.5. Variations d'activités enzymatiques au cours de la digestion

Plusieurs enzymes ont été suivies au cours de la digestion afin de détecter d'éventuelles variations dans leur localisation ou dans leur activité.

#### 3.5.1. Amylase

La mesure in vitro de l'activité amylasique d'extrait brut d'appareil digestif fait apparaître une baisse vers la 5ème heure, une remontée ensuite (fig. 5) (seul le début de la digestion a été étudié).

In situ, on observe une nette baisse d'activité dans les tubules de la glande digestive au début de la digestion, tandis que l'activité augmente dans les canaux, puis baisse légèrement ensuite. Dans l'estomac, l'amylase, localisée au voisinage de l'épithélium chez l'animal à jeun, s'incorpore à la tige cristalline au cours de la digestion (Pl. II, fig. 4).

#### 3.5.2. N acétyl-glucosaminidase

Nous n'avons pas constaté de changements dans la distribution de cette enzyme, d'ailleurs assez largement répandue dans tout l'appareil digestif (tableau III). L'activité in situ, assez forte à jeun, paraît diminuer au cours de la digestion.

#### 3.5.3. Estérases non spécifiques

Aucun changement n'a été observé dans la localisation de cette enzyme au cours de la digestion.

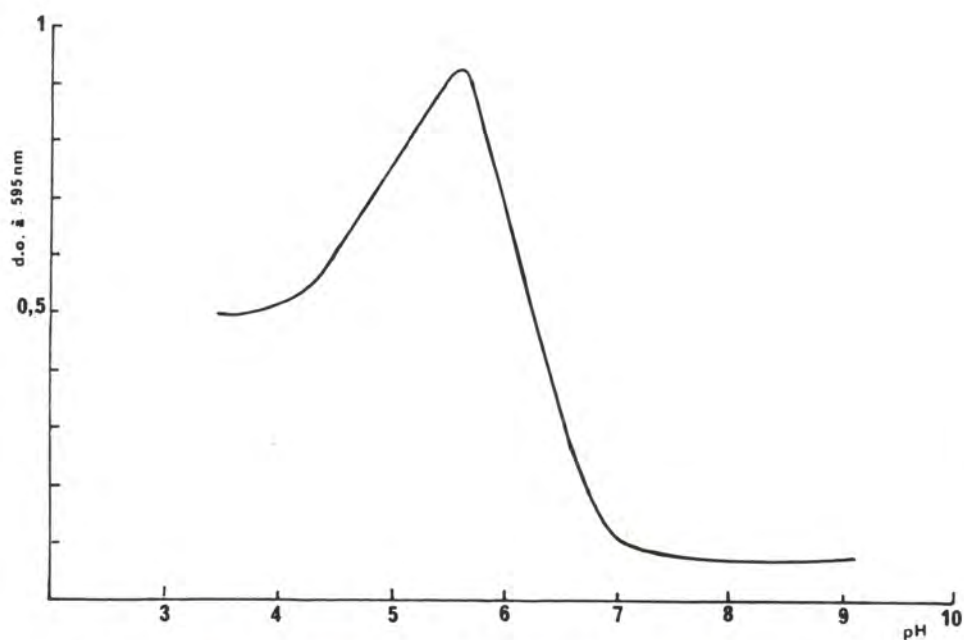


FIGURE 4 : Variation en fonction du pH de l'activité protéolytique d'extrait d'appareil digestif de *Crassostrea gigas*. (Durée de l'incubation : 3 heures à 37°). d; o. : densité optique.

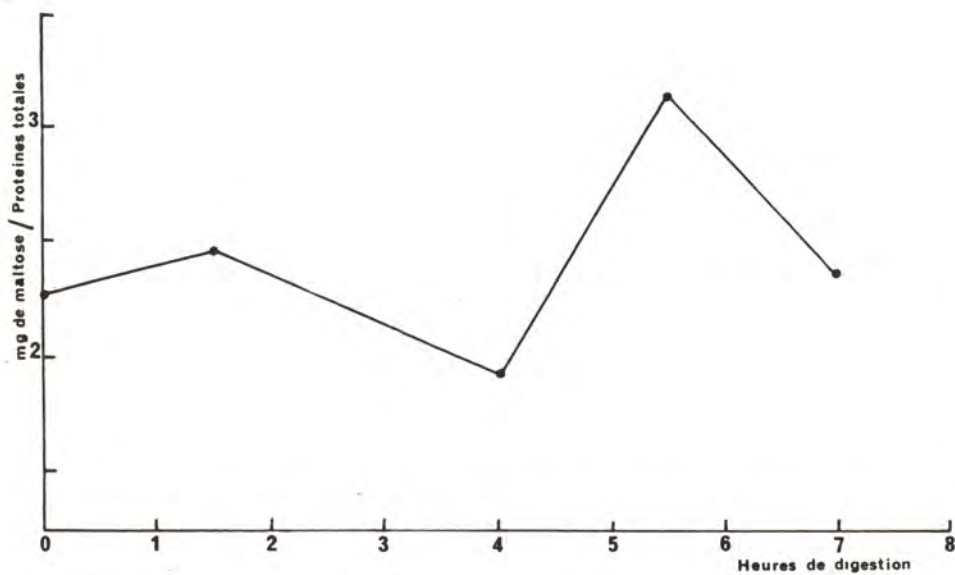


FIGURE 5 : Evolution de l'activité amylasique de l'appareil digestif au cours de la digestion chez *Crassostrea gigas*. (Durée de l'incubation : 8 minutes à 25°, pH 6,9).



**FIGURE 6** : Localisation de l'activité phosphatasique acide à différents stades de la digestion dans les tubules glandulaires de la glande digestive de Crassostrea gigas.

- a : animal à jeun.
- b : 2 heures de digestion
- c : 5 heures de digestion
- d : 24 heures de digestion.



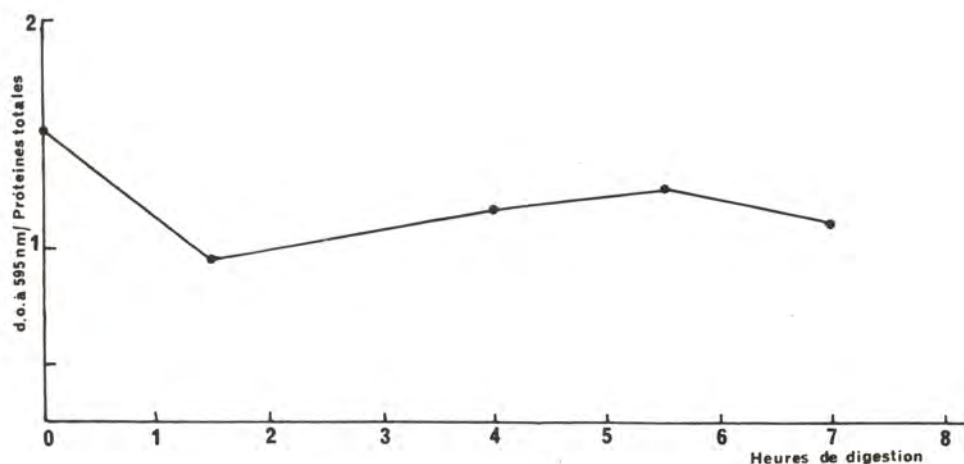


FIGURE 7 : Evolution de l'activité protéasique de l'appareil digestif au cours de la digestion chez *Crassostrea gigas*.  
(Durée de l'incubation : 5 heures à 37°, pH 5,5). d.o. : densité optique.

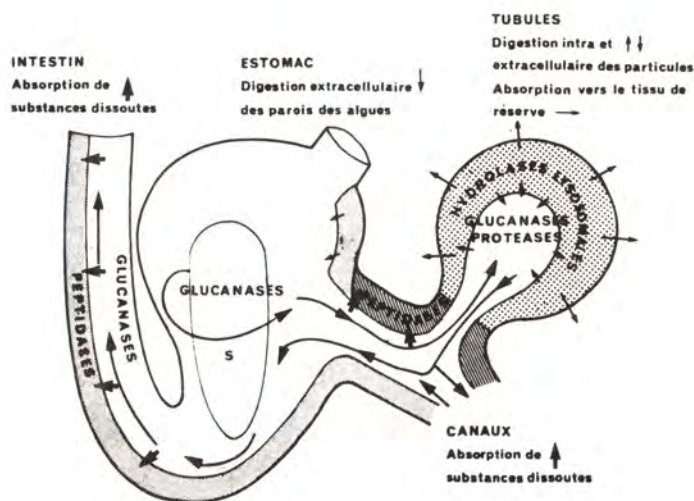


FIGURE 8 : Représentation schématique des différents sites de la digestion chez *Crassostrea gigas*.

← trajet des aliments

↑ : absorption transmembranaire ; ↑ : absorption par pinocytose.

↓ : sécrétion d'enzymes digestives.

s : stylet.

#### 3.5.4. Phosphatase acide

Dans les tubules de la glande digestive, nous avons pu constater des changements assez nets de localisation de cette enzyme au cours de la digestion (fig. 6). A jeun, l'activité phosphatasique est surtout localisée dans des granules situés à la partie basale des cellules, et, sous forme plus diffuse, dans la région apicale (fig. 6, a). Au début de la digestion (2 heures) la phosphatase acide se trouve dans la partie apicale des tubules (fig. 6, b). Vers la 6ème heure de digestion, elle se situe dans la partie médiane (fig. 6, c) et en fin de digestion (24 heures), elle se localise dans la région basale des cellules, au niveau de gros granules (fig. 6, d).

#### 3.5.5. Protéases

L'étude in vitro et in situ de l'activité protéasique montre que celle-ci baisse au début de la digestion, puis augmente ensuite légèrement (fig. 7). La localisation demeure réduite aux tubules de la glande digestive, avec toutefois une activité plus importante en fin de digestion.

L'activité de type chymotrypsine, suivie seulement in situ, montre peu de variations visuellement décelables : la localisation demeure la même. Seule une légère augmentation de l'activité au niveau des canaux de la glande digestive (partie inhalante) a été constatée vers la 2ème heure de digestion.

### DISCUSSION

La structure du tractus digestif de l'huître japonaise Crassostrea gigas ne diffère pas de celle des autres Lamellibranches ; la musculature y est faible alors que la ciliature est très développée. Le transit alimentaire doit être essentiellement assuré par les cils qui tapissent la totalité des cavités digestives, processus assez naturel et répandu chez les animaux microphages dont le bol alimentaire est particulière.

La glande digestive présente la structure décrite par les auteurs (Morton, 1983), toutefois les canaux principaux ne possèdent pas de séparation par des typhlosoles de la région à bordure en brosse ("inhalante" selon Owen, 1955), de celle à ciliature ("exhalante"). Cette structure rend difficilement admissible la théorie des deux contre-courants simultanés, l'un inhalant, l'autre exhalant émise par Owen (1955). Il paraît plus vraisemblable comme le pense Morton (1983) que ces courants alternent dans le temps même si la région à bordure en brosse est en effet inhalante et la région ciliée exhalante ; il existe un certain décalage dans le temps entre l'arrivée des aliments dans les canaux et le retour vers l'intestin des résidus digérés comme l'a montré Mathers (1972).

Dans les tubules glandulaires, nous avons retrouvé les deux types cellulaires décrits par Owen (1970) : la cellule digestive responsable de la digestion intracellulaire et la cellule basophile qui serait sécrétrice. Cette dernière, chez l'huître, nous paraît présenter plutôt les caractères d'une cellule synthétisante que d'une cellule sécrétrice.

Les expériences d'alimentation contrôlée ont montré que l'animal remplissait complètement son tube digestif (phase de prise alimentaire), puis en digérait progressivement le contenu. La température influe de façon significative sur la vitesse du transit alimentaire, probablement en accélérant les battements ciliaires responsables du transport. Le raccourcissement de la durée de la digestion à température élevée affecte surtout le début de la digestion (transit des algues) et la fin (élimination des fèces). La phase de digestion proprement dite semble relativement moins affectée par la température.



Que le temps de prise de nourriture soit court (3 à 5 h) ou long (22 h, ce qui correspond dans la nature à une alimentation continue), la chronologie obtenue ne diffère pas sensiblement. Ces observations sont en accord avec le principe d'un rythme de nutrition lié à la marée chez les Bivalves intertidaux (Morton, 1977, 1983) et également en accord avec les observations des ostréiculteurs pour lesquels les huîtres creuses se nourrissent au "premier flot" (Lubet, 1978). Il paraît cependant assez surprenant que durant une partie importante de la digestion, des algues intactes demeurent dans le tube digestif (estomac et surtout intestin). Les algues pénétrant dans la glande digestive sont immédiatement attaquées, phénomène qui doit être en rapport avec la localisation des différentes enzymes impliquées dans la digestion.

Celles-ci peuvent être regroupées suivant leur mode d'action et leur rôle dans les différentes étapes de dégradation et d'assimilation des aliments. Ces derniers sont variés chez l'huître (Lubet, 1978) : particules vivantes organiques -en majorité des algues vivantes unicellulaires-, des bactéries, des matières organiques sous forme particulaire ou soluble (1). Dans le cas précis de nos expériences, les algues utilisées sont en principe facilement digestibles : les *Dunaliella* (Chlorophycées), dépourvues de paroi ont de l'amidon pour réserve, les *Phaeodactylum* (Diatomées) possèdent une paroi faiblement silicifiée et leurs réserves sont essentiellement constituées par de la chrysolaminarine.

Les  $\alpha$  et  $\beta$  glucanases digèrent la paroi des algues (cellulose) et leurs substances de réserve (amidon, laminarine). Nous avons constaté la présence de glucanases dans tout l'appareil digestif. En ce qui concerne l'amylase, nous avons observé des variations dans son activité et de sa localisation au cours de la digestion, ce qui pourrait expliquer le délai parfois assez long de l'attaque des algues.

Morton (1983) lie exclusivement la digestion extracellulaire à l'action du stylet cristallin : action mécanique par broyage contre le bouclier gastrique (Yonge, 1923) mais surtout chimique. En effet, les différentes glucanases que nous avons décelées histochimiquement avaient été mises en évidence par les auteurs dans des extraits du stylet cristallin de Bivalves : l'amylase (voir la revue de Morton, 1983), la cellulase et la laminarinase (Newell, 1953 ; Sova *et al.*, 1969 ; Schallenberger *et al.*, 1974 ; Jacober *et al.*, 1980 et revue de Morton, 1983). Le stylet cristallin libérerait ces enzymes par dissolution de sa partie antérieure au début de la digestion (Morton, 1977, 1983). Toutefois, selon Bernard (1973), le stylet entraînerait, comme une vis sans fin, de fines particules à la surface de l'estomac, vers l'arrière et non vers l'avant ; ces particules seraient absorbées par l'épithélium stomacal. Quelle que soit la manière dont fonctionne le stylet cristallin, celui-ci, structure amorphe, ne peut sécréter les enzymes qu'il contient. Des glucanases ont en effet été détectées dans des extraits des diverticules digestifs et du bouclier gastrique (Morton, 1983). Nos recherches montrent que des activités glucanasiques sont présentes dans tous les épithéliums de l'appareil digestif, les plus intenses étant généralement localisées dans les diverticules digestifs, ce qui corrobore le fait que les algues pénétrant dans les canaux principaux soient immédiatement attaquées. En début de digestion, il semble qu'il y ait sécrétion d'amylase vers l'estomac. D'ailleurs à ce moment, nous n'avons pas localisé de glucanases à l'intérieur du stylet cristallin mais seulement à sa surface. Il nous semble donc qu'en début de digestion, dans le cas de nos expériences, le stylet cristallin ne soit pas chargé d'enzymes mais agisse plutôt par son action mécanique. Il incorporerait ensuite des enzymes sécrétées par la paroi stomacale (Arnould & Bouchez, 1978 ; Mathers, 1973) et aussi par la glande digestive, ce qui expliquerait le délai d'attaque assez long des algues

(1) Une grande partie des petites molécules en solution dans l'eau de mer est directement absorbée et assimilée par la branchie ou le manteau (Pequignat, 1973 ; Morton, 1983).



dans l'estomac. Prieur (1981) avait d'ailleurs noté l'incorporation de particules à l'intérieur de la tige cristalline au cours de la digestion. La digestion des glucides se poursuit de manière intracellulaire sous l'action d'enzymes lysosomales dans les cellules de la glande digestive, mais aussi probablement dans celles de l'estomac.

Les activités lipasiques n'ont pu être localisées dans ce travail ; cela est probablement dû aux méthodes employées dont aucune n'est satisfaisante et qui ont donné des résultats négatifs chez les Bivalves (Palmer, 1979). En fait, une activité lipasique a pu être mise en évidence par d'autres méthodes au niveau du stylet cristallin (George, 1952 ; Palmer, 1979) et, quelle que soit son origine, elle doit agir dans l'estomac grâce aux propriétés émulsifiantes du stylet.

Dans notre travail, l'activité protéasique, toujours faible, a pu être uniquement localisée dans les tubules de la glande digestive, surtout en fin de digestion, et très ponctuellement dans l'intestin. La chymotrypsine et la trypsine n'ont pu être détectées par la méthode rapide "api-zym". Ces observations sont en accord avec celles de Reid (1968) qui attribue une très faible activité de type trypsique aux Gastrotriteia. La méthode histochimique de détection de la chymotrypsine (Lagunoff, 1967) a donné des résultats positifs : en fait, ces résultats coïncident avec ceux de la localisation des estérases et non pas avec celle de l'activité protéolytique. Comme le substrat utilisé (propionate de Naphtol AS) est susceptible d'être attaqué par les estérases, nous pensons que l'activité révélée est plutôt celle d'une estérase que d'une protéase.

La digestion des protéines semblerait plutôt être réalisée par des enzymes à optimum de pH acide comme l'indique la fig. 4, ce qui d'ailleurs se trouve en accord avec les résultats des différents auteurs ayant travaillé sur les peptidases de Bivalves. Une grande partie de cette digestion paraît s'effectuer de manière intracellulaire. Les enzymes lysosomales doivent donc bien être représentées.

La phosphatase acide a été localisée avec la plus forte activité au niveau des tubules digestifs ; les variations de sa localisation suivent bien le cheminement de la digestion intracellulaire (fig. 6). Une activité très importante est aussi présente dans l'épithélium stomacal, l'épithélium intestinal paraissant moins actif. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Mathers (1973) chez Crassostrea angulata. L'acétyl-glucosaminidase a la même localisation, très probablement lysosomale, ce qui s'accorde avec les résultats de Moore et al. (1980). L'activité glucosaminidasique, très importante et présente au niveau du bouclier gastrique nous paraît peut-être liée à des phénomènes de remaniement cuticulaire.

Les peptidases considérées comme lysosomales (Cathepsines C et D, D.A.P. I et II) ont été détectées en fait, non pas dans les tubules mais, au niveau des régions à bordure en brosse très développées (région "inhalante" des canaux principaux, canaux secondaires) et dans la branche ascendante de l'intestin, c'est-à-dire avec la même localisation que des peptidases considérées comme membranaires (Amino-peptidase M). Cette localisation coïncide avec celle de la phosphatase alcaline, enzyme membranaire toujours liée aux sites de transports actifs. Ces résultats peuvent s'expliquer par un manque de spécificité des méthodes : l'aminopeptidase M pourrait être responsable des résultats positifs obtenus pour la D.A.P. I et II. Il se pourrait également que ces enzymes aient une localisation différente chez les Invertébrés chez lesquels ces techniques n'ont jamais été utilisées. Si l'on excepte le problème posé par les enzymes lysosomales, il reste qu'il existe au niveau des bordures en brosse des canaux digestifs et dans l'épithélium stomacal, des enzymes membranaires (peptidases, phosphatases alcalines) qui doivent être en rapport avec l'absorption. Nos résultats s'accordent avec ceux de Janssen (1981).

En regroupant les résultats de nos différentes expériences, nous proposons le schéma provisoire suivant de la digestion (fig. 8). Les huîtres remplissent complètement leur tube digestif dès le premier apport de nourriture, dans les protocoles expérimentaux réalisés mais aussi vraisemblablement dans la nature avec le premier "flot" de la marée. Un flux particulière pénètre simultanément dans l'estomac et dans les canaux de la glande digestive par voie inhalante. Toutes les substances directement assimilables sont alors absorbées grâce aux enzymes membranaires des cellules à bordure en brosse. L'attaque des parois algales se produit dès l'entrée dans les canaux digestifs sous l'action des glucanases particulièrement actives à ce niveau, puis progressivement dans l'estomac grâce à l'action mécanique puis chimique du stylet cristallin, à l'aide des enzymes sécrétées par la paroi stomacale et la glande digestive. Les aliments ayant subi la digestion stomacale pourraient être à leur tour dirigés vers la glande digestive ou bien digérés et absorbés par la paroi stomacale.

Les résidus de la digestion provenant de la glande digestive, (courant exhalant provoqué par la région ciliée des canaux principaux) et de l'estomac pénètrent dans l'intestin. Dans cet organe l'absorption et la digestion intracellulaire se poursuivent surtout dans sa partie proximale ou branche ascendante. Les fèces sont formés dans le rectum avec probablement une voie préférentielle pour les résidus fins au niveau du sillon principal.

De nombreux points de ce schéma devront être approfondis au cours de recherches ultérieures. Il sera important de préciser les rythmes et modalités du transit dans des conditions naturelles (élevages d'huîtres en surélévation sur les plages ou élevages en suspension en Méditerranée). Par ailleurs, il conviendra de préciser le rôle exact des enzymes liées au stylet cristallin dans la digestion intrastomacale. Enfin, la localisation des peptidases intracellulaires devra être précisée par des recherches ultrastructurales. Il serait aussi très important que des recherches associant des microbiologistes puissent apporter des informations sur les rôles de la flore bactérienne présente dans le tractus digestif. En effet, Prieur (1981) a montré que les Bivalves effectuaient une sélection parmi la microflore bactérienne présente dans l'eau de mer et que des bactéries pouvaient se reproduire dans le tractus digestif. Selon cet auteur, des bactéries pourraient émettre des enzymes extracellulaires (protéases) dans l'intestin, ces dernières pouvant jouer également un rôle actif dans les phénomènes de la digestion.

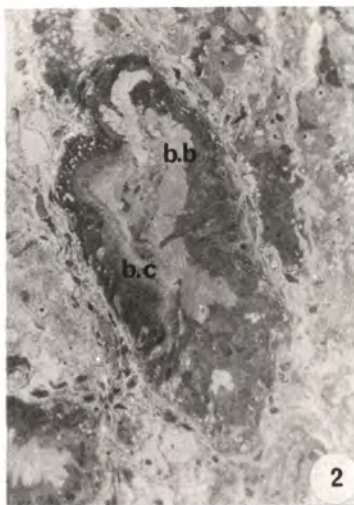
- 
- Abé M., Kramer S.P., Seligman A.M., 1964 - The histochemical demonstration of pancreatic like lipase and comparison with the distribution of esterase. J. Histochem. Cytochem., 12, p. 364-383.
- Arnould C., 1976 - Chemical composition of the gastric shield of a Bivalve, Zyrrhea crispata, and of the teeth of the gizzard of a Gastropod Opisthobranch, Aplysia punctata. Biochem. System. Ecol., 4, p. 117-121.
- Arnould C., Bouchez-Decloux N.J., 1978 - Histochemical methods for the localization of cellulase, chitinase, and laminarinase. Application to the gastric shield of the bivalve Mollusc Scrobicularia plana. Histochem., 56, (1) p. 45-54.
- Arnould C., Jeuniaux C., 1982 - Les enzymes hydrolytiques du système digestif chez les Crustacés Pagurides. Cah. Biol. Mar., XXIII, p. 89-103.
- Bernard F.R., 1973 - Crystalline style formation and function in the oyster Crassostrea gigas (Thunberg, 1795). Ophelia, 12, p. 159-170.



- Bernfeld P., 1955 - Amylases  $\alpha$  et  $\beta$ . In : Methods enzymology. - Colwick SP et Kaplan N.O., Edit. - New York : Academic Press, Vol. 1, p. 149-150.
- Boucaud-Camou E., 1974 - Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez Sepia officinalis L. Arch. Zool. exp. gén., 115, p. 5-27
- Chretien M., 1965 - Mise en évidence d'une activité protéasique dans la sous-maxillaire de Souris. C.R. Acad. Sci. Paris, 261, p. 5633-5636.
- Daoust R., 1957 - Localization of deoxyribonuclease activity in tissue sections. A new approach to the histochemistry of enzymes. Exp. Cell. Res., 12, p. 203.
- Daoust R., 1965 - Histochemical localization of enzyme activities by substrate film methods : ribonucleases, deoxyribonucleases, proteases, amylase and hyaluronidase. Int. Rev. Cytol., 18, p. 191-221.
- Gabe M., 1968 - Techniques histologiques. Paris : Masson et Cie.
- George W. C., 1952 - The digestion and absorption of fat in Lamellibranchs. Biol. Bull., 102, p. 118-127.
- Graf M., Leemann U., Ruch F., Strauli P., 1979 - The fluorescence and bright field microscopic demonstration of cathepsin B in human fibroblasts. Histochemistry, 64, (3)
- Jacobson L.F., Rice C., Rand JR A.G., 1980 - Characterization of the carbohydrate degrading enzymes in the surf clam crystalline style. Journal of Food science, 45, p. 381-385.
- Janssen H.H., 1981 - Zur enzymhistochemie und ultrastruktur von Magen und Drüsenkanälen bei verschiedenen Muscheln. Zool. Anz., 207, (1-2), 54-69.
- Lagunoff D., 1967 - Histochemistry of proteolytic enzymes. Methods archiv. Exp. Pathol. Switz, 2, p. 55-77.
- Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H., 1979 - Enzyme Histochemistry. A laboratory manual. Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag.
- Lowe D.M., Moore M.N., Bayne B.L., 1982 - Aspects of gametogenesis in the marine mussel Mytilus edulis L., J. Mar. Biol. Ass. U.K., 62, p. 133-145.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Lubet P.E., 1978 - Nutrition des Lamellibranches (Huîtres, Moules). Oceanis, 4, p. 23-54.
- Mathers N.F., 1972 - The tracing of natural algal food labelled with a carbon 14 isotope through the digestive tract of Ostrea edulis L. Proc. Malacol. Soc. London, 40, p. 115-124.
- Mathers N.F., 1973 - A comparative histochemical survey of enzymes associated with the processes of digestion in Ostrea edulis and Crassostrea angulata (Mollusca : Bivalvia). J. Zool. Lond., 169, p. 169-179.
- Mazia D., Brewer P.A., Alpert M. 1953 - The cytochemical staining and measurement of protein with Mercuric bromophenol blue. Biol. Bull., 104, p. 56-67.
- Mc Donald J.K., Callaman P.X., Ellis S., Smith R.E., 1971 - Polypeptides degradation by dipeptidyl aminopeptidase I (Cathepsin C) and related peptidase in tissue proteinases. Edit. by Barret A.S. et Dingle J.Y., p. 69-107.



- Moore M.N., Koehn R.K., Bayne B.L., 1980 - Leucine aminopeptidase (Aminopeptidase I) N-Acetyl-  $\beta$ -hexosaminidase and lysosomes in the Mussel Mytilus edulis L. in response to salinity changes. J. Exper. Zool., 214, (3), p. 239-292.
- Morton B.S., 1977 - The tidal rythm of feeding and digestion in the pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 26, p. 135-151.
- Morton B., 1983 - Feeding and digestion in Bivalvia. In : The Mollusca, Vol. 5, Physiology, Part. 2, Edit. by A.S.M. Saleuddin, Karl M. Wilbur. New York : Academic Press.
- Newell B.S., 1953 - Cellulolytic activity in the Lamellibranch crystalline style. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 32, p. 491-495.
- Owen G., 1955 - Observations on the stomach and digestive diverticula of the Lamellibranchia. I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia. Quart. J. Micr. Sci., 96, (4), p. 517-537.
- Owen G., 1970 - The fine structure of the digestive tubules of the bivalve Cardium edule. Philos. Trans. R. Soc. London, B, 258, (822), p. 245-260
- Palmer, Robert E., 1979 - A histological and histochemical study of digestion in the bivalve Arctica islandica L. Biol. Bull., 156, (1), p. 115.
- Pequignat E., 1973 - A kinetic and autoradiographic study of the direct assimilation of amino-acids and glucose by organs of the mussel, Mytilus edulis. Mar. Biol., 19, p. 227-244.
- Plantevin G., Nardon P., 1972 - Utilisation d'une microméthode de détection pour la recherche qualitative d'activités enzymatiques dans les tissus d'insectes. Ann. Zool. Ecol. Animale, 4, (2), p. 229-248.
- Prieur D., 1981 - Les relations entre Mollusques Bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. Thèse : Sc. nat. Brest : Sér. C.
- Reid G.B., 1968 - The distribution of digestive tract enzymes in Lamellibranchiate bivalves. Comp. Biochem. Physiol., 24, 3, p. 727-744.
- Rinderknecht M., Geokas M.C., Silverman F., 1968 - A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. Clin. Chim. Acta, 27, p. 197-203.
- Schallenberger R.S., Searles C., and Lewis, B.A., 1974 - Laminarinase activity in the crystalline style of the surf clam (Spissula solidissima). Expérimenta, 30, p. 597.
- Shear M., Pearse A.G.E., 1963 - A starch substrate filum method for the histochemical localization of amylase. Exp. Cell Res., 32, 1, p. 174-176.
- Smith R.E., Van Frank R. M., 1975 - The use of amino acid derivatives of methoxy- $\beta$ -naphthylamide for assay and subcellular localization of tissue proteinases. Lysosomes in Biology and Pathology, Edit. Dingle J.T. ; North-Holland Publishing Co, Amsterdam, 4, p. 193-249.
- Sova .V., Elyakova L.A., and Vaskivsky V.E., 1969 - The distribution of laminarase in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 32, p. 459.
- Yonge, C.M., 1923 - Studies on the comparative physiology of digestion. I : The mechanism of feeding, digestion, and assimilation in the lamellibranch, Mya, Brit. J. Exp. Biol. 1, p. 15-63.



- PLANCHE 1 -

Figure 1 : Epithélium cilié de l'estomac. Trichrome de Prenant-Gabe (x 450).

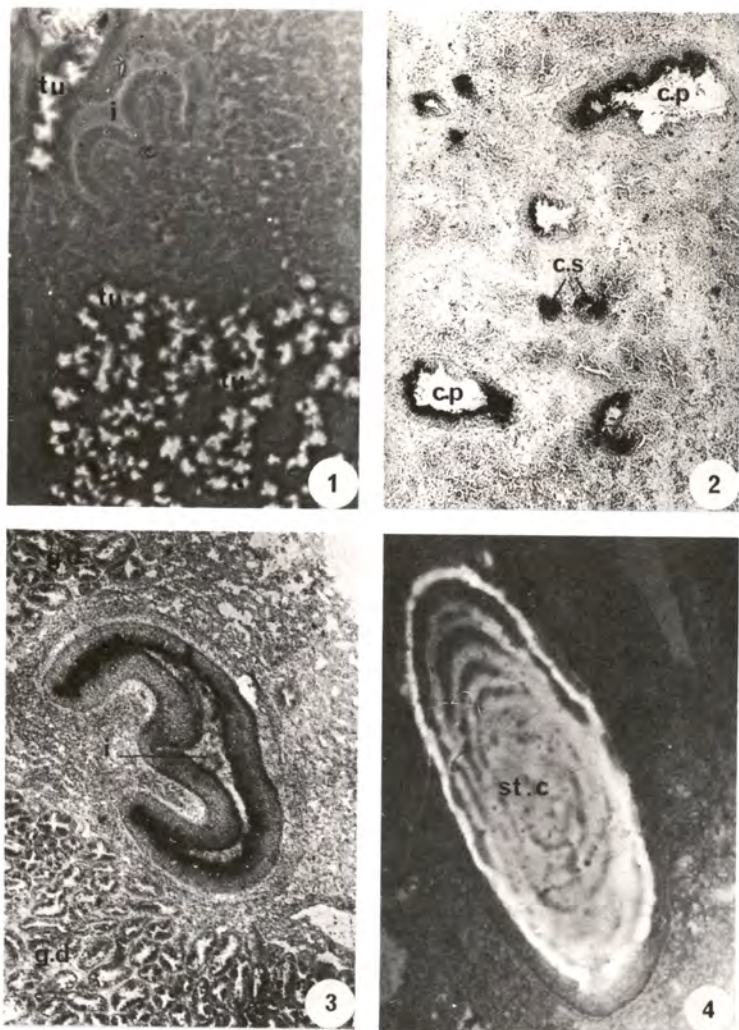
Figure 2 : Coupe transversale semi-fine d'un canal principal de la glande digestive. On distingue la région à bordure en brosse (bb) et la région à bordure ciliée (bc). Bleu de toluidine (x 450).

Figure 3 : Mise en évidence d'une activité amylasique (plages claires) au niveau de la glande digestive. Film d'amidon coloré au lugol. (x 32).

Figure 4 : Mise en évidence d'une activité phosphatasique alcaline (précipité noir) à la base des tubules et au niveau de la bordure en brosse des canaux de la glande digestive. Phosphate d' $\alpha$  naphtyle couplé au bleu solide BB (x 70).

bb : bordure en brosse ; bc : bordure ciliée ; cp : canal principal ;  
lu e : lumière de l'estomac ; tu : tubule.





- PLANCHE II -

**Figure 1** : Mise en évidence de l'activité protéasique (plages claires) au niveau des tubules de la glande digestive. On notera l'absence d'activité dans l'intestin (i). Film de gélatine noirci. (x 26).

**Figure 2** : Mise en évidence d'une activité peptidasique (D.A.P. II, précipité noir) dans la région à bordure en brosse des canaux de la glande digestive. Lysyl-alanine MNA couplé au bleu solide B. (x 154).

**Figure 3** : Mise en évidence d'une activité peptidasique (aminopeptidase M, précipité noir) au niveau de la bordure apicale de l'épithélium intestinal. Leucyl MNA couplé au bleu solide B. (x 30).

**Figure 4** : Coupe transversale du stylet cristallin : l'activité amylasique est distribuée de manière concentrique. 4 h. 30 de digestion. Film d'amidon coloré au lugol. (x 30).

cp : canal principal ; cs : canal secondaire ; gd : glande digestive ;  
i : intestin ; stc : stylet cristallin ; tu : tubule.



ETUDE HISTOENZYMOLOGIQUE DE LA DIGESTION  
CHEZ *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

Anne HILY

Faculté des Sciences - BREST 29200

RESUME

L'étude du transit alimentaire et l'évolution des tubules de la glande digestive, après une prise de nourriture, mettent en évidence une continuité des processus de digestion chez les juvéniles de *R. philippinarum*.

L'étude histoenzymologique du tractus digestif précise l'importance des activités enzymatiques intracellulaires dans l'épithélium stomacal, la glande digestive et les cellules intestinales. Les cellules digestives, grâce aux enzymes associés au système vacuolaire, assurent une grande part de la digestion.

ABSTRACT

Examinations of alimentary tract and digestive tubules after feeding give evidence of continuous digestive process in juveniles of *Ruditapes philippinarum*.

Histoenzymologic study of digestive tract suggests important intracellular enzymatic activities in stomacal epithelium, digestive gland and intestinal cells.

Main part of intracellular digestion occurred in digestive cells by lysosome associated with vacuolar system.

MOTS CLES : Bivalve, digestion, enzymes digestives

KEY WORDS : Bivalve, digestion, digestive enzymes.

## INTRODUCTION

Depuis les travaux de YONGE (1926) qui a énoncé une première interprétation de la digestion chez les mollusques bivalves, de nombreuses études ont été réalisées. Elles apportent des résultats variables liés à l'environnement et aux conditions de nutrition différentes des espèces étudiées. De nouvelles théories ont été élaborées par OWEN (1966), PURCHON (1971), MORTON (1973) qui mettent en évidence des caractères communs de la digestion chez les bivalves notamment le rôle des différentes régions du tube digestif. D'autres paramètres semblent toutefois moins uniformes comme l'importance relative des processus de dégradation extra et intracellulaire, ainsi que le mode continu ou rythmique de la digestion.

Dans cette étude, chez des juvéniles de *Ruditapes philippinarum*, le transit alimentaire et le fonctionnement de la glande digestive sont précisés ainsi que la localisation de quelques enzymes digestives.

## MATERIEL ET METHODES

Le naissain de *Ruditapes philippinarum* est fourni par l'écloserie de la SATMAR.

L'étude du transit alimentaire est réalisée sur des palourdes mis à jeun pendant 72 h. L'apport de nourriture est assuré sous la forme d'une suspension algale de *Rinaliella primolecta* à la concentration de  $10^5$  cell/ml pendant 1 heure. Les animaux sont ensuite remis en eau filtrée renouvelée régulièrement pour éviter l'intervention des pseudofeces et feces expulsés.

Différentes techniques d'histologie ont été utilisées.

- Technique de cryomicrotomie

Des coupes à congélation sont effectuées au cryomicrotome elles sont utilisées selon deux protocoles.

. après montage, les coupes sont observées pour l'étude du transit alimentaire. La présence et l'abondance du matériel présent dans les différentes parties du tractus digestif est noté à intervalle régulier après l'ingestion de nourriture. . diverses activités enzymatiques sont recherchées sur les coupes à congélation par des techniques d'empreintes pour l'amylase, les protéases non spécifiques et par des techniques de précipitation décrites dans le tableau 1 pour les autres enzymes recherchées.

- Technique de Microscopie électronique.

Les échantillons sont fixés pendant 2 heures dans une solution de glutaral-déhyde à 3 % dans un tampon cacodylate à 0,2M à pH = 7,3 d'osmolarité ajustée à 1 400 mosm par du NaCl. Une post-fixation dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 % dure une heure. Après un lavage soigneux les échantillons sont deshydratés puis inclus dans le mélange de spurr.

## RESULTATS

### 1. Anatomie du tube digestif

L'étude de coupes histologiques sériées, a permis de reconstituer l'anatomie du tractus digestif chez les juvéniles de *Ruditapes philippinarum* et d'en donner une représentation schématique (Figure 1). Le tube digestif est constitué d'un oesophage tubulaire légèrement incurvé. Il traverse la glande digestive et débouche dans l'estomac. L'épithélium stomacal est bordé dorsalement par le bouclier gastrique. L'estomac se prolonge par une formation allongée, le sac du stylet entourant la tige cristalline (Planche 1, Figure 1).

Le sac du stylet est bordé latéralement par un renflement : la gouttière intestinale se prolongeant par l'intestin qui développe quatre circonvolutions. La glande digestive forme une masse globuleuse entourant l'oesophage et la région antérieure de l'estomac. Elle consiste en un très grand nombre de tubules constituant les extrémités d'un réseau de conduits ramifiés.

## 2. Transit alimentaire

Les observations de matériel dans les différentes parties du tube digestif sont notées dans le Tableau 2.

Dès l'apport de nourriture, les animaux ingèrent des cellules algales, ce comportement aboutit au remplissage du tube digestif au bout de 30' à 1 heure. Les premières heures suivant l'ingestion voient l'élimination de l'excès de bol alimentaire, une grande quantité d'algues intactes sont visibles dans les anses intestinales, elles traversent le tube digestif sans être altérées. Cette phase intense d'élimination dure pendant 4 à 5 heures et se prolonge de manière plus modérée jusqu'à 8 heures après l'ingestion.

Les cellules algales restent peu de temps dans la lumière stomacale, elles sont rapidement visibles contre la paroi.

L'entrée de cellules algales est notée au bout d'une heure dans la glande digestive où les conduits et les tubules digestifs se remplissent.

Une seconde phase débute vers 10 h. Elle correspond à l'élimination intense de résidus de la digestion. Du matériel brunâtre est expulsé dans les conduits de la glande. Il est évacué par la gouttière intestinale et les anses intestinales successives. Les quantités de matériel expulsé sont importantes jusqu'à 15 h puis le phénomène s'atténue mais il n'est pas achevé au bout de 24 heures.

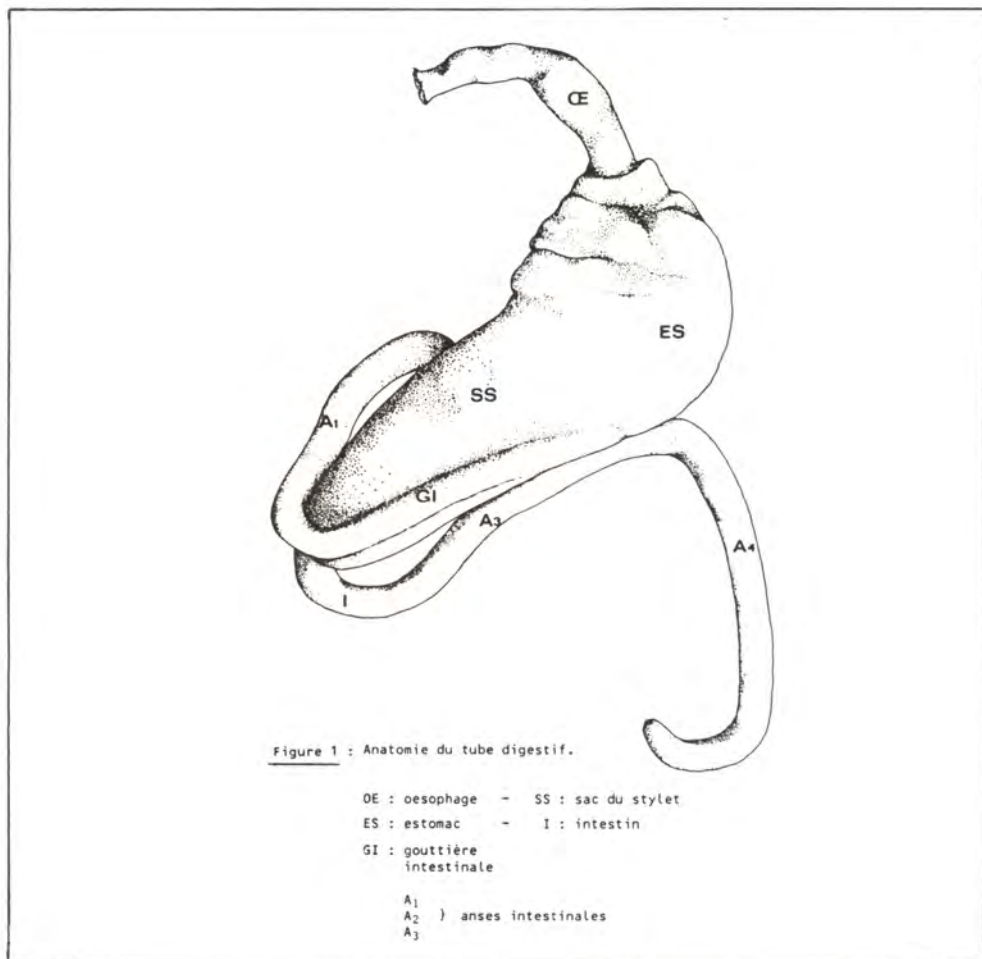




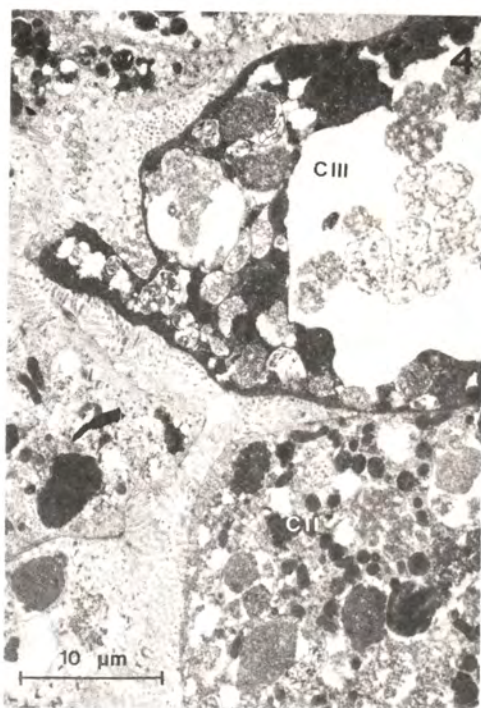
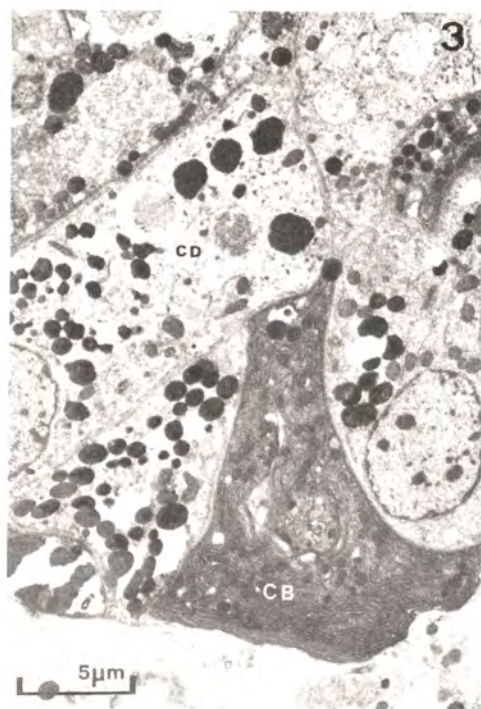
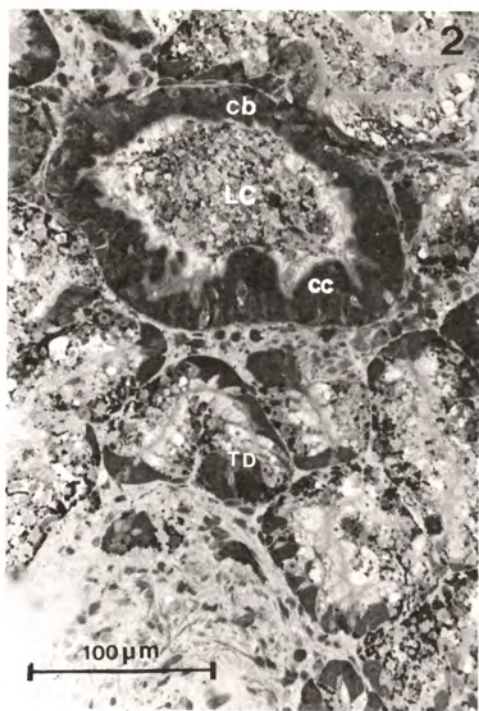
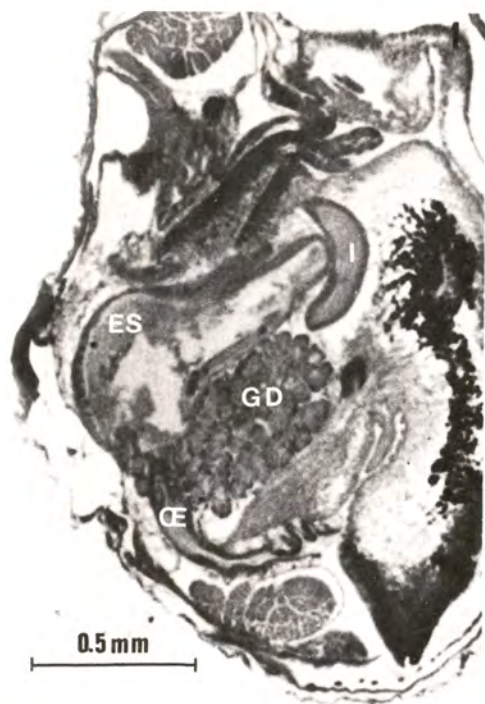
PLANCHE 1 :

Figure 1 - Coupe sagittale d'un juvénile de *Ruditapes philippinarum*.

Figure 2 - Coupe semi fine de la glande digestive.  
Tubule digestif (TD) ; cellule ciliée (CC) ; cellule à  
bordure en brosse (CB) ; lumière du conduit (LC).

Figure 3 - Tubule digestif (TD) ; cellule basophile (CB) ; cellule  
digestive au stade I (CI).

Figure 4 - Région apicale de cellules digestives au stade II et III  
(C II, C III).



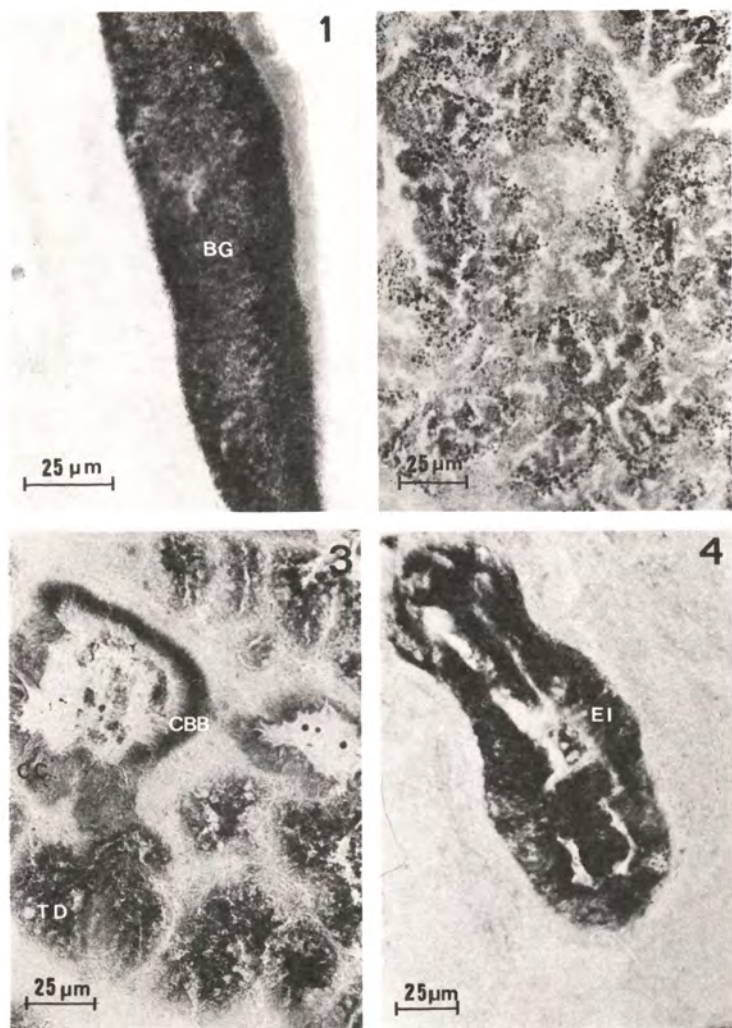


PLANCHE 2 :

Figure 1 - Activité chymotrypsique dans le bouclier gastrique (BG)

Figure 2 -  $\alpha$  D glucosidase dans la glande digestive.

Figure 3 - Coupe de la glande digestive.

La phosphatase est visible dans les cellules à bordure en brosse des conduits.

Figure 4 - Activités estérasiques dans l'épithélium intestinal et dans les résidus de digestion 12 h après l'alimentation.



### 3. Evolution de la glande digestive au cours de la digestion

La glande digestive représente un site important de la digestion chez les bivalves. Sa structure a été étudiée de façon plus précise. Elle est constituée d'un réseau de conduits dont l'épithélium est formé de cellules à bordure en brosse et de cellules ciliées (Planche 1, Figure 2). Les conduits s'ouvrent sur des tubules composés de plusieurs catégories cellulaires (Planche 1, Figure 3) : Des cellules pyramidales présentant les caractéristiques d'une cellule sécrétrice ; appareil de Golgi et ergastoplasme très développé. Des cellules digestives remarquables par leur système vacuolaire très développé. Le matériel exogène entre par pinocytose. Il est soumis à l'action d'enzymes hydrolytiques dans des vacuoles de type hétérolysosomes. Cette digestion intravacuolaire entraîne la formation de déchets concentrés dans des vacuoles très pigmentées : les corps résiduels.

L'étude ultrastructurale met en évidence dans un tubule digestif des cellules digestives à des stades d'évolution différents. Elles sont plus ou moins chargées en corps résiduels, les cellules proches du fond des cryptes en contiennent très peu tandis que les cellules centrales en sont abondamment pourvues. Ces variations ont conduit à une classification arbitraire des cellules digestives en trois stades :

- I peu de corps résiduels
- II abondance de corps résiduels (Planche 1, Figure 4)
- III la région apicale de la cellule est transformée en une macrovacuole qui sera expulsée (Planche 1, Figure 4).

Le dénombrement des cellules digestives aux différents stades montre une évolution de la glande digestive pendant la digestion (Tableau 3). Pendant les dix premières heures, les cellules au stade I sont le lieu de digestion intracellulaire, elles se chargent en corps résiduels et se transforment en stade II. La proportion de cellules au stade III reste faible, elle reste inférieure à 25 %. Une diminution sensible est notée entre 12 et 15 heures.

### 4. Etude histoenzymologique

Des activités enzymatiques liées à la digestion ont été recherchées dans différentes régions du tube digestif chez des animaux nourris régulièrement. Les résultats sont notés dans le tableau 4.

Des observations complémentaires ont été réalisées dans un lot composé d'animaux ayant subi un jeûne de 3 jours avant d'être nourris à nouveau pendant une heure. L'apparition des activités enzymatiques a été étudiée pendant 24 heures.

- . Des activités enzymatiques extracellulaires ont été observées, notamment des lipases et de faibles quantités de protéases. Ces dernières sont visibles au bout de 15 h après l'ingestion de nourriture dans les conduits de la glande digestive, le sac du stylet et l'intestin. La plus forte activité est représentée par l'Amylase localisée dans l'estomac, le sac du stylet et la glande digestive (conduits et tubules) dès le début de la digestion.
- . Les autres enzymes recherchées présentent une localisation intracellulaire ou en liaison avec les bordures en brosse.

ENZYME	SUBSTRAT	SEL DE TETRAZOLIUM	AUTEUR
Chymotrypsine	Propionate de Naphtol AS	Fast Garnet GBG	Lagunoff (1967)
Trypsine	N <sup>α</sup> benzoyl arginine β naphthylamide hydrochloride	Fast Garnet GBG	Glenner et Cohen (1960)
Aminopeptidase I	L Leucyl 4 methoxy 2 naphthylamide	Fast blue B	Moore (1980)
Phosphatase acide	α naphthyl phosphate de sodium	Fast Garnet GBG	Grogg et Pearse (1952)
Phosphatase alcaline	α naphthyl phosphate de sodium	Fast Blue B	Gomori (1951)
Esterases non spécifiques	Acétate α naphthyl	Fast blue B	Burstone (1956)
α D glucosidase	6 bromo. 2 naphthyl α D gluco pyranoside	Fast blue B	Rutenburg et al. (1959)
N acetyl β glucosaminidase	Naphtol AS BI gluco-saminidase	Fast red violet	Moore (1976)
β glucuronidase	Naphtol AS BI gluco-ronide	Fast red violet	Moore (1976)

Tableau 1 : Techniques de précipitation pour la recherche d'activités enzymatiques.

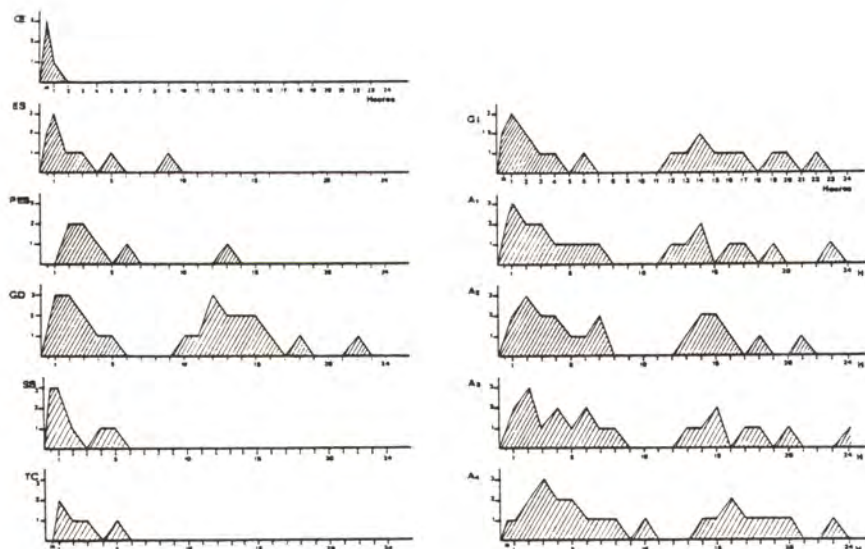


TABLEAU 2 - Localisation de matériel dans les différentes régions du tube digestif pendant 24 heures après l'alimentation. Le niveau de remplissage est noté selon une échelle de 0 à 3 (absent ou non vu, faible, moyen, beaucoup).

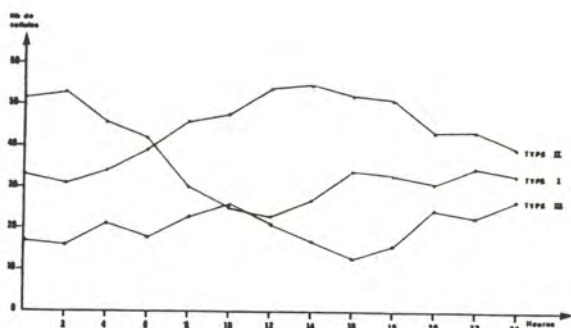


TABLEAU 3 - Evolution des cellules digestives aux trois stades pendant 24 heures après une prise de nourriture.

		Amylase	$\alpha$ D glucosidase	$\beta$ glucurodinase	N acetyl $\beta$ Glucosaminidase	phosphatase acide	phosphatase alcaline	Esterases	Lipases	Protéases	Chymotrypsine	Amino-peptidase I
ESTOMAC	Lumière estomac	•							•	•		
	Epithelium stomacal		•			•		•			•	•
	Epithelium bouclier gastrique	•	•	•	•	•	•	•			•	•
SAC DU STYLET	Epithelium sac du stylet							•			•	
	Typhlosole					•		•				
	Tige cristalline	•							•	•		
INTESTIN	Gouttière intestinale			•	•	•	•	•			•	•
	Intestin			•	•	•	•	•			•	•
	Lumière intestin	•						•		•		•
GLANDE DIGESTIVE	Lumière conduit	•						•	•	•		
	cellule ciliée		•	•	•	•		•			•	•
	cellule à bordure en brosse		•	•	•	•	•	•	•		•	•
	cellule basophile							•			•	
	cellule digestive	•	•	•	•	•		•			•	•

Tableau 4 - Activités enzymatiques dans le tube digestif de *Ruditapes philippinarum*.



- Enzymes protéolytiques

Chymotrypsine.

Les activités chymotrypsiques réduites par le jeûne augmentent dès l'entrée de la nourriture au niveau de l'épithélium stomacal, du bouclier gastrique (Planche 2, Fig. 1) et des conduits de la glande.

Au bout de 3 heures la gouttière intestinale et l'intestin sont le siège d'une forte réaction ainsi que les cellules des tubules digestifs.

Amino-peptidase 1

Les activités amino-peptidasiques apparaissent vers 3 à 4 h. Elles sont visibles dans les cellules du bouclier gastrique, l'épithélium des conduits de la glande digestive et l'épithélium intestinal où l'essentiel des réactions est associé avec les bordures en brosse et des granules cytoplasmiques.

Dans les cellules digestives, l'activité se situe dans les vacuoles digestives.

- Enzymes glycolytiques

α D glucosidase

Cette enzyme scinde les unités de maltose provenant de la dégradation des polysaccharides après l'action de l'amylase. L'activité est visible dans les cellules digestives au bout de 4 à 5 h (Planche 2, Fig. 2).

n Acetyl glucosaminidase

L'activité apparaît vers 4 heures. Cette enzyme est localisée dans l'épithélium du bouclier gastrique et dans les tubules digestifs où elle est associée aux vacuoles digestives.

- Phosphatases

Phosphatase acide

L'alimentation entraîne une augmentation générale des réactions en particulier dans les conduits de la glande digestive où la région apicale des cellules à bordure en brosse montre une forte activité (Planche 2, Fig. 3). La réaction s'intensifie de la même façon dans la bordure apicale du typhlosole majeur.

Dans les cellules digestives et l'épithélium du bouclier gastrique, la réaction s'étend à l'ensemble de la cellule, vers 6 heures elle est visible à la fois dans le cytoplasme et dans les vacuoles. A partir de 12 h lors de la phase importante d'expulsion des corps résiduels, on constate une activité phosphatase dans les résidus de digestion libérés dans les conduits.

### Phosphatase alcaline

La distribution de la phosphatase alcaline est limitée aux bordures en brosse des épithéliums de l'estomac, du bouclier gastrique, des conduits de la glande digestive et de la gouttière intestinale. L'activité n'évolue pas au cours de la digestion

### - Estérases

Les activités estérasiques augmentent rapidement dès l'apport de nourriture. Elles sont notées dans l'ensemble du tractus digestif. Les résidus de digestion montrent également une forte activité estérasique (Planche 2, Fig. 4).

### DISCUSSION

Les résultats des expériences permettent de cerner les activités suivant une prise de nourriture dans le tube digestif de *Ruditapes philippinarum*.

Les processus de digestion n'intéressent qu'une faible partie du volume ingéré car une grande quantité d'algues traverse le tube digestif sans être altérées.

La glande digestive joue un rôle très important, notamment dans la digestion intracellulaire. Des variations morphologiques des tubules digestifs ont été observées chez de nombreuses espèces comme *Mytilus edulis* (Owen, 1972), *Pecten maximus* (Mathers, 1976), *Chlamys varia* (Mathers et al., 1979). Elles indiquent une rythmicité de la digestion liée à l'apport de nourriture. Chez *Ruditapes philippinarum* des variations de la glande digestive sont mises en évidence en étudiant la structure des cellules digestives. En effet, les tubules digestifs sont composés de cellules à des stades d'évolution différents. Une telle hétérogénéité a été observée par Palmer (1979) chez *Arctica islandica* où il décrit une organisation identique avec des cellules en voie de dégénérescence au centre du tubule. Les trois stades cellulaires sont visibles à tout moment, mais leurs proportions évoluent au cours de la digestion. L'augmentation des cellules au stade II jusqu'à 12 heures traduit une intensité accrue de la digestion intracellulaire.

La quantité de cellules au stade III reste toujours faible ; l'émission des macrovacuoles est progressive et ne concerne qu'un faible nombre de cellules évitant la destruction complète du tubule.

L'augmentation du nombre de cellules au stade III entre 18 h et 24 h, alors que des résidus de digestion continuent d'être évacués, suggère un autre mode d'expulsion des corps résiduels qui sont émis de façon continue.

L'étude histoenzymologique confirme l'importance de la digestion intracellulaire chez *Ruditapes philippinarum*. L'amylase présente dès le début de la digestion assure une première attaque des polysaccharides contenus dans les algues ingérées.

La digestion est ensuite réalisée de façon intracellulaire, la dégradation des glucides se poursuivant dans la glande digestive dans les cellules à bordure en brosse des conduits et dans les cellules digestives par l'action d'enzymes comme l' $\alpha$  D glucosidase.



La présence de la N acetyl glucosaminidase, de phosphatase acide et de l'aminopeptidase I identifiées comme des hydrolases lysosomales, Moore (1976), dans les vacuoles des cellules digestives est en accord avec l'importance du système lysosomal dans ces cellules.

Leur existence dans les granules des cellules du bouclier gastrique et intestinal indique un rôle de ces épithéliums dans la digestion.

La phosphatase alcaline localisée dans les bordures en brosse témoigne de processus d'absorption au niveau du bouclier gastrique, des conduits de la glande digestive ainsi que la gouttière intestinale.

#### CONCLUSION

La digestion comporte différentes phases chez *Ruditapes philippinarum* :

- Une phase extracellulaire. Pendant cette période, les algues ingérées subissent l'action d'enzymes comme l'amylase et des lipases dans la lumière de l'estomac, du sac du stylet et les conduits de la glande digestive.

- Une phase intracellulaire intervenant par les processus suivants :

. Absorption et phagocytose au niveau de la glande digestive, de la paroi stomacale et probablement de l'épithélium intestinal.

. Digestion intracellulaire par les hydrolases lysosomales associées au système vacuolaire.

Les activités de digestion intracellulaire et d'évacuation des résidus de la digestion sont concomitantes dans l'ensemble de la glande digestive. Elles mettent en évidence une continuité de la digestion chez les juvéniles de *Ruditapes philippinarum*, avec des phases d'activités plus intenses liées à l'apport de nourriture.

- 
- GLENNER & COHEN, 1960 - Histochemical demonstration of a species-specific trypsin like enzyme in mast cells.  
*Nature*, 185 : 846-847.
- LAGUNOFF D., 1967 - Histochemistry of proteolytic enzymes.  
*Meth. Achiev. exp. Path.*, 2 : 55-77.
- MATHERS N., 1976 - The effects of tidal currents on the rhythm of feeding and digestion in *Pecten maximus*.  
*J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 24 : 271-283.
- MATHERS N & al, 1979 - Monophasic and diphasic digestive cycles in *Venerupis decussata* and *Chlamys varia*.  
*J. Moll. Stud.*, 45 : 68-81.
- MOORE M.N., 1976 - Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress.  
*Cell. Tiss. Res.*, 175 : 279-287.
- MOORE M.N., KOEHN R.K. & BAYNE B.L., 1980 - Leucine Aminopeptidase (Aminopeptidase 1), N-Acetyl- $\beta$  hexosaminidase and lysosomes in the mussel, *Mytilus edulis*, in response to salinity changes.  
*J. Exp. Zool.*, 214 : 239-249.
- OWEN G., 1972 - Lysosomes, peroxisomes and bivalves.  
*Sci. Prog. Oxf.*, 60 : 299-318.
- PALMER R., 1979 - A histological and histochemical study of digestion in the bivalve *Arctica islandica*.  
*Biol. Bull.*, 156 : 115-129.
- RUTENBURG A.M., GOLDBERG T.A., RUTENBURG S.H., LANG R.T., 1959 - The histochemical demonstration of  $\alpha$ -D glucosidase in mammalian tissues.  
*J. Histochem. Cytochem.*, 8 : 268-272.



BILAN ENERGETIQUE D'UNE POPULATION  
NATURELLE DE *CREPIDULA FORNICATA* (L.) DANS  
LE BASSIN DE MARENNES-OLÉRON.

DESLOUS-PAOLI\* J.M., HERAL\* M., MASSE\*\* H.

\* Laboratoire cultures marines, I.S.T.P.M., B.P. 133, 17390 LA TREMBLADE.

\*\*Station Marine d'Endoume, LA 41, 13007 MARSEILLE.

ABSTRACT : An energy budget for a natural population of *Crepidula fornicata* in Marennes-Oléron.

An energy budget has been evaluated for a natural population of *Crepidula fornicata* living at low water of spring tides in the oyster farming basin of Marennes-Oléron. This budget of production was estimated according to the position along the chain. The average biomass for an individual representative of the population was equivalent to 1.87 Kjoules, and the annual consumption C was 20.08 Kjoules/year. The energy budget expressed in percent of energy consummate was :

$$C = P_g + P_r + P_s + R + F$$
$$100 = 4.6 + 1.6 + 0.8 + 48 + 45$$

This budget is compared with literature data on other herbivorous gastropods and with those calculated for *Crassostrea gigas* in the same locality.

RESUME :

Un bilan énergétique a été calculé pour une population naturelle de *Crepidula fornicata* vivant à la limite inférieure de la zone intertidale dans le bassin de Marennes-Oléron. Le bilan de production est calculé en fonction de la position des individus dans les associations en chaîne. Pour un individu représentatif de la population de biomasse équivalente à 1,87 Kjoules, la consommation annuelle C est de 20,08 Kjoules/an. Le bilan énergétique exprimé en pourcentage de l'énergie consommée est :

$$C = P_g + P_r + P_s + R + F$$
$$100 = 4,6 + 1,6 + 0,8 + 48 + 45$$

Ce budget est comparé avec ceux d'autres gastéropodes phytophages ainsi qu'avec ceux établis pour *Crassostrea gigas* dans le même secteur.

MOTS-CLES : *Crepidula fornicata*, bilan énergétique, bassin de Marennes-Oléron.

KEY-WORDS : *Crepidula fornicata*, energy budget, basin of Marennes-Oléron.

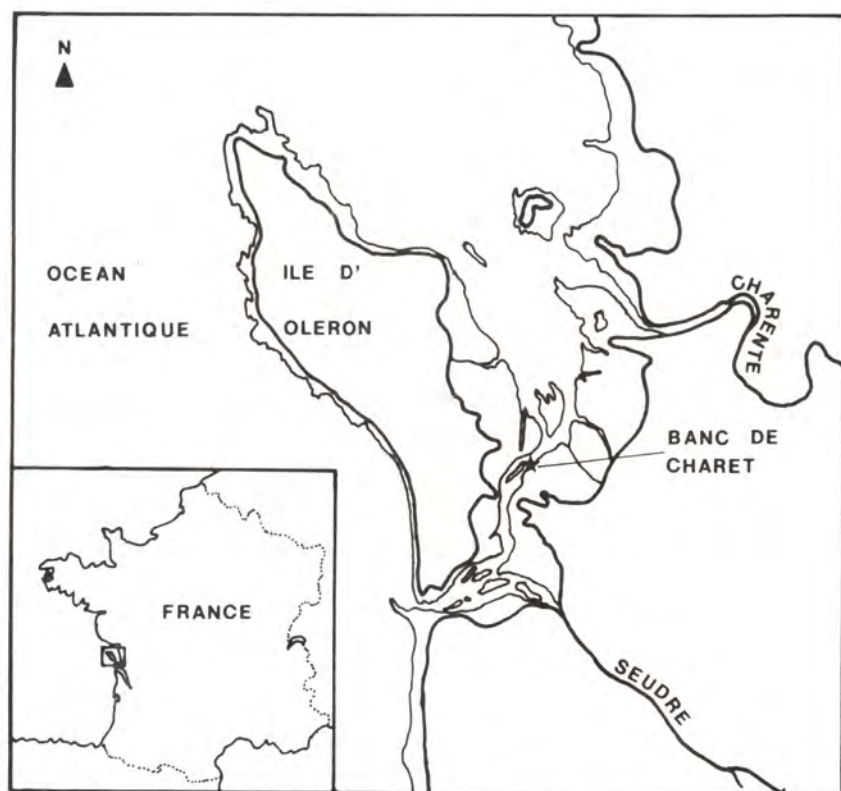


Figure 1 : Carte du bassin de Marennes-Oléron, situation des prélèvements sur le banc de Charret.

## INTRODUCTION

Dans le bassin de Marennes-Oléron (fig. 1), les populations cultivées représentent un stock d'environ 100 000 tonnes de *Crassostrea gigas* (Berthomé et al., 1981), auquel il faut ajouter près de 6 000 tonnes de *Mytilus edulis* (Boromthanasarat, com. pers.). Des populations de mollusques filtreurs sauvages occupent les secteurs subtidaux et intertidaux utilisés ou non pour l'élevage. Elles sont composées d'environ 3 700 tonnes de *Crepidula fornicata* (Deslous-Paoli, 1982), ainsi que d'une biomasse non déterminée de *Cerastoderma edule*, *Scrobicularia plana*, *Donax vittatus*, etc... (Massé et Lagardère, 1981). Ces espèces se retrouvent en compétition sur le plan trophique avec *Crassostrea gigas*.

Dans la perspective d'une gestion du bassin et d'une optimisation de la production des espèces cultivées, l'évaluation des biomasses énumérées ci-dessus reste à affiner et la dynamique de ces populations à préciser. Il convient aussi d'aborder la compétition trophique stricte entre ces différents mollusques filtreurs, et de décrire les bilans énergétiques concernant ces diverses populations *in situ*.

La détermination des flux d'énergie nécessaires pour des populations d'huîtres *Crassostrea gigas* âgées respectivement d'un et deux ans (Deslous-Paoli et Héral, 1983 ; Héral et al., 1983) a été faite à partir de l'évolution de la nourriture potentielle disponible dans le bassin de Marennes-Oléron (Héral et al., 1983). Dans le présent article, le bilan énergétique d'une population de *Crepidula fornicata* est comparé, d'une part, aux données de la littérature, d'autre part, aux résultats obtenus sur *Crassostrea gigas*.

## MATERIELS ET METHODES

A partir de prélèvements, d'environ 700 individus, réalisés sur le terrain, tous les deux mois, le calcul du bilan énergétique de *Crepidula fornicata* se fera en utilisant l'équation définie par Winberg (1960) et précisée par Phillipson (1981) et Lucas (1982),  $A = P + R = C - (F + U)$  soit Assimilation = Production + Respiration = Consommation - (Fèces + Urines) dans laquelle les productions peuvent être décomposées en  $P = P_g + P_s + P_r + P_e$  soit Production = Croissance tissulaire + Reproduction + Sécrétion + Tissus éliminés. Ces productions seront calculées par individu en fonction de la position moyenne dans les chaînes, la numérotation des positions ayant été faite à partir de la position apicale vers les positions basales.

Les productions  $P_g, P_r, P_s, P_e$  :

Des régressions fonctionnelles ont été calculées à partir des résultats obtenus sur le terrain entre la longueur curviligne et la valeur énergétique de la chair sèche, et, entre la longueur curviligne et la valeur énergétique de la coquille. Dans le premier cas, la valeur énergétique est mesurée grâce à un microcalorimètre du type de celui décrit par Phillipson (1964), selon le protocole utilisé par Héral et Deslous-Paoli (1983). Dans le deuxième cas, la valeur énergétique de la coquille est obtenue en appliquant au poids de matière organique contenue dans la coquille, mesuré après calcination à 450°C pendant 24 heures, le coefficient 21,09 Kjoules/g défini par Hughes (1970) sur la coquille de *Scrobicularia plana*. L'effort de reproduction est défini par comptage de nombre moyen d'oeufs en fonction de la position dans la chaîne. Ce nombre est multiplié par la valeur énergétique moyenne mesurée par microcalorimétrie (22,37 joules/mg sans cendre) pour des pontes de 33 mg de chair sèche en moyenne composées de 11 725 oeufs, puis pondéré par le pourcentage d'animaux présentant des pontes en fonction de leur position dans les chaînes. Les productions sont exprimées par la différence entre la valeur énergétique au temps



considéré et celle définie au contrôle la précédant, divisées par le nombre de jours qui les sépare.

Le bilan de la population :

En pondérant les résultats obtenus pour les production en fonction de la position dans les chaînes, par le pourcentage moyen d'individus occupant les différentes positions dans la population, les productions sont calculées pour un individu moyen représentatif de la population dans son ensemble, toutes tailles confondues.

Nous calculerons de la même façon, à partir des résultats présentés par Newell et Kofoed (1977) pour *Crepidula fornicata* en fonction de la température de l'eau, la consommation d'oxygène de cet "individu moyen". Pour l'estimation de la dépense métabolique, un coefficient de 20,22 joules par ml d'oxygène (Dame, 1976) est appliqué pour la conversion. Les bancs de crépidules sont supposés immerger 24 heures sur 24, ce qui se passe pour 90 % du temps.

La quantité de fèces et pseudofèces émise par la population est déterminée *in situ* par la méthode de Sornin et al. (1982). Leur valeur énergétique est déterminée par le dosage des protéines selon la méthode de Lowry et al. (1951), le dosage des glucides selon la méthode de Dubois et al. (1956) et le dosage des lipides selon le protocole de Marsh et Weinstein (1966), auxquels seront appliqués respectivement les coefficients de conversion de 23,65 joules/mg, 17,17 joules/mg et 39,56 joules/mg (Brody, 1945).

L'énergie émise par les urines ne sera pas prise en compte dans ce travail, ainsi que celle perdue par les tissus éliminés et l'excrétion de mucus. Le bilan sera calculé par "individu moyen" et par jour, et exprimé en joules. Le rendement d'assimilation A/C sera calculé selon la définition de Mac Fadyen (1966). Le rendement net de croissance tissulaire Pg/(A-Pg) sera estimé selon la formule de Lucas et Shafee (1983).

## RESULTATS

Relation âge-position :

Il existe une concordance entre l'âge et la position pour les trois années déterminées au mois de mars 1983 (tableau 1). Mais il apparaît un décalage de cette correspondance au mois de juin (tableau 2), sans doute en liaison avec la fixation de juvéniles en position apicale.

Tableau 1 : Correspondance âge (strie d'accroissement) et position dans les chaînes pour *Crepidula fornicata* en mars 1983.

STRIES \ POSITION	POSITION									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1									
1	<u>19</u>	6	1							
2	14	<u>17</u>	10	4	1					
3	3	7	<u>12</u>	7	1					
4 et plus		5	8	<u>15</u>	<u>14</u>	9	5	3	1	1

Tableau 2 : Correspondance âge (strie d'accroissement et position dans les chaînes pour *Crepidula fornicata* en juin 1982.

STRIES	POSITION									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	7									
1	40	49	9							
2	37	19	45	15	3					
3		1	30	36	32	20	3			
4 et plus		1	4	20	27	27	24	14	8	1

Production de tissu : Pg

A partir des régressions fonctionnelles longueurs-valeur énergétique de la chair définies tous les deux mois (tableau 3), il est possible de calculer la valeur énergétique des individus de *Crepidula fornicata* (tableau 4) ainsi que les productions qui en découlent (tableau 5). On constate une perte d'énergie quelle que soit la position sur la chaîne aux mois d'octobre et décembre.

Tableau 3 : Régression fonctionnelle entre la longueur curviligne  $L_c$  (mm) et la valeur énergétique de la chair sèche sans cendre  $E_{ch}$  (Kjoules) pour *Crepidula fornicata*

$$E_{ch} = a L_c^b$$

Date	n	a	b	r
13.11.81	12	$4,0 \cdot 10^{-5}$	2,696	0,977
11.01.82	14	$1,54 \cdot 10^{-4}$	2,341	0,966
26.04.82	18	$5,17 \cdot 10^{-4}$	2,032	0,969
23.06.82	15	$8,79 \cdot 10^{-4}$	1,978	0,940
19.08.82	15	$2,33 \cdot 10^{-4}$	2,398	0,981
18.10.82	14	$2,03 \cdot 10^{-4}$	2,415	0,961
1.12.82	15	$3,15 \cdot 10^{-5}$	2,827	0,986

Par contre, ce phénomène ne touche que les positions les plus basales (à partir de la position 5) aux mois de janvier et avril. Le bilan annuel par position est négatif pour la position apicale, sans doute à cause des différentes fixations de juvéniles qui ont lieu surtout en juin et en septembre (Deslous-Paoli, 1982). La production annuelle de chair reste relativement stable à partir de la position 5.

Production de coquille : Ps

A partir de la régression fonctionnelle, Energie coquille = 0,13  $L_c^{2,262}$  ( $n = 36$ ,  $r = 0,993$ ) où  $L_c$  est la longueur curviligne, l'équivalent

Tableau 4 : Quantité d'énergie moyenne de la chair sèche sans cendre de *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans les chaînes. Bg : biomasse énergétique moyenne par position. Valeurs exprimées en Kjoules.

POSITION	13.11.81	11.01.82	26.04.82	23.06.82	19.08.82	18.10.82	01.12.82	Bg
1	0,10	0,16	0,23	0,30	0,30	0,26	0,10	0,21
2	0,32	0,44	0,60	0,87	1,17	0,99	0,55	0,70
3	0,78	0,97	1,26	1,72	2,69	2,07	1,51	1,57
4	1,59	1,72	1,98	2,72	4,16	3,69	2,75	2,66
5	2,36	2,23	2,39	3,27	5,38	4,73	4,12	3,50
6	2,76	2,50	2,86	3,69	6,17	5,24	4,68	3,99
7	3,08	2,74	2,73	4,25	6,21	5,81	5,40	4,32
8	3,23	3,03	2,82	4,36	6,92	6,64	5,66	4,66
9	3,55	3,39	3,25	4,36	7,14	6,93	5,93	4,93

Tableau 5 : Bilan journalier de la production énergétique de la chair (Pg) de *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans les chaînes. Valeurs exprimées en joules.

POSITION	11.01.81	26.04.82	23.06.82	19.08.82	18.10.82	01.12.82	Annuel
1	0,98	0,70	1,21	-0,07	-0,74	-3,63	-5,4
2	2,08	1,52	4,54	5,29	-3,01	-10,04	225,3
3	3,17	2,72	7,94	16,96	-10,21	-12,86	720,5
4	2,19	2,45	12,68	25,35	-7,92	-21,37	1 151,8
5	-2,19	1,54	15,05	57,32	-10,81	-13,98	2 909,1
6	-4,40	3,38	14,40	43,46	-15,50	-12,79	1 915,3
7	-5,80	-0,16	26,31	34,49	-6,80	-9,23	2 313,7
8	-3,45	-1,98	26,56	44,90	-4,61	-22,25	2 432,8
9	-2,77	-1,37	19,11	48,89	-3,64	-22,62	2 375,0



énergétique de la biomasse représentée par la coquille peut être calculé (tableau 6), ainsi que les bilans journaliers qui en découlent (tableau 7). Les bilans négatifs calculés pour la position apicale ont sans doute les mêmes causes que celles évoquées pour la production des tissus. Ce phénomène se retrouve pour les autres positions, surtout aux mois d'octobre et de décembre.

Tableau 6 : Quantité d'énergie moyenne de la matière organique de la coquille pour *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans les chaînes. Bs : biomasse énergétique moyenne par position. Valeurs exprimées en Kjoules

POSITION	13.11.81	11.01.82	26.04.82	23.06.82	19.08.82	18.10.82	01.12.82	Bs
1	0,09	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,08	0,10
2	0,25	0,29	0,34	0,35	0,41	0,37	0,32	0,33
3	0,52	0,62	0,77	0,76	0,89	0,75	0,73	0,72
4	0,94	1,07	1,28	1,29	1,35	1,28	1,18	1,20
5	1,32	1,38	1,58	1,59	1,72	1,62	1,63	1,55
6	1,50	1,54	1,93	1,83	1,95	1,78	1,80	1,76
7	1,64	1,68	1,83	2,15	1,97	1,96	2,02	1,89
8	1,72	1,85	1,90	2,21	2,17	2,22	2,10	2,02
9	1,85	2,06	2,22	2,21	2,24	2,31	2,18	2,15

Tableau 7 : Bilan journalier de la production énergétique de la coquille (Ps) de *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans les chaînes. Valeurs exprimées en joules.

POSITION	11.01.81	26.04.82	23.06.82	19.08.82	18.10.82	01.12.82	Annuel
1	0,21	0,11	-0,21	0,12	-0,12	-0,56	-13,8
2	0,72	0,49	0,16	1,02	-0,40	-1,12	87,4
3	1,61	1,49	-0,18	2,24	-2,40	-0,40	207,4
4	2,17	1,98	0,09	1,07	-1,10	-2,31	234,1
5	1,03	1,96	0,09	2,21	-1,63	0,28	312,5
6	0,65	3,71	-1,72	2,19	-2,86	0,53	305,2
7	0,60	1,42	5,50	-3,19	-0,09	1,44	379,5
8	2,26	0,47	5,38	-0,61	0,79	-2,72	387,9
9	3,54	1,52	-0,21	0,58	1,14	-2,94	328,5

Production de gamètes : Pr

L'effort de reproduction a été calculé pour les mois d'avril, de juin et d'août (tableau 8). En sachant qu'une femelle peut pondre deux fois à six semaines d'intervalle (Le Gall, 1980), les valeurs obtenues avec un intervalle de deux mois ne devraient pas prendre en compte deux fois la même ponte. A noter que le poids sec moyen de 33 mg évalué pour une ponte est proche des 36 mg mesurés par Pandian (1969). Ces estimations permettent de dresser le bilan journalier moyen pour la période considérée, en tenant compte de la position des individus dans les chaînes (tableau 9).

Tableau 8 : Nombre d'oeufs (n), valeur énergétique (E) par ponte, pourcentage de crépidules portant des pontes, et effort de reproduction moyen pour *Crepidula fornicata* en fonction de la position dans les chaînes  $\bar{E}r$  : biomasse énergétique moyenne par position. Valeurs exprimées en Kjoules.

POSITION	n	E	% de crépidule avec des oeufs			effort de reproduction			$\bar{E}r$
			26.4	23.6	19.8	26.4	23.6	19.8	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	9 720	0,61	7,2	1,7	3,1	0,04	0,01	0,02	0,02
3	9 048	0,57	18,5	13,4	6,8	0,11	0,08	0,04	0,07
4	11 774	0,74	25,0	31,8	9,3	0,19	0,24	0,07	0,16
5	9 648	0,61	34,4	52,2	20,6	0,21	0,32	0,13	0,22
6	11 700	0,74	33,3	51,1	19,6	0,25	0,38	0,14	0,26
7	11 984	0,75	31,3	63,0	33,3	0,24	0,47	0,25	0,32
8	12 824	0,81	27,3	46,2	15,8	0,22	0,37	0,13	0,24
9	12 090	0,76	57,1	100	46,2	0,43	0,76	0,35	0,52

Cette production est maximale au mois de juin, elle augmente au fur et à mesure du vieillissement des individus.

Production : P

La production journalière totale ( $P = P_g + P_s + P_r$ ) est déficitaire pendant les mois d'octobre et décembre pour tous les individus, alors qu'elle ne l'est que pour les positions comprises entre 5 et 8 au mois de janvier (tableau 10).

Comme nous l'avons signalé le recrutement estival entraîne une valeur négative de la production annuelle de la position apicale.

Tableau 9 : Bilan journalier de la production énergétique dû à l'effort de reproduction (Pr) de *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans les chaînes. Valeurs exprimées en joules.

POSITION	11.01.81	26.04.82	23.06.82	19.08.82	18.10.82	01.12.82	Annuel
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	0,42	0,18	0,33	-	-	73,2
3	-	1,00	1,31	0,68	-	-	220,4
4	-	1,77	4,06	1,21	-	-	489,4
5	-	2,00	5,47	2,19	-	-	651,7
6	-	2,33	6,48	2,52	-	-	765,2
7	-	2,24	8,18	4,40	-	-	961,2
8	-	2,10	6,43	2,24	-	-	721,2
9	-	4,13	13,10	6,17	-	-	1545,7

Tableau 10 : Production journalière moyenne (P) pour *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans les chaînes.  $P = Pr + Pg + Ps$  en joules.

POSITION	11.01.82	26.04.82	23.06.82	19.08.82	18.10.82	01.12.82	Annuel
1	1,19	0,81	1,00	0,05	-0,86	-4,19	-20,0
2	2,80	2,44	4,87	6,64	-3,42	-11,16	385,9
3	4,78	5,20	9,07	19,88	-12,61	-21,78	773,3
4	4,36	6,20	16,84	27,63	-9,02	-23,68	1 876,2
5	-1,16	5,50	20,60	61,72	-12,44	-13,70	3 873,2
6	-3,75	9,42	19,17	48,18	-18,36	-12,26	2 985,0
7	-5,20	3,50	39,99	35,60	-6,88	-7,80	3 653,6
8	-1,19	0,60	38,37	46,53	-3,82	-24,96	3 542,1
9	0,77	4,29	32,01	55,64	-2,51	-25,56	4 248,9



### Bilan énergétique de la population

En tenant compte des pourcentages respectifs d'individus occupant en moyenne chaque position (tableau 11), il est possible de pondérer les bilans énergétiques de productions obtenus pour chaque position durant l'année. Ensuite, un bilan peut être calculé pour un "individu moyen" représentatif de l'ensemble de la population toute taille confondue (tableau 12).

Tableau 11 : Pourcentage moyen de *Crepidula fornicata* située aux différentes positions dans les chaînes, dans une population.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pourcentage	30,9	16,9	13,9	11,7	9,5	6,9	4,9	3,2	2,0
Ecart-type	4,1	1,8	1,6	1,3	1,2	0,5	0,8	0,7	0,6

Tableau 12 : Bilan énergétique journalier et annuel pour un "individu moyen" de *Crepidula fornicata*. Valeurs exprimées en joules. Rendement net de croissance tissulaire (P/(A-Pg)) et rendement d'assimilation (A/C).

	B	Pg	Ps	Pr	R	F	A	C	P/(A-Pg)	A/C
Janvier	1 140	0,4	1,0	0	17,2	31,8	18,6	50,4	0,022	0,37
Avril	1 290	1,4	1,1	1,0	18,9	24,5	22,5	47,0	0,066	0,48
Juin	1 700	8,7	0,3	2,5	28,6	14,3	40,1	54,4	0,277	0,74
Août	2 760	18,7	0,8	1,1	34,6	21,3	55,3	76,6	0,510	0,72
Octobre	2 410	-5,7	-0,9	0	33,0	24,1	26,4	50,5	-0,02	0,52
Décembre	1 930	-10,9	-0,7	0	24,4	25,1	11,6	36,7	-0,484	0,32
Annuel	1 870	920	153	313	9 684	9 043	11 032	20 075	0,091	0,55

Pour un "individu moyen", la consommation moyenne d'oxygène calculée en fonction des températures de l'eau varie entre 0,85 et 1,71 ml d'oxygène/jour (tableau 13). La dépense métabolique R en résultant est de 9,68 Kjoules/an (tableau 12).

Les mesures *in situ* de biodéposition (tableau 14) sont vraisemblablement sous-estimées puisque les expériences avec les crépidules ont été faites à des profondeurs inférieures à celles où se trouvent les bancs naturels de *Crepidula fornicata*. La réaction par rapport au temps d'immersion n'est

donc pas prise en compte ici, bien que les valeurs aient été corrigées pour une immersion constante

Tableau 13 : Température de l'eau et consommation d'oxygène calculées par "individu moyen" de *Crepidula fornicata*. Valeurs en mg d'O<sub>2</sub>/jour.

Mois	Janvier	Avril	Juin	Août	Octobre	Décembre
Température C°	9	12	19	21,5	15	11,5
Consommation O <sub>2</sub>	0,85	0,94	1,41	1,71	1,63	1,21

La biodéposition saisonnière par "individu moyen" est plus forte en hiver (janvier-décembre) sans doute en relation avec les fortes turbidités du bassin de Marennes-Oléron (tableau 12).

Il apparaît ainsi que c'est au mois d'août que la consommation, l'assimilation et les productions de chair et de coquille sont maximum. La biodéposition étant la plus importante en période hivernale. Le rendement d'assimilation (A/C) peut donc atteindre 74 % en juin et chuter jusqu'à 32 % en décembre (moyenne 55 %), alors que le rendement net de croissance tissulaire (Pg/(A-Pg)) atteint son maximum en août (51 %), et devient négatif pendant l'automne. On voit ainsi qu'une *Crepidula fornicata*, représentative de la population et ayant une biomasse moyenne de 1,87 Kjoules, consomme annuellement 20,08 Kjoules. De cette énergie consommée, 45,1 pour cent sont biodéposés, 48 pour cent servent au métabolisme, 4,6 pour cent sont accumulés dans les tissus, 0,8 pour cent sont secrétés dans la coquille et 1,6 pour cent sont utilisés pour la formation des gamètes (tableau 15).

Tableau 14 : Energie contenue dans les biodépôts produits par gramme de chair sèche de *Crepidula fornicata* et par jour, estimée à partir de la somme des protéines, lipides et glucides. Valeurs exprimées en Kjoules.

Date	6.07.82	5.11.82	1.02.83	25.04.83
Kj/g/j	0,11	0,19	0,35	0,24

#### DISCUSSION

La relative bonne concordance observée entre les stries d'accroissement (âge) et la position des crépidules dans la chaînes (Orton, 1909 ; Coum, 1979), au mois de mars, n'existe plus dès qu'il y a fixation de juvéniles en position apicale. Les individus de la cohorte zéro étant alors en position un, le décalage est alors d'une année. Ce décalage tend à s'amoinrir jusqu'à



l'année suivante. Ainsi, nous raisonnerons ici, non en fonction de l'âge des individus, mais en fonction d'un vieillissement moyen représenté par la position des individus. Les bilans de production par position ne représenteront donc pas la croissance d'un individu, mais seulement le bilan d'une position ayant intégré, surtout la position apicale, la fixation de nouveaux individus à chaque reproduction. Cette fixation d'individus de petite taille entraîne une perte artificielle dans l'estimation de l'énergie pour ces positions, ce qui explique les chiffres négatifs obtenus pour la position apicale. Cette perte se faisant sentir de façon amortie pour les autres positions, les productions calculées sont positives mais sans doute sous-estimées par rapport à celles que l'on devrait obtenir en fonction de l'âge réel. Cependant le bilan annuel global d'un "individu moyen" et donc de la population ne devrait pas différer dans l'un et l'autre cas. Ce bilan est un bilan simplifié de la population puisque l'on considère ici le cas d'une association simple de neuf *Crepidula fornicata*, alors que dans la réalité des associations secondaires et tertiaires existent, et que parfois on peut compter jusqu'à plus de vingt individus par association.

Dans le cas d'une population supposée stable, la mortalité équilibre le recrutement, comme le signale Hughes (1971) pour *Fissurella barbadensis*. Nous considérons donc que, comme pour le recrutement, les mortalités qui touchent principalement les individus en position basale sont prises en compte dans le calcul du bilan annuel.

La mortalité et le recrutement peuvent expliquer les valeurs négatives de production touchant les positions intermédiaires et basales. En effet, comme le signale Coum (1979), c'est principalement pendant l'hiver que l'on peut constater des mortalités chez les crépidules âgées formant la base des chaînes, alors que chez les jeunes c'est pendant la période de croissance. D'autre part, il peut apparaître des cassures dans les chaînes (Le Gall, 1980) ce qui pourrait expliquer certaines valeurs négatives constatées pour les positions intermédiaires. Cependant, les différences de production observées entre les jeunes crépidules en position apicale (production positive) et les plus âgées, occupant les positions supérieures à cinq (production négative), en début d'année, correspondent à celles mises en évidence chez *Crassostrea gigas* cultivées dans la même région (Héral et al., 1983 ; Deslous-Paoli et Héral, 1983). Il semble donc que, comme pour les huîtres, à une période où les charges sestoniques sont fortes et leurs valeurs nutritives faibles (Héral et al., 1983), soit il n'y ait pas assez de nourriture sur le plan quantitatif pour des adultes, soit il se produise une utilisation différente de la nourriture disponible entre les jeunes et les adultes. Cette utilisation différente pourrait être liée soit à des critères de taille de particules filtrées, donc indirectement à des critères de qualité, soit à des besoins énergétiques différents liés à l'âge du changement de sexe. En effet, c'est lors de la 5ème année que ce changement devient effectif (Coum, 1979). C'est de même en 5ème position que l'on peut constater la maximum de production, ainsi que le rapport de production sur biomasse le plus élevé (0,73) (tableau 16).

Le rapport production sur biomasse varie, pour les autres positions entre 0,36 et 0,56 (moyenne 0,45) et correspond à ceux trouvés par Paine (1971) sur *Tegula funebris*, Hughes (1971) sur *Nerita* sp. et Wright et Hartnoll (1981) sur *Patella vulgata* (tableau 15). Il semble correspondre aux animaux dont le développement est pluri annuel. En effet, ce rapport est supérieur à 3,5 pour des organismes dont le développement s'effectue en deux ans (Richardson, 1975), et va en augmentant jusqu'à 11,5 pour des organismes présentant plus qu'une génération en un an. Cependant, la valeur de production est sans doute fortement sous-estimée, car la sécrétion du mucus n'est pas prise en compte dans ce travail. Cette sécrétion peut représenter 31 pour cent de l'énergie consommée chez *Ilyanassa obsoleta* (Edwards et Welsh, 1982), 12 pour



Tableau 15 : Bilan énergétique annuel, données bibliographiques calculées en pourcentage d'énergie consommée, et en pourcentage pour le rapport P/B. Comparaison avec *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. \* prise en compte de l'excrétion urinaire ; \*\* gastéropode d'eau douce ; \*\*\* Mollusques bivalves.

Espèces	A	F	R	Pg	Pr	Ps	P/B	Auteurs
<i>Crepidula fornicata</i>	55	45	48	4,6	0,8	1,6	45	Cet article
<i>Patella vulgata</i>	41	59*	31	4,0	-	6,0	47	Wright et Hartnoll, 1981
<i>Tegula funebris</i>	64	36	54	8,9	-	0,7	42	Paine, 1971
<i>Fissurella barbadensis</i>	34	66	25	8,1	-	0,9	410	Hughes, 1971a
<i>Littorina littoralis</i>	73	27	50	14,8	-	8,5	230	Wright, 1977
<i>Littorina irrorata</i>	14	86	13	1,0	-	-	-	Cammen et al., 1980
<i>Nerita tessellata</i>	40	60	35	3,4	-	1,5	78	Hughes, 1971b
<i>Nerita versicolor</i>	39	61	34	4,4	-	0,6	63	Hughes, 1971b
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	38	62*	6	0,3	0,03	-	38	Edwards et Welds, 1982
<i>Lymnea palustris**</i>	43	57	40	5,6	-	11,4	-	Hunter, 1975
<i>Crassostrea gigas***</i>								
1 an	26	74	21	2,8	1,4	0,9	278	Deslous-Paoli et Héral, 1983
2 ans	28	72	23	0,2	0,8	3,5	139	Héral et al., 1983

cent de l'énergie assimilée chez *Cepaea memoralis* et de 13 à 32 pour cent chez *Ancylus fluviatilis* et *Planorbis contortus* (Calow, 1974).

Des différentes productions formant 12 pour cent de l'énergie assimilée, c'est la production de chair (66 pour cent de la production totale) qui l'emporte sur celle émise en tant que gamète (22,6 pour cent de la production totale). Ceci est caractéristique d'une population dont la plus grande part de la biomasse est due à des individus de moins de 4 ans (Wright et Hartnoll, 1981). Les 88 pour cent de l'énergie assimilée non utilisée pour les productions sont dépensés par le métabolisme. Cette valeur se situe à la limite supérieure de la gamme fixée par Wright (1977) pour les mollusques (58 à 88 %) et correspond aux chiffres décrits pour des populations dominées par des individus à croissance lente et pluri annuelle. De même, une dépense métabolique aussi importante proportionnellement semble caractéristique d'animaux colonisant un environnement fluctuant comme c'est le cas dans les estuaires.

Le rendement d'assimilation varie de 0,32 à 0,74 en fonction de la période considérée. Les valeurs minimales traduisant une mauvaise assimilation de la nourriture consommée apparaissent pendant la période hivernale (décembre, janvier) sans doute liées à l'origine détritique de la matière organique particulière dans le bassin de Marennes-Oléron (Héral et al., 1983), ainsi qu'à la forte charge en seston minéral qui semble avoir une action limitative sur la croissance de *Crepidula fornicata* (Johnson, 1972). A l'inverse, pendant l'été (juin-août) les crépidules assimilent plus de 70 pour cent de l'énergie consommée sans doute parce qu'il s'agit principalement de phytoplancton (Héral et al., 1983). Cette évolution du rendement d'assimilation liée à la saison, donc à la qualité de la nourriture a été démontrée par Carefoot (1967) sur *Aplysia punctata*. Le calcul du rendement d'assimilation est lié à l'estimation de l'excrétion dissoute et particulaire. Dans le cas présent, l'excrétion dissoute (U) a été négligée. Cependant elle peut représenter de 0,6 pour cent de l'énergie consommée (Edwards et Welsh, 1982) pour *Ilyanassa obsoleta*, à 3,7 pour cent (Wright et Hartnoll, 1981) pour *Patella vulgata*.

L'estimation *in situ*, par la méthode de Sornin et al. (1982), de l'excrétion particulaire (fèces + pseudofèces) permet de comparer les bilans énergétiques de *Crassostrea gigas* cultivées dans le bassin de Marennes-Oléron et de *Crepidula fornicata* (tableau 15). En effet, ces deux mollusques filtreurs différents avant tout par leur taux d'excrétion. Chez *Crassostrea gigas* il représente de 72 à 74 pour cent de l'énergie consommée alors qu'il est de 45 pour cent chez *Crepidula fornicata*. Cette différence dans l'efficacité d'assimilation peut être due soit au mode d'alimentation propre à chaque espèce (présence ou absence de radula) soit à une différence dans l'équipement enzymatique

au niveau du tractus digestif. D'autre part, pour la population de *Crepidula fornicata*, la production de chair est supérieure à la production de gamètes, pour les huîtres *Crassostrea gigas*, ceci n'est vrai que pendant la première année. Ceci semble confirmer qu'il existe chez les individus les plus jeunes, comme dans les populations où ils dominent, une orientation vers l'accroissement de biomasse. Au contraire, chez les individus plus âgés, souvent à dominance femelle dans le cas des crépidules, et dans les populations où ils dominent, on observe un renforcement de l'effort de reproduction. A biomasse égale, le rapport production sur biomasse montre des valeurs inférieures de la production pour *Crepidula fornicata* comparées à celles observées pour *Crassostrea gigas*. Ceci suggère une croissance plus lente et une longévité peut être supérieure des crépidules par rapport aux huîtres creuses.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à une convention passée entre l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes et l'Etablissement Public Régional de Poitou-Charentes.

Tableau 16 : Bilan de production P et de biomasse annuel par individu de *Crepidula fornicata*, en fonction de la position dans la chaîne. Rapport production sur biomasse. Valeurs exprimées en Kjoules.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
P	-0,02	0,39	0,77	1,88	3,87	2,99	3,65	3,54	4,25
B	0,33	1,10	2,45	4,08	5,31	6,08	6,53	6,92	7,60
P/B	-0,06	0,36	0,47	0,46	0,73	0,49	0,56	0,51	0,56

Berthomé J.P., Razet D., Garnier J., 1981 - Description, évolution et importance des différentes techniques de captage en rivière Seudre (bassin de Marennes-Oléron) : incidence sur la production d'huîtres creuses *C. gigas*. Note au C.I.E.M., CM 1981/K : 30

Brody S., 1945 - Bioenergetics and growth. Reinhold, New-York.

Calow P., 1974 - Some observations on locomotory strategies and their metabolic effects in two species of freshwater gastropods, *Ancylus fluviatilis* Müll. and *Planorbis contortus* Linn.. *Oecologia*, 16 : 149 - 161.

Carefoot T.H., 1967 - Growth and nutrition of *Aplysia punctata* feeding on a variety of marine algae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 47 : 565 - 589.

Coum A., 1979 - La population de crépidules *Crépidula fornicata* (L. 1758) en rade de Brest : écologie et dynamique. *Thèse de 3ème cycle*, Univ. de Bretagne occidentale : 137 p.

Dame R.F., 1976 - Energy flow in an intertidal oyster population. *Est. Coast. Mar. Sc.*, 4 : 243 - 253.

Deslous-Paoli J.M., 1982 - *Crépidula fornicata* dans la bassin de Marennes-Oléron rapport préliminaire. *Rapport interne*, convention I.S.T.P.M. - E.P.R. Poitou Charentes : 31 p.



- Deslous-Paoli J.M., Héral M., 1983 - Transferts énergétiques entre l'huître *Crassostrea gigas* de 1 an et la nourriture potentielle disponible dans l'eau d'un bassin ostréicole. 5ème congrès de la Société Française de Malacologie, Ile des Embiez, septembre 1983. *Haliotis*, 13 : sous press.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebecs P.A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 (3) : 350 - 356.
- Edwards S.F., Welsh B.L., 1982 - Trophic dynamics of a mud snail (*Ilyanassa obsoleta* (Say)) population on an intertidal mudflat. *Est. Coast. Shelf Sc.*, 14 : 663 - 686.
- Héral M., Deslous-Paoli J.M., 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg estimée par mesures microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta*, 6(2) : 193 - 199.
- Héral M., Deslous-Paoli J.M., Sornin J.M., 1983 - Transferts énergétiques entre l'huître *Crassostrea gigas* et la nourriture potentielle disponible dans un bassin ostréicole : premières approches. *Oceanis*, 9(3) : 169 - 194.
- Héral M., Razet D., Deslous-Paoli J.M., Berthomé J.P., Garnier J., 1983 - Caractéristiques saisonnières de l'hydrologie du complexe estuarien de Marennes-Oléron (France). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 46(2) : sous press.
- Hughes R.N., 1970 - An energy budget for a tidal-flat population of the bivalve *Serobicularia plana* (Da Costa). *J. Animal. Ecol.*, 39 : 357 - 381.
- Hughes R.N., 1971a - Ecological energetics of the keyhole limpet, *Fissurella barbadensis* Gmelin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 6 : 167 - 178.
- Hughes R.N., 1971b - Ecological energetics of *Nerita* (Archaeogastropoda, Neritacea) populations on Barbados West Indies. *Mar. Biol.*, 11 : 12 - 22.
- Johnson J.K., 1972 - Effect of turbidity on the rate of filtration and growth of the slipper limpet *Crepidula fornicata* Lamarck 1799. *The Veliger*, 14(3) : 315 - 320.
- Le Gall P., 1980 - Etude expérimentale de l'association en chaîne et de son influence sur la croissance et la sexualité chez la crépidule *Crepidula fornicata* Linné 1758 (mollusque mésogastéropode). *Thèse de Doctorat d'état*, Univ. de Caen : 251 p. + annexe.
- Lowry O.M., Roseborough N.I., Farrand A.F., Randall R.J., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 263 - 275.
- Lucas A., 1982. Remarques sur les rendements de production chez les bivalves marins. *Haliotis*, 12 : 47 - 60.
- Lucas A., Shafee M.S., 1983 - Les calculs du rendements net de croissance : application à une population de *Chlamys varia* (Bivalvia). 5ème congrès de la Société Française de Malacologie, Ile des Embiez, septembre 1983. *Haliotis*, 13 : sous press.



- Mac Fadyen A., 1966 - Les méthodes d'étude de la productivité des invertébrés dans les écosystèmes terrestres. *La terre et la vie*, 4 : 361 - 392.
- Marsh J.B., Weinstein D., 1966 - Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid. Res.*, 7 : 574 - 576.
- Massé H., Lagardère J.P., 1981 - Recherches écologiques sur un écosystème estuarien à vocation aquacole, le bassin de Marennes-Oléron. *Rapport C.N.E.X.O.* n° 81/2503 : 42 - 141.
- Newell R.C., Kofoed L.H., 1977 - The energetics of suspension feeding in the gastropod *Crepidula fornicata* L.. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 51 : 161 - 180.
- Paine R.T., 1971 - Energy flow in a natural population of the herbivorous gastropod *Tegula funebris*. *Limnol. Oceanogr.*, 16(1) : 86 - 98.
- Pandian T.J., 1969. Yolk utilisation in the gastropod *Crepidula fornicata*. *Mar. Biol.*, 3 : 117 - 121.
- Phillipson J., 1964 - A miniature bomb calorimeter for small biological samples. *Oikos*, 15(1) : 130 - 139.
- Phillipson J., 1981 - Bioenergetics option and phylogeny. In "Physiological ecology an evolutionary approach to resource use". Townsend C. and Calow P. ed., Blackwell Scientific publ., Oxford-London : 20 - 45.
- Orton J.M., 1909 - On the occurrence of protandric hermaphroditism in the mollusc *Crepidula fornicata*. *Proc. Roy. Soc. B.*, 81 : 468 - 484.
- Richardson A.M.M., 1975 - Energy flux in a natural population of the land snail, *Cepaea memoralis* L.. *Oecologia*, 19 : 141 - 164.
- Sornin J.M., Feuillet M., Héral M., Deslous-Paoli J.M., 1982 - Effet des biodépôts de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) sur l'accumulation de matières organiques dans les parcs du bassin de Marennes-Oléron. 2ème symposium Franco-Britannique de Malacologie, London, 6-9 septembre. *J. Moll. Study* : sous press.
- Winberg G.C., 1960 - Rate of metabolism and food requirements of fishes. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Translation Ser., 194 : 202 -
- Wright J.R., 1977 - In Wright J.R., Hartnoll R.G., 1981.
- Wright J.R., Hartnoll R.G., 1981 - An energy budget for a population of the limpet *Patella vulgata*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 61 : 627 - 646.

ETUDES PATHOLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES LESIONS PARASITAIRES  
CHEZ *ostrea edulis* L. - PREMIERS RESULTATS D'UNE RECHERCHE  
PROSPECTIVE COMPARATIVE CHEZ LES PRINCIPALES ESPECES DE MOLLUSQUES  
DES ZONES OSTREICOLES DE BRETAGNE NORD.

Mikaël PODER, Michel AUFFRET et Georges BALOUET  
Laboratoire de Pathologie - Faculté de Médecine  
29279 BREST CEDEX.

RESUME

Une contribution est apportée à l'étude de la nouvelle épizootie de l'huître plate due au protozoaire parasite *Bonamia ostreae* : processus parasitaire (Parasitose hémocytaire), contaminations expérimentales en milieu naturel et en aquarium. Les premiers résultats, d'une surveillance épidémiologique chez des mollusques mytilidés, pectinidés, cardiidés et veneridés des zones ostréicoles montrent : l'absence de formes parasitaires de *Bonamia ostreae* ; l'existence de différents types de parasitisme ou de commensalisme d'importance inégale, et notamment un parasite digestif du genre *Marteilia* chez *Tapes* sp. Par ailleurs, un nouvel exemple d'hémocytosarcome est observé chez *Cerastoderma edule*.

ABSTRACT

This paper is a contribution to the study of the *Bonamia ostreae* epizooty in french european oyster *Ostrea edulis* : parasite process (hemocytic parasitosis) ; experimental contaminations on parks and in tanks. First results of an epidemiological watch conducted in oyster culture sites show in mollusks mytilidae, pectinidae, cardiidae, veneridae : the absence of *Bonamia ostreae* forms ; the existence of different types of parasitism or commensalism of unequal pathological importance and especially a parasite of the *Marteilia* genus in *Tapes* sp. digestive epithelium. Additionally, a new example of hemocytosarcoma is observed in *Cerastoderma edule*.

MOTS-CLES : *Ostrea edulis* - épizootie - *Bonamia ostreae* - Mollusques - Pathologie.

KEY-WORDS : *Ostrea edulis* - epizootic - *Bonamia ostreae* - Mollusks - Pathology.



## INTRODUCTION

Alors qu'en 1978 la parasitose de l'huître plate à *Marteilia refringens* (protozoaire parasite de la glande digestive) avait très nettement régressé en région Bretagne, un autre protiste parasite était découvert en 1979 dans un stock d'huîtres plates à l'Ile Tudy (Comps et al., 1980).

Dès lors, contrairement à l'extension relativement lente (6-7 ans) de la Martéiliose, maladie qui a toujours épargné certaines zones et en particulier celles de Binic et de Quiberon, le second parasite s'est rapidement propagé (Tige et al., 1980 - Cahour et al., 1980) et en 1981 l'ensemble des zones ostréicoles était concerné par la nouvelle maladie (Tige et al., 1981 ; rapport CNEOX 80/2283, juin 1981). D'autres régions ont aussi été atteintes en France, mais aussi en Hollande, au Danemark, en Espagne et plus récemment en Angleterre.

Parallèlement à cette évolution géographique, des stocks d'huîtres de plus en plus jeunes ont été touchés, jusqu'au naissain de décollage qui était déjà légèrement infecté en 1981 selon les résultats de l'I.S.T.P.M. (Grizel et al., 1982).

Dès les premières observations, le nouveau parasite a été associé à des mortalités importantes sur parcs : celles-ci s'observent deux à six mois après détection histologique de l'infection et l'évolution peut alors être progressive ou brutale.

L'absence chez les très nombreuses huîtres examinées dans les différents laboratoires concernés, de stades évolutifs distincts, notamment de formes sporales, n'a pas permis de prime abord de classer ce parasite de manière précise. C'est pourquoi l'appellation provisoire de "parasite X" a tout d'abord été appliquée aux petites cellules parasitaires de 2-3 µm, à un ou parfois deux noyaux, régulièrement observées. Cependant Pichot et al. ont créé en 1979 le genre nouveau *Bonamia* et l'espèce *Bonamia ostreae*, proche des *Stellatosporea*, classe qui comprend les genres *Minchinia*, *Haplosporidium*, *Marteilia*. Ces auteurs ont fait initialement état de certaines similitudes cytologiques avec le parasite "Microcell" observé dès 1967 aux U.S.A., tant chez *Ostrea edulis* que chez *Crassostrea gigas*. Outre les observations en microscopie photonique, les quelques éléments de comparaison en microscopie électronique fournis par nos collègues américains montrent effectivement une très grande parenté morphologique avec le type de "microcell" des côtes américaines rencontré chez l'huître plate. Plus récemment, Brehelin et al., (1982) ont rapporté l'existence chez des huîtres mourantes de formes plasmodiales pouvant compter jusqu'à 5 noyaux. A leur sens, celles-ci autorisent un rapprochement taxonomique avec l'ordre des Balanosporidies et plus précisément le genre *Minchinia* : peut-être est-il également possible d'interpréter ces plasmodies comme des formes réactionnelles ou dégénératives par souffrance cellulaire ?



En continuité avec les recherches effectuées dans le cadre des contrats CNEOX sur la pathologie des huîtres (rapport de juin 1981 qui faisait état de nos conclusions et propositions prophylactiques), nous avons poursuivi notre travail de diagnostic parasitaire et de recherche avec l'aide du contrat 82P0044 (Ministère de la Recherche et de l'Industrie). Les techniques classiques d'histologie de routine et de microscopie électronique, déjà utilisées, ont été appliquées à :

- des prélèvements effectués sur parcs et adressés au laboratoire par un groupe d'ostréiculteurs (convention de recherche avec l'Université de Bretagne Occidentale)

- des lots expérimentaux en milieu naturel et en aquarium représentant au total environ 20000 examens histopathologiques depuis 1979.

Ceci nous a permis d'étudier : d'une part le processus parasitaire et la biologie du parasite chez l'huître plate ; d'autre part l'épidémiologie naturelle et expérimentale de la maladie.

Nous résumerons donc les résultats obtenus concernant ces deux premiers points, puis nous insisterons plus particulièrement sur l'importance que nous attachons actuellement à la *Surveillance prospective et comparative* de la pathologie d'autres mollusques (essentiellement mytilidés, pectinidés, cardiidés et vénéruidés) dans des zones ostréicoles de Bretagne nord.

#### I. Etude du processus parasitaire à *Bonamia ostreae* chez *edulis*. Biologie du parasite.

##### A. Processus parasitaire :

Il convient de rappeler tout d'abord les aspects macroscopiques et histologiques qui peuvent permettre d'établir le diagnostic parasitaire (Poder et al., 1982).

- Certaines huîtres présentent des lésions macroscopiques isolées ou multifocales des lames branchiales et parfois du manteau : échan-crures ou perforations bordées par un épaissement réactionnel blanchâtre. Globalement, il est apparu que ces lésions ne sont pas spécifiques, mais souvent suffisamment caractéristiques pour aider au dépistage.

- L'aspect histologique le plus marquant est rencontré au niveau du type interstitiel avec la réaction hémocytaire granuleuse associée à la présence du parasite *Bonamia ostreae*. Les petites cellules parasitaires de 2-3  $\mu\text{m}$ , basophiles, sont alors le plus souvent intragranulocytaires : à l'image des lésions macroscopiques, cette réaction cellulaire dense, focale ou étendue, très étroitement liée à des altérations nécrotiques n'est pas absolument spécifique à la présence de *Bonamia ostreae* dans les tissus de l'huître. Cependant elle a un intérêt diagnostique dans la mesure où en l'absence de formes parasitaires évidentes, sa seule présence, quand elle est intense et surtout dans les branchies, nous a paru devoir être considérée comme suspecte.

- En dehors des caractéristiques ultrastructurales propres au parasite qui ont amené Pichot et al., (1979) à la création du genre nouveau et que nous avons nous-mêmes retrouvées, l'aspect parasitaire intragranulocytaire est confirmé par l'étude en microscopie électronique (Balouet et al., 1983).

L'activité du parasite se traduit alors, entre autres, par la présence de microtubules intra-nucléaires, par l'existence de figures de division des mitochondries et des noyaux, et contraste avec les modifications dégénératives de la cellule hôte. Ces altérations doivent aboutir à la lyse cellulaire et à l'extrusion des formes parasitaires libres.

Nous n'avons observé aucun stade plasmodial ou sporogonique et il est vraisemblable qu'étant donné la faible abondance des figures de divisions rencontrées sur coupes et l'absence de phase mitotique caractéristique, le parasite se multiplie par endomitose rapide. En tout état de cause, les granulocytes sont apparus comme des cellules cibles pour *Bonamia ostreae*, le parasite n'ayant jamais été retrouvé dans d'autres cellules (épithéliales, conjonctives, hyalinocytes normaux ou tumoraux).

L'ensemble de ces observations histologiques et ultrastructurales nous a permis de définir cette épizootie comme une *parasitose hémocytaire*.

#### B. Biologie du parasite :

La connaissance de la maladie hémocytaire de l'huître plate, acquise au cours des études d'épidémiologie naturelle et expérimentale, nous a conduit à certaines remarques (Poder et al., 1982) qu'il est possible de résumer ainsi :

- en milieu naturel : absence de cycle de contamination -délai de contamination d'au moins 3 mois- activité parasitaire pouvant engendrer des mortalités tout au long de l'année avec cependant des maxima en période estivale (température) et en condition de stress (parcs découvrants - élevage en poches).

- en aquarium : nous avons réalisé des expériences de contamination en appliquant à des huîtres saines les techniques classiques de Proximity, Feeding, Injection d'hémocytes infectés dans la cavité péricardique. Les observations et les examens histopathologiques effectués à intervalles de temps réguliers ont mis en évidence : - la transmission directe du parasite d'huître à huître dans un délai de 1 à 3 mois (1 mois par injection) -la probable responsabilité du parasite dans les mortalités observées.

## II. Epidémiologie de la parasitose hémocytaire

### A. Naturelle :

L'importance socio-économique de la maladie à *Bonamia ostreae* a été telle qu'un plan de sauvegarde régional a été mis en place au début de l'année 1982 après concertation entre l'admi-



nistration responsable et les professionnels. Ce plan visait à tenter d'éradiquer la maladie des zones infectées et à effectuer deux semis expérimentaux en eau profonde : dans une zone vierge (Plouha), et dans un secteur à moindre risque (Cancale). Ceci a été réalisé dans le premier cas avec du naissain capté à Loumergat (Rade de Brest) et histologiquement exempt de parasite (346 spécimens examinés au laboratoire), dans l'autre avec du naissain du Morbihan très peu parasité (1316 spécimens - collaboration avec le laboratoire conchylicole de La Trinité sur Mer). Les examens réalisés par la suite ont montré que les huîtres de Plouha étaient restées saines.

Parallèlement, à Cancale, si les huîtres semées à une densité comparable à celle de Plouha (1T/ha) étaient contaminées dès le décollage, le taux d'infection est resté faible et stable, sans mortalité anormale (information I.S.T.P.M.). A notre sens, ces cultures sur sol à densité réduite pourraient peut-être être étendues à des zones de parcs découvrants (Aber Benoit ; Carantec par exemple) où aucun semis d'huîtres plates n'a été réalisé depuis au moins deux ans, sous réserve d'approvisionnement en naissain ou en jeunes huîtres de bonne qualité zoosanitaire. Le naissain récolté à Loumergat en 1983, bien que parasité dès les premiers mois par *Marteilia refringens* mais ne présentant pas de signe d'infection par *Bonamia ostreae*, a montré une très bonne reprise de pousse à St Quay (baie de St Brieuc).

#### B. Expérimentale :

Nous avons effectué des immersions programmées d'huîtres saines en 1981, 1982, 1983 afin de mettre en évidence la persistance ou non du risque parasitaire à *Bonamia ostreae* dans des zones ostréicoles actuellement dépeuplées, spontanément par mortalité ou après éradication. Le même type de protocole avait été appliqué en 1976-79 pour l'étude de la parasitose à *Marteilia refringens*, et avait permis de mettre en évidence, dès 1978, au moment de la défervescence de la maladie, l'absence de nouvelle contamination estivale, secteur par secteur, malgré l'existence d'huîtres infectées résiduelles sur parc.

C'est ainsi qu'en ce qui concerne la maladie à *Bonamia ostreae* nous avons pu constater :

- le maintien jusqu'en 1983 de l'activité du parasite et de la possibilité de contamination rapide (délai de 4 mois) à Binic et à Paimpol,

- une certaine stabilisation de la maladie à :

##### • Carantec :

- contamination tardive en 1981 (13 % d'infection 7 mois après l'immersion)
- absence de contamination 5 mois après l'immersion de juin 1982
- contamination au 8ème mois d'expérience en 1983.

##### • Aber Benoit :

- absence de contamination 5 mois après l'immersion de juin 1982



- contamination tardive, 7 mois après l'immersion de décembre 1982.

Ce sont les résultats couplés des analyses régulières effectuées sur ces lots expérimentaux périodiquement renouvelés et des essais de culture à densité réduite en eau profonde qui peuvent permettre de proposer la remise en culture très progressive de certaines zones.

### III. Surveillance épidémiologique

Compte tenu de l'effondrement actuel de la production d'huîtres plates en Bretagne, nous avons eu la possibilité de diversifier l'effort d'analyse en axant plus particulièrement nos travaux vers la "surveillance" des principaux mollusques présents dans les zones ostréicoles dans un double but :

- la recherche de *Bonamia ostreae* soit sous sa forme connue chez l'huître plate (hôte réservoir) soit sous d'autres formes parasitaires pouvant éventuellement faire partie de son cycle (hôtes intermédiaires ?)

- l'établissement d'un état pathologique de base auquel il pourrait être fait référence pour évaluer le risque de maladie pour la gestion de stocks de bivalves sauvages ou cultivés d'intérêt commercial, ainsi que pour la mise en place de nouveaux élevages.

#### A. Protocole :

Cette étude a commencé à l'automne 1982 ; elle comprend trois séries d'échantillonnages aux mois de Février, Juin et Octobre d'une même année et nous souhaitons pouvoir la conduire pendant au moins 3 ans afin d'avoir un aperçu de l'épidémiologie évolutive. Ce rythme de prélèvement cherche à tenir compte de la physiologie des animaux en relation avec le cycle saisonnier. Les séries sont essentiellement effectuées sur parcs découvrants à Paimpol, Carantec et dans l'Aber Wrach, avec si possible des prélèvements d'au moins 15 à 20 individus de : *Patella sp.* ; *Ocenebra erinacea* ; *Mytilus edulis* ; *Pecten maximus* ; *Chlamys varia* ; *Cerastoderma edule* ; *Venus verrucosa* ; *Tapes pul-lastra* ; *Tapes rhomboïdes* ; *Ensis ensis* ; *Ensis siliqua*.

#### B. Premiers résultats :

A partir des résultats obtenus sur les prélèvements d'octobre 1982, février et juin 1983 (1500 examens environ), 3 points apparaissent importants :

1. Nous n'avons retrouvé le parasite *Bonamia ostreae* chez aucun des mollusques examinés à ce jour et nous n'avons pas observé de stade parasitaire susceptible d'être rattaché à

son cycle biologique. Signalons de même que le parasite n'a jamais été observé chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

2. Certains bivalves sont apparus très sains tels : *Pecten maximus*; *Chlamys varia* ; *Venus verrucosa* ; *Ensis ensis* et *Ensis siliqua*.

3. Par contre en ce qui concerne *Mytilus edulis* ; *Cerastoderma edule* ; *Tapes pullastra* et *Tapes rhomboïdes*, nous avons relevé différents types de parasitisme ou de commensalisme sur coupes histologiques.

#### - Protozoaires

. grégaires du genre *Nematopsis* au niveau du tissu interstitiel, de la masse digestive, mais surtout des branchies. Il semble que l'on puisse distinguer deux espèces différentes chez *Tapes sp.* et *Cerastoderma edule*. (Fig. 1-1 A)

. coccidies

. plasmodes ou spores d'haplosporidies | indéterminés.

Ces parasites ont été observés l'un à proximité de la basale de l'estomac (*Tapes rhomboïdes*); les autres dans les branchies, accompagnés d'une réaction cellulaire focale (*Tapes pullastra*).

. différents stades évolutifs très particuliers au genre *Marteilia* au niveau de l'épithélium digestif chez *Mytilus edulis* (Fig. 4) et *Cerastoderma edule*. Les formes parasitaires rencontrées en histologie semblent assez comparables à celles connues chez *Ostrea edulis* (*Marteilia refringens*). Il nous paraît important d'insister sur le fait que des parasites de même genre ont été observés, semble-t-il pour la première fois, chez *Tapes pullastra* et *Tapes rhomboïdes*. Toutefois, les stades âgés sont ici différents, avec notamment un nombre important de petits granules réfringents. (Fig. 3).

#### - Métazoaires

. sporocystes et cercaires de trématodes, du genre *Cercaria* chez *Mytilus edulis*, du genre *Bucephalus* chez *Cerastoderma edule*, *Tapes pullastra* et *Tapes rhomboïdes*. Ces éléments parasitaires peuvent être retrouvés en grand nombre essentiellement dans les gonades (Fig. 2), mais aussi parfois dans les branchies.

. crustacés copépodes, peut-être du genre *Mytilicola*, situés dans la lumière du tube digestif, et plutôt considérés comme commensaux.

Par ailleurs, un nouvel exemple de prolifération hémocytaire tumorale invasive (Fig. 5-6) a été découvert chez *Cerastoderma edule* à Carantec (23 cas sur 310 coques examinées). Il a été également observé en Irlande par l'équipe du Professeur Mulcahy à Cork (communication personnelle). D'un point de vue topographique et cytologique, cette lésion paraît très comparable à celles décrites chez *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*, ainsi qu'aux hémocytosarcomes présents de manière chronique chez *Ostrea edulis* en Bretagne.







## CONCLUSION

Les travaux réalisés au laboratoire depuis juin 1981 ont permis :

- d'une part, d'apporter une contribution à l'étude de la parasitose à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate.

L'étude fondamentale du processus parasitaire entreprise en microscopie optique et électronique nous a amené à classer cette maladie comme une *parasitose hemocytaire*. En complément, les expériences de reproduction de la maladie réalisées tant sur parcs qu'en circuits fermés ont montré : le mode de contamination direct d'huître à huître dans un délai d'au moins trois mois - l'activité du parasite, persistant tout au long de l'année et renforcée lorsque les huîtres sont soumises à des conditions écophysiologiques défavorables de température, d'émergence, ainsi qu'au confinement et à la concentration en élevage. De plus, les essais en milieu naturel paraissent indispensables pour juger du maintien ou non dans chaque zone ostréicole du potentiel de contamination parasitaire par *Bonamia ostreae*. C'est de cette manière que nous avons déjà mis en évidence une relative stabilisation de la maladie à Carantec et dans l'Aber Benoit ; cette amélioration devra être confirmée par les nouvelles immersions d'huîtres saines de Plouha effectuées en novembre 1983 (premiers prélèvements prévus en février 1984).

- d'autre part, de mettre en place une surveillance épidémiologique d'autres mollusques dans les zones ostréicoles.

En l'état actuel, cette étude a permis de mettre en relief l'apparente spécificité du parasite *Bonamia ostreae* vis-à-vis d'*ostrea edulis*.

Parallèlement, elle a démontré l'existence chez *Mytilus edulis*, *Tapes pullastra*, *Tapes rhomboïdes*, de différentes lésions pathologiques d'ordre parasitaire ou tumoral, d'intensité et de localisation géographique variables, et évoluant assez souvent vers une pathologie complexe.

L'identification des parasites avec, dans certains cas (*Marteilia*), l'apport de la microscopie électronique, l'étude de la pathologie induite et si possible de ses répercussions sur les populations ou stocks devront être précisés ultérieurement.

Dès à présent nous avons engagé : - l'étude du parasite *Marteilia* chez *Tapes pullastra* et *Tapes rhomboïdes*, avec essai de culture de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* dans un sol hébergeant les deux palourdes autochtones infectées (possibilité de contamination ?).

- l'étude plus fondamentale de la lésion tumorale chez *Cerastoderma edule*, avec d'intéressantes comparaisons cytologiques et étiologiques avec les hémocytosarcomes régulièrement observés chez *Ostrea edulis* jusqu'en 1982.

Enfin les résultats de cette surveillance et du semis effectué en eau profonde à Plouha, confrontés à ceux obtenus par nos collègues français et étrangers, spécialement Hollandais et Anglais, autorisent trois remarques concernant la Bonamiose de l'huître plate :

- efficacité de l'éradication et de la suppression temporaire de culture, comme cela a été réalisé en Hollande (Van Banning-1982)
- absence d'hôte réservoir actuellement mis en évidence
- efficacité prophylactique des densités réduites en élevage.

- 
- Balouet G., Poder M., Cahour A., 1983 - Haemocytic parasitosis : morphology and pathology of lesions in the french flat oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture, 34, p. 1-14.
  - Banning P. van., 1982 - Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in the dutch oyster culture. Proc XVth Annual Meeting of the Soc. Inv. Path., Brighton, 6-10 sept, p. 261-265.
  - Brehelin M. Bonami J.R., Cousserans F., Vivarès Ch. P., 1982 - Existence de formes plasmodiales vraies chez *Bonamia ostreae* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sc., D, 295, p. 45-48.
  - Cahour A., Poder M., Balouet G., 1980 - Présence de *Minchinia armoricana* (Haplosporea, Haplosporida) chez *Ostrea edulis* d'origine française. C. R. Soc. Biol., 174, p. 359-362.
  - Comps M., Tige G., Grizel H., 1980 - Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sc., D, 290, p. 383-384.
  - Grizel H., Tige G., 1982 - Evolution of the haemocytic disease caused by *Bonamia ostreae*. Proc. XVth Annual Meeting of the Soc. Inv. Path., Brighton 6-10 sept, p. 258-260.
  - Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., 1980 - Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n., sp.n, parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis*. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43, p. 131-140.
  - Poder M., Balouet G., Cahour A., 1982 - Etudes histologiques et ultrastructurales des lésions de parasitose hémocytaire chez *Ostrea edulis* : contaminations expérimentales. 107ème congrès nat. Soc. Sav., Sci., Brest, II, p. 175-186.

- Poder M., Balouet G., Cahour A., 1982 - Hemocytic parasitosis in european oyster *Ostrea edulis* L. Pathology and contamination. Proc. XVth Annual Meeting of the Soc. Inv. Path., Brighton, 6-10 sept, p. 254-257.
- Tige G., Grizel H., Martin A.G., Langlade A., Rabouin M.A., 1981 - Situation épidémiologique consécutive à la présence du parasite *Bonamia ostreale* en Bretagne. Evolution au cours de l'année 1980. Sci. Pêches, Bull. Inst. Pêches Marit., 315, p. 13-20.
- Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., Cochonnec N., Audic G., Langlade A., 1982 - Maladie hémocytaire de l'huître plate causée par *Bonamia ostreale* : évolution de la situation épizootiologique en Bretagne au cours de l'année 1981. Sci. Pêches, Bull. Inst. Pêches Marit., 328, p. 3-13.
- Rapports de contrats CNEOX, n° 79/2066 et 80/2283 - Etudes sur la pathologie des huîtres.

---

LISTE DES DOCUMENTS PHOTOGRAPHIQUES

---

- |        |                 |                                   |
|--------|-----------------|-----------------------------------|
| Fig. 1 | Nematopsis sp.  | Cerastoderma edule<br>A Tapes sp. |
| Fig 2. | Bucephalus sp.  | Tapes sp.                         |
| Fig 3. | Marteilia sp.   | Tapes sp.                         |
| Fig 4. | Marteilia sp.   | Mytilus edulis                    |
| Fig 5. | Hemocytosarcome | cerastoderma edule                |
| Fig 6. | Hemocytosarcome | cerastoderma edule                |



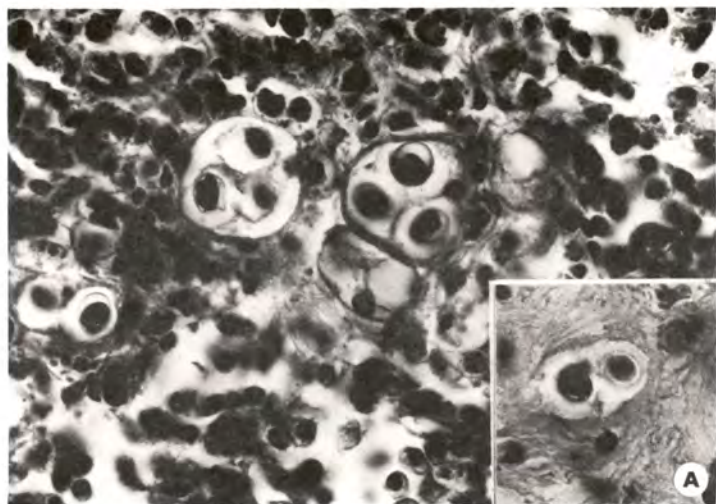


Fig. 1 : Protozoaire APICOMPLEXA : spores de grégarines  
 du genre *Hematoxys*  
*Cerastoderma edule* : forte réaction hemocytaire  
 1A *Tapes* sp.  
 Gr x 1000

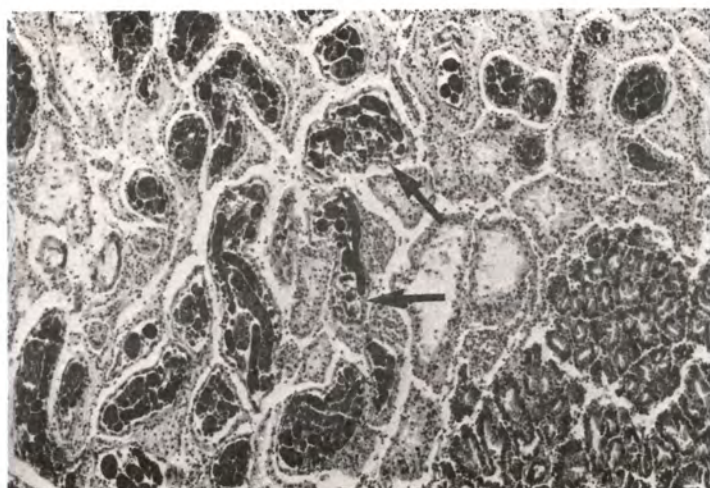


Fig 2. : Metazoaire TREMATODE : sporocystes et cercaires  
 du genre *Bucephalus* → dans les gonades de  
*Tapes* sp.  
 Gr x 100

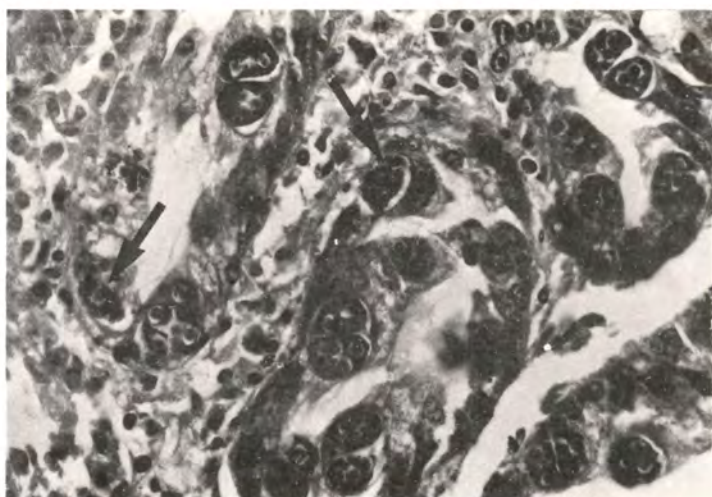


Fig. 3 : Protozoaire ASCETOSPORA : Formes pseudoplasmodiales agées du genre *Marteilia* dans l'épithélium digestif chez *Tapes* sp. Présence de très nombreux petits granules → .  
Gr x 800

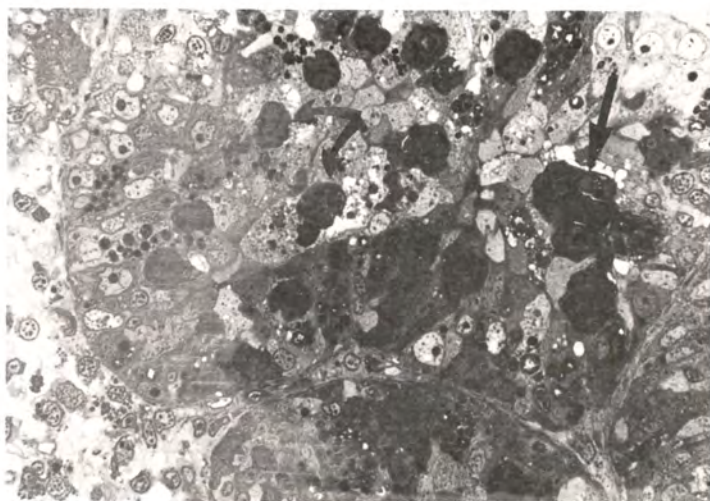


Fig. 4 : Protozoaire ASCETOSPORA : Différentes formes pseudoplasmodiales du genre *Marteilia* dans l'épithélium digestif chez *Mytilus edulis*. Présence dans les formes agées de quelques gros granules. Semi-fine Gr x 800. →





Fig. 5 : HEMOCYTOSARCOME : Infiltration massive des branchies de *Cerastoderma edule* par des cellules hypertrophiées et hyperchromatiques.  
Grx 125.

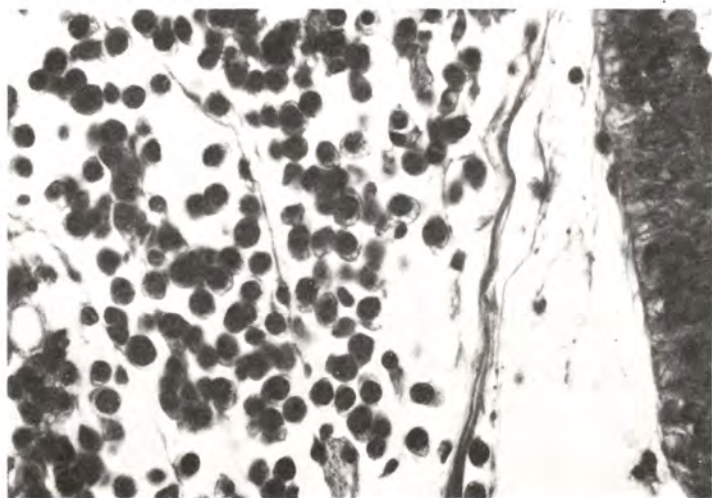


Fig. 6 : HEMOCYTOSARCOME : détail des cellules assez monomorphes : le noyau présente une chromatine très condensée et le cytoplasme réduit est sensiblement hyalin.  
Grx 1000.



POLYMORPHISME ENZYMATIQUE DE TROIS POPULATIONS DE PALOURDES  
(*RUDITAPES DECUSSATUS* L.) DE BRETAGNE

Dario MORAGA et Albert LUCAS  
Laboratoire de Zoologie - Faculté des Sciences  
29283 BREST Cedex - FRANCE -

R E S U M E

Les trois populations étudiées étaient localisées sur les côtes de Bretagne Occidentale : au nord (Diben), à l'ouest (Tinduff), au sud (Ile Tudy). De 25 à 57 analyses ont été effectuées sur chacun des 19 systèmes enzymatiques étudiés, où 27 locus ont été reconnus, dont 6 non interprétables, 10 monomorphiques et 11 polymorphiques. Parmi ces derniers, 4 locus ont montré une résolution trop confuse pour que leur analyse soit retenue. C'est donc 7 locus polymorphes ( $EST_3$ ,  $HK_2$ ,  $LAP_2$ ,  $MDH_1$ ,  $MDH_2$ ,  $GPI$ ,  $PGM_2$ ) qui ont été utilisés pour comparer les 3 populations concernées. Une seule différence qualitative portant sur un allèle rare et de très faibles différences quantitatives de distribution des allèles entre les 3 populations, n'ont pas permis de les distinguer. La variabilité génétique des 3 populations est relativement élevée.

A B S T R A C T      *ENZYMATIC POLYMORPHISM OF THREE POPULATION OF PALOURDES  
(RUDITAPES DECUSSATUS) IN BRITTANY.*

The three populations studied were situated on the west coast of Brittany : to the North (Diben), to the West (Tinduff) to the South (Ile Tudy). 25 to 57 analysis were carried out on each of the 19 enzymatic systems where 27 loci had been recognized. Six of which were not interpreted, 10 were monomorphic, 11 polymorphic. Among these latter, the analysis of 4 of the loci were not used as the determination was too confused. Therefore, the comparison of the 3 populations was carried out on 7 polymorphic loci ( $EST_3$ ,  $HK_2$ ,  $LAP_2$ ,  $MDH_1$ ,  $MDH_2$ ,  $GPI$ ,  $PGM_2$ ). Only a rare allele showed one qualitative difference ; this coupled with slight quantitative differences in the distribution of the alleles did not permit to distinguish the three various populations. The genetic variability of the 3 populations was rather high.

M O T S - C L E S : Polymorphisme enzymatique, heterozygotie, Mollusque, Bivalve.

K E Y W O R D S : Enzymatic polymorphism, heterozygosity, Mollusca, Bivalvia

## INTRODUCTION

Chez les Mollusques Bivalves où les caractères morphologiques non influencés par les facteurs du milieu, sont rares, l'électrophorèse enzymatique est un moyen de choix pour évaluer la variabilité génétique des populations. Cette technique a été inaugurée chez les Bivalves par Johnson et al. (1978) qui ont étudié un système enzymatique sur une population naturelle d'*Ostrea lurida*. Les premières études portant sur un nombre significatif d'enzymes ne datent que de 1975 (Buroker et al., 1975) et surtout 1979 (Buroker et al., 1979 a et b) et concernent des populations de *Crassostrea*. Dans la famille des Veneridae, les principales études électrophorétiques ont porté sur l'espèce *Ruditapes decussatus* à laquelle 3 publications ont été consacrées : Wilkins et Mathers (1974), Wilkins (1975), Worms et Pasteur (1982). Le but du présent travail était de comparer la variabilité génétique de 3 populations de *R. decussatus* de Bretagne Occidentale, en étudiant un certain nombre de systèmes enzymatiques par la méthode électrophorétique sur gel de polyacrylamide ou d'amidon. En effet, ces populations présentaient sur la base de caractéristiques biométriques, certaines différences au niveau statistique (Gérard 1978, Moraga en prép.). Il était donc intéressant de voir si, parallèlement, des différences de distributions d'électromorphes pouvaient être constatées entre les 3 populations.

TABLEAU 1 : Les systèmes enzymatiques analysés. (ci-contre)

* MA : Muscle adducteur	° Tampon A = électrode : 0,135 M tris/0,045 M d'acide citrique PH7. Pour gel, dilution 10 fois
GD : Glande digestive	Tampon B = électrode : 0,023 tris/0,005 M d'acide citrique PH8. Pour gel, dilution 1 fois
Δ P : Polyacrylamide	Tampon C = 22 mM tris/135 mM Glycine PH8, 6.
A : Amidon	Tampon D = électrode : 0,085 M tris/0,081 M acide borique PH8,5. Pour gel, dilution 1 fois
1 AYALA et al. 1973	Tampon E = électrode : 0,09 tris/0,05 M acide borique 0,002 M EDTA PH8,6. Gel dilué 10 fois.
2 BISOL 1976	
3 BREWER 1970	Tampon F = électrode : 0,62 M tris/0,14 M d'acide citrique, H <sub>2</sub> O PH8. Pour gel, dilution 29 fois.
4 LEWIS et HARRIS 1967	
5 SCHAAL et ANDERSON 1974	
6 SELANDER et al. 1971	
7 SHAW et PRASAD 1970	

ENZYME	DESIGNATION	LOCUS OBSERVES	TISSU*	SYSTEME TAMPON°	NATURE DU GEL <sup>Δ</sup>	COLO- RATION	RESO- LUTION	N. ALLELES
ALCOOL DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.1.	-	MA.GD	A,F	P,A	6	néant	-
AMINOPEPTIDASE	E.C.3.4.11.1.	AP <sub>1</sub> AP <sub>2</sub>	MA	A A	P P	4	bonne bonne	1 1
ASPARTATE AMINOTRANSFERASE	E.C.2.6.1.1.	AAT <sub>2</sub>	MA	A,F	P,A	6	bonne	1
ESTERASES	E.C.3.1.1.	EST <sub>1</sub> EST <sub>2</sub> EST <sub>3</sub> EST <sub>4</sub>	MA MA MA MA	E E E E	P P P P	7	bonne bonne bonne bonne	1 1 2 1
GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.49	-	MA.GD	A,F	P,A	6	mauvaise	-
GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASE	E.C.5.3.1.9.	GPI	MA	A F	P A	2	bonne bonne	5 3
GLUTAMATE DESHYDROGENASE	E.C.1.4.1.2.	-	MA	B,F	P,A	6	mauvaise	-
HEXOKINASE	E.C.2.7.1.1.	HK <sub>2</sub>	MA	A,B	P	7	faible	3
ISOCITRATE DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.42	IDH	MA	B	P	7	faible	n
LACTATE DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.27	-	MA.GD	A,B,C	P	1	néant	-
LEUCINE AMINOPEPTIDASE	E.C.3.4.1.1.	LAP <sub>1</sub> LAP <sub>2</sub>	MA.GD MA.GD	D,E D,E	P P	7	bonne bonne	1 3
MALATE DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.37	MDH <sub>1</sub> MDH <sub>2</sub> MDH <sub>1</sub> MDH <sub>2</sub>	MA MA.GD MA.GD	F F B B	A A P P	6	bonne bonne faible mauvaise	2 3 1 -
MALIQUE ENZYME	E.C.1.1.1.40	ME <sub>1</sub> ME <sub>2</sub>	MA	B,F B	P,A P	6	diffuse bonne	n 1
OCTOPINE DESHYDROGENASE	E.C.1.5.1.11	ODH	MA.GD	E	P	5	faible	n
PHOSPHOGLUCOMUTASE	E.C.2.7.5.1.	PGM <sub>1</sub> PGM <sub>2</sub>	MA	B B	P P	1-3	bonne bonne	1 3
6 PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.44	6 PGD <sub>1</sub>	MA.GD	B	P	7	faible	n
SORBITOL DESHYDROGENASE	E.C.1.1.1.14	-	MA.GD	A,B,F	P	7	diffuse	-
SUPEROXYDE DISMUTASE	E.C.1.15.1.1.	SOD <sub>1</sub>	MA	A,B	P	1	bonne	1
XANTHINE DESHYDROGENASE	E.C.1.2.1.37	-	MA	A,B	P	7	diffuse	-



## MATERIEL ET METHODES

### - Matériel vivant

Les palourdes (*Ruditapes decussatus*) utilisées dans l'analyse électrophorétique appartenaient à trois populations différentes de Bretagne Occidentale :

- Diben (Baie de Morlaix) côte Nord
- Tinduff (Rade de Brest) côte Ouest
- Ile Tudy (Anse de Pouldon) côte Sud.

### - Analyse électrophorétique

Au laboratoire, les animaux ont été maintenus dans des bacs d'eau de mer, puis disséqués pour séparer les muscles adducteurs et la glande digestive, qui ont été soit conservés à -25°C soit lyophilisés. Les échantillons de tissus ont été broyés dans un tampon tris HCl 0,01 M PH8, à raison de 1 à 3 (poids/volume). Le broyat était ensuite centrifugé à 30 000 g pendant 10 minutes à 2°C.

Les électrophorèses ont été réalisées à 4°C, sur gel d'amidon ou sur gel de polyacrylamide, soit sur un appareil LKB : 2217 multiphor système horizontal, soit sur un appareil LKB - 2001, système vertical à capacité de 20 à 40 échantillons.

Le tableau 1 précise pour chaque système enzymatique la nature du gel, les tampons employés et les méthodes de coloration.

### - Interprétation des données

A partir des phénotypes observés, les fréquences de chaque allèle sont calculées. On en déduit les fréquences phénotypiques attendues selon la loi de Hardy Weinberg. Le test  $X^2$  est utilisé pour voir si les fréquences phénotypiques attendues et observées diffèrent significativement ou non ( $P < 0,05$ ).

Pour chaque locus, la fréquence des hétérozygotes observés ( $H_o$ ) est calculée à partir des phénotypes observés. La fréquence attendue ( $H_e$ ) est déduite de la fréquence allélique. Connaissant  $H_o$  et  $H_e$  on peut obtenir l'indice de déviation (Selander, 1970).

$$D = \frac{\sum H_o - \sum H_e}{\sum H_e}$$

dont les valeurs négatives indiquent une déficience d'hétérozygotes dans la population.

Le nombre effectif d'allèle ( $N_e$ ) a été calculé selon Ayala (1982). Les définitions de NEI (1972) ont été adoptées pour le calcul d'identité génétique (I) et celui de la distance génétique (D). Le taux de polymorphisme (P) est le pourcentage de locus polymorphes parmi les locus étudiés (et dont l'analyse a été possible).

## RESULTATS

Comme le montre le tableau 1, sur les 19 systèmes enzymatiques, 6 n'ont pu être interprétés. Sur les 13 systèmes restants, on a reconnu 21 locus parmi lesquels : 4 locus polymorphes (Idh, Mel, Odh, 6 Pgd) dont il n'a pas été possible de dénombrer les allèles ; 10 locus monomorphes (Aat2, Apl, Ap2, Est1, 2, 4, Lap1, Me2, Pgm1, Sod1) et 7 locus polymorphes analysables (Est3, Gpi, Hk2, Lap2, Mdh1, Mdh2, Pgm2). Les données concernant ces 7 locus figurent dans les tableaux 2 à 8.

ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
GENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	20	18,05	23	20,48	18	15,82
BB	8	6,05	9	6,48	14	11,82
AB	17	20,90	18	23,04	23	27,35
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,378	0,464	0,360	0,461	0,418	0,497
NOMBRE TOTAL	45		50		55	
FREQUENCE ALLELIQUE	A 0,633	B 0,367	A 0,64	B 0,36	A 0,536	B 0,464
DEGRE DE LIBERTE	1		1		1	
X <sup>2</sup>	1,57		2,39		1,39	
PROBABILITE	0,21		0,12		0,23	
Ne	1,89		1,89		2	
D	- 0,187		- 0,219		- 0,159	

Tableau 2. Résultats des électrophorèses pour l'estérase Est<sub>3</sub>.

ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
GENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	0	1,24	0	0,41	0	0,83
BB	8	7,25	6	6,08	4	6,08
CC	1	2,49	5	5,63	3	4,41
AB	5	6,00	3	3,15	6	4,50
AC	7	3,52	4	3,03	4	3,83
BC	8	8,50	12	11,70	13	10,35
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,690	0,621	0,633	0,596	0,767	0,623
NOMBRE TOTAL	29		30		30	
FREQUENCE ALLELIQUE	A 0,207	B 0,50	C 0,293	A 0,117	B 0,450	C 0,383
DEGRE DE LIBERTE	1		2		2	
X <sup>2</sup>	4,04		0,32		2,64	
PROBABILITE	0,044		0,852		0,267	
Ne	2,6		2,5		2,7	
D	+ 0,11		+ 0,062		+ 0,231	

Tableau 3. Résultats des électrophorèses pour la glucose phosphate isomérase Gpi.



ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
GENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	6	2,70	5	2,88	5	2,62
BB	10	9,76	7	7,71	15	17,47
CC	2	1,73	6	4,02	3	2,62
AB	7	10,27	10	9,43	14	13,53
AC	1	4,32	2	6,81	0	5,24
BC	11	8,22	12	11,14	18	13,53
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,514	0,617	0,571	0,652	0,582	0,587
NOMBRE TOTAL	37		42		55	
FREQUENCE ALLELIQUE	A	0,270	0,261		0,218	
	B	0,514	0,429		0,564	
	C	0,216	0,310		0,218	
DEGRE DE LIBERTE	1		2		2	
X <sup>2</sup>	5,08		1,89		4,13	
PROBABILITE	0,027		0,388		0,126	
Ne	2,6		2,9		2,4	
D	- 0,167		- 0,123		- 0,009	

Tableau 4. Résultats des électrophorèses pour l'hexokinase HK<sub>2</sub>.

ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
GENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	16	14,69	36	34,74	26	22,27
BB	6	4,69	4	2,74	11	7,27
CC	-	-	-	-	-	-
AB	14	16,61	17	19,52	18	25,45
AC	-	-	-	-	-	-
BC	-	-	-	-	-	-
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,389	0,461	0,298	0,342	0,327	0,463
NOMBRE TOTAL	36		57		55	
FREQUENCE ALLELIQUE	A	0,639	0,781		0,636	
	B	0,361	0,219		0,364	
	C	-	-		-	
DEGRE DE LIBERTE	1		1		1	
X <sup>2</sup>	0,89		0,95		4,72	
PROBABILITE	0,34		0,32		0,02	
Ne	1,9		1,5		1,9	
D	- 0,157		- 0,129		- 0,293	

Tableau 5. Résultats des électrophorèses pour la leucine aminopeptidase Lap<sub>2</sub>.



ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
GENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	0	0,39	0	0,28	0	0,35
BB	17	17,39	17	17,28	20	20,35
CC	-	-	-	-	-	-
AB	6	5,22	5	4,43	6	5,31
AC	-	-	-	-	-	-
BC	-	-	-	-	-	-
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,261	0,227	0,227	0,201	0,231	0,204
NOMBRE TOTAL	23		22		26	
FREQUENCE ALLELIQUE	A 0,130 B 0,870 C -		0,114 0,886 -		0,115 0,885 -	
DEGRE DE LIBERTE	1		1		1	
X <sup>2</sup>	0,52		0,36		0,44	
PROBABILITE	0,471		0,548		0,507	
Ne	1,3		1,3		1,3	
D	+ 0,150		+ 0,128		+ 0,130	

Tableau 6. Résultats des électrophorèses pour la malate deshydrogenase Mdh<sub>1</sub>.

ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
PHENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	0	0,70	0	0,38	0	0,01
BB	15	15,70	18	18,38	20	20,10
CC	-	-	-	-	0	0,04
AB	8	6,61	6	5,25	1	0,93
AC	-	-	-	-	0	0,04
BC	-	-	-	-	2	1,87
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,348	0,287	0,250	0,219	0,130	0,124
NOMBRE TOTAL	23		24		23	
FREQUENCE ALLELIQUE	A 0,174 B 0,826 C -		0,125 0,875 -		0,022 0,935 0,043	
DEGRE DE LIBERTE	1		1		1	
X <sup>2</sup>	1,02		0,49		0,11	
PROBABILITE	0,313		0,484		0,740	
Ne	1,4		1,3		1,1	
D	+ 0,211		+ 0,143		+ 0,053	

Tableau 7. Résultats des électrophorèses pour la malate deshydrogenase Mdh<sub>2</sub>.

ORIGINE	DIBEN		TINDUFF		ILE TUDY	
GENOTYPES	Observés	Attendus	Observés	Attendus	Observés	Attendus
AA	14	12,96	21	21,19	16	14,77
BB	3	1,44	2	1,73	7	5,03
CC	0	0,04	0	0,03	0	0,03
AB	6	8,64	12	12,11	14	17,23
AC	2	1,44	2	1,51	2	1,23
BC	0	0,48	0	0,43	0	0,72
FREQUENCE DES HETEROZYGOTES	0,320	0,422	0,378	0,380	0,410	0,492
NOMBRE TOTAL	25		37		39	
FREQUENCE ALLELIQUE	A	0,720	B	0,757	C	0,615
	B	0,240	C	0,216		0,359
	C	0,040		0,027		0,026
DEGRE DE LIBERTE	1		1		1	
X <sup>2</sup>	2,50		0,66		2,71	
PROBABILITE	0,113		0,416		0,099	
Ne	1,7		1,6		2	
D	- 0,242		- 0,004		- 0,166	

Tableau 8. Résultats des électrophorèses pour la phosphoglucomutase Pgm2

Les distances génétiques entre les 3 populations figurent dans le tableau 9. Sur la base des locus étudiés, on constate une très forte identité génétique, qui ne permet pas de distinguer les 3 populations.

I \ D	D		
	DIBEN	TINDUFF	ILE TUDY
DIBEN	-	0.004	0.007
TINDUFF	0.995	-	0.009
ILE TUDY	0.993	0.991	-

Tableau 9 - Identité génétique et distance de NEI de trois populations de *Ruditapes decussatus*.

Une seule différence qualitative a été notée : la présence d'un 3ème allèle de la Mdh2 dans la population de l'Ile Tudy à une fréquence de 0,04.

#### DISCUSSION

La variabilité génétique des trois populations est relativement élevée (Tableau 10). En effet, même en se limitant aux 17 locus dont les allèles ont pu être dénombrés et en écartant de ce fait 4 locus polymorphes (Tableau 1), les valeurs obtenues pour les différents paramètres exprimant la variabilité, bien que sous-estimées, sont légèrement supérieures aux valeurs moyennes rencontrées chez les Invertébrés selon Nevo (1978).

Les résultats obtenus en Bretagne Occidentale peuvent aussi être confrontés à ceux obtenus sur d'autres populations de la même espèce, en prenant garde de comparer entre eux des nombres calculés de la même façon et sur les mêmes locus. Le travail de Wilkins (1975) reprend les données de Wilkins et Mathers (1974) et en ajoute de nouvelles : ce sera donc la seule référence retenue pour les populations d'Irlande. La publication de Worms et Pasteur (1982) porte sur une population de l'étang du Prévost, en Méditerranée Occidentale.

	DIBEN	TINDUFF	ILE TUDY	ENSEMBLE
Taux de Polymorphisme	41 %	41 %	41 %	41 %
Taux de Hétérozygotie (Ho)	0,170	0,165	0,168	0,167
Nombre moyen d'allèles par locus	1,76	1,76	1,82	1,78
Nombre effectif d'allèles (Ne)	1,38	1,35	1,38	1,37

Tableau 10. Variabilité génétique de trois populations de Palourdes en ne prenant en compte que les 17 locus où les allèles ont été dénombrées.

Le tableau 11 établit une comparaison portant sur le total d'allèles observés et sur le nombre moyen d'allèles par locus. On constate que lorsque ces comparaisons sont faites sur les 5 locus étudiés dans les trois publications, ce nombre moyen est de 3,8 (Etang du Prévost) 3,2 (Irlande) 2,6 (Bretagne Occidentale). Le polymorphisme de la population méditerranéenne est donc plus élevé



que celles de l'Atlantique. En outre, sur ces 5 locus, Pgm1 et Lap1 sont polymorphes dans la population de Méditerranée et monomorphes dans celles d'Irlande et de Bretagne Occidentale. Ces résultats partiels suggèrent une différence entre populations de Méditerranée et d'Atlantique : ce n'est là qu'une hypothèse qui demanderait à être vérifiée.

Les résultats obtenus sur les populations de l'étang du Prévost (où 23 systèmes enzymatiques ont été étudiés) et ceux de Bretagne occidentale (où 19 systèmes enzymatiques ont été étudiés) permettent une comparaison plus approfondie. D'une part sur 10 locus communs, le nombre moyen d'allèles par locus qui est respectivement 3,0 et 2,1 confirme la variabilité plus forte de la population méditerranéenne (Tableau 11). D'autre part, dans les deux publications, les systèmes enzymatiques suivants n'ont donné aucun résultat exploitable : Glucose 6 phosphate deshydrogenase, Lactate deshydrogenase, Sorbitol deshydrogenase. Ces résultats négatifs peuvent avoir des bases physiologiques. Ainsi, d'après Regnouf et Van Thoai (1970) la lactate deshydrogenase n'existe généralement pas lorsqu'il y a de l'octopine deshydrase, ce qui est le cas chez l'espèce considérée.

SYSTEMES ENZYMATIQUES	LOCUS	NOMBRE D'ALLELES		
		W et P	M et L	Wi
Glucose phosphate isomérase	Gpi	7	5	6
Leucine amino-peptidase	Lap1	4	1	1
	Lap2	4	3	4
Phosphoglucomutase	Pgm1	2	1	1
	Pgm2	2	3	4
Nombre moyen d'allèles :		3,8	2,6	3,2
Aspartate aminotransferase (1)	Aat2	1	1	
Malate deshydrogénase	Mdh1	4	2	
	Mdh2	3	3	
Malique enzyme	Me2	2	1	
Super oxyde dismutase (2)	Sod1	1	1	
Nombre moyen d'allèles :		3,0	2,1	

Tableau 11 : Distribution des allèles de diverses populations de *Ruditapes decussatus* selon W et P (Worms et Pasteur, 1982), M et L (présent travail), Wi (Wilkins, 1975). (1) dénommé Glutamate oxaloacetate transaminase dans la publication W et P, (2) dénommé Indophenol oxidase dans la publication W et P.

## CONCLUSION

L'étude du polymorphisme génétique de 3 populations de Palourde de Bretagne Occidentale par l'analyse électrophorétique de 19 systèmes enzymatiques, n'a pas permis d'établir de distinction entre les 3 populations qui, à une exception près, ont les mêmes allèles dans des proportions voisines.

Cette analyse a montré que, malgré une évidente sous-estimation, la variabilité génétique de ces 3 populations se situe légèrement au dessus des valeurs données par Nevo (1978) concernant des Invertébrés. Cependant, la valeur obtenue est plus faible que celle qui est donnée par Wilkins (1975) et surtout que celle d'une population méditerranéenne (Worms et Pasteur, 1982).

- 
- Ayala, F.J., 1982 - Genetic variation in natural population : problem of electrophoretically cryptic alleles. Proc. Nat. Sci. U.S.A. 79 : 550-554.
- Ayala, F.J., D. Hedgecock, G.S. Zumwalt, and J.W. Valentine, 1973 - Genetic variation in *Tridacna maxima*, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. Evolution 27 : 177-191.
- Bisol, P.M., 1976 - Polimorfismi enzimotici ed affinita tassonomiche in *Tisbe* (*Copepoda*, *Harpacticoida*). Atti. Accad. naz. Lince, Rund Cl. Sci. Fish. mat. nat., 60 : 864-870.
- Brewer, G.J., 1970 - Introduction to izozyme. Academic Press, N. YORK : 186 p.
- Buroker, N.E., W.K. Hershberger, K.K. Chew, 1975 - Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Fish. Res. Bd Can. 32, 2471-2477.
- Buroker, N.E., W.K. Hershberger and K.K. Chew, 1979a - Population genetics of the family Ostreidae. 1. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. Mar. Biol., 54 : 157-169.
- Buroker N.E., W.K. Hershberger and K.K. Chew, 1979b - Population genetics of the family Ostreidae II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*.
- Gerard, A., 1978 - Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). Thèse 3e cycle, Univ. Brest : 149 p.
- Johnson A.G., F.M. Utter and K. Niggol, 1978 - Electrophoretic variants of aspartate aminotransferase and adductor muscle proteins in the native oyster (*Ostrea lurida*). Anom. Blood gps biochem. Genet. 3 : 109-113.
- Lewis, W.H.P., et Harris, H., 1967 - Human red cell peptidases Nature 215, 351.
- Nei, M., 1972 - Genetic distance between populations. An. Nat. 106 : 283-292.
- Nevo, E., 1978 - Genetic variation in natural populations : patterns and theory. Theor. Pop. Biol. 13 : 121-177.

- Regnouf, F. et N. Van Thoai, 1970 - Octopine and lactate deshydrogenases in mollusc muscles. Comp. Biochem. Physiol. 32 : 411-416.
- Schaal B.A. et Anderson W.W., 1974 - An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster *Crassostrea virginica*. Ga. Mar. Sci. Center, Techn. Rep. Ser. 74 : 3-19.
- Selander, R.K., 1970 - Behaviour and genetic variation in natural populations. American Zoologist, 10, 53-66.
- Selander, R.K., Smith, M.H., Yang S.Y., Johnson W.E., Gentry J.B., 1971 - Biochemical polymorphism in the genus peromyscus. I. Variation of the old field mouse (*Peromyscus polionotus*), studies in Genetus, Univ. texas Publ. n° 7103, 49-90.
- Shaw C.R. and Prasad R., 1970 - Starch-gel electrophoresis of enzyme. A compilation of recipes. Biochem. genetics, 4 : 297-320.
- Wilkins N.P., 1975 - Genic variability in marine Bivalvia : implications and applications in molluscan mariculture - 10 th Europ. Symp. Mar. Biol., 1 : 549-563.
- Wilkins, N.P. and N.F. Mathers, 1974 - Phenotypes of phosphoglucose isomerase in some Bivalve Molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 48(B) : 599-611.
- Worms J. et N. Pasteur, 1982 - Polymorphisme biochimique de la palourde *Venerupis decussata*, de l'étang du Prévost (France). Oceanol. acta 5 : 395-397.



DIX ANS DE PRODUCTION EN ECLOSERIE DE MOLLUSQUES BIVALVES

Yves LE BORGNE

SATMAR, Gatteville-le-Phare 50760 BARFLEUR

RESUME

La Société Atlantique de Mariculture a développé des techniques et des méthodes permettant la production annuelle de plus de 100 millions de naissains d'une taille de 2 à 10 millimètres. Parmi les 13 espèces concernées par ces productions les 3 principales sont les huîtres Crassostrea gigas, Ostrea edulis, et la palourde du Pacifique, Ruditapes philippinarum. La production de l'écloserie pourrait facilement doubler si le marché se développait. Les recherches actuelles portent sur l'amélioration de la qualité des produits par la sélection génétique et un abaissement du prix de revient par l'optimisation des performances au niveau de la phase nurserie.

ABSTRACT

SATMAR has developed techniques and methods allowing a production of over 100 million spat per year at a size from 2 to 10 millimetres. Among the 13 species concerned by this production, 3 of major importance are the oysters Crassostrea gigas, Ostrea edulis and the japanese little neck clam, Ruditapes philippinarum. The hatchery production could easily be doubled if the market would increase. Current research tend to increase the quality of the products by means of genetics and to lower the costs by improving the nursery phase.

MOTS CLES : Mollusques bivalves, Production commerciale, Ecloserie.

KEY WORDS : Bivalve molluscs, Hatchery, Commercial production.

## HISTORIQUE

Dans les années 1970, il y a eu une grande vogue aux U.S.A. pour les écloses commerciales produisant du naissain d'huîtres (Crassostrea virginica ou Crassostrea gigas). Confrontés à des problèmes de fluctuation dans l'approvisionnement de naissains d'huître plate Ostrea edulis, plusieurs ostréiculteurs de Bretagne associés à des financiers décidèrent de fonder la Société Atlantique de Mariculture pour exploiter en France les techniques fournies sous licence par la Société PACMAR de Californie.

En 1972, la SATMAR construit le laboratoire de Gatteville-le-Phare, sur la pointe N.E. du Cotentin, à une trentaine de kilomètres de Cherbourg. En 1973, les essais de production se soldent par des échecs répétés auxquels la PACMAR ne peut remédier. Le contrat de licence est donc dénoncé et chaque élément de la technique est remis en cause séparément jusqu'à ce qu'une solution satisfaisante soit trouvée. Il faudra pratiquement cinq années de recherches et de frustrations avant d'écarter successivement les épizooties au niveau de l'élevage larvaire, de la métamorphose et du naissain. En contrepartie, les améliorations obtenues à ce prix sont très fiables, et ont permis une progression constante de la production, contrairement à la quasi totalité des écloses d'Europe ou des U.S.A. qui connaissent des fluctuations importantes de la production d'une année à l'autre.

D'autre part, les objectifs initiaux de production ont évolué en fonction des données du marché. C'est ainsi que la vente de naissains en huître plate s'est trouvée contrariée par les épizooties qui ont frappé les animaux d'élevage dans le milieu naturel (Bonamia et Martelia) tandis que la production d'huîtres creuses C.gigas était encouragée par la disparition de Crassostrea angulata et plusieurs années médiocres pour le captage naturel du naissain. Enfin la mise au point de techniques nouvelles pour l'élevage des palourdes, notamment dans le cadre du programme national financé par le CNEXO et l'ANVAR ont permis un développement des ventes du naissain de Ruditapes philippinarum.

Il a été également produit à des fins commerciales ou expérimentales dans des quantités allant de quelques centaines de milliers à plusieurs millions d'unités, les naissains des espèces suivantes :

- la moule Mytilus galloprovincialis
- la palourde européenne Ruditapes decussatus
- le clam Mercenaria mercenaria
- la coquille St Jacques Pecten maximus
- le pétoncle Chlamys varia
- la "fausse" palourde Venerupis pullastra
- la praire Venus verrucosa
- l'huître portugaise Crassostrea angulata
- l'huître chilienne Ostra chilensis
- l'huître plate coréenne Ostrea denselamellosa

Il a été obtenu en outre des hybrides par croisement de Crassostrea gigas par Crassostrea angulata.

Les progrès techniques réalisés se traduisent par le tableau suivant figurant les quantités de naissains en millions d'unités pour les trois principales espèces commercialisées chaque année par la SATMAR :

Année \ Espèce	C.gigas	R.philippinarum	O.edulis	Total
1974	0,3	2		2,3
1975	1	1,5	0,2	2,7
1976	1,5	1,5	1,6	4,6
1977	5,1	2	1,8	8,9
1978	15,6	4,7	2	22,3
1979	29	8,5	1,5	39
1980	41	18	0,5	59,5
1981	45	23	0,5	68,5
1982	80	29	0,5	109,5
1983 (Chiffres provisoires)	29	32	0,5	61,5

Parallèlement à ses activités d'écloserie, la SATMAR a été amenée à développer des nurseries pour prégrossir le naissain produit avant de le fournir aux ostréiculteurs. Cela a été réalisé en premier lieu sur le site de Gatteville, puis à Isigny (Calvados) et à Marennes (Charente-Maritime) pour une contenance totale de 40 millions de naissains de 8 mm. Des essais de prégrossissement hivernal en eaux chaudes ont été menés aux Antilles, en Guyane Française (Iles du Salut) et au Sénégal.

Enfin en constatant le décalage entre les importantes possibilités offertes par l'élevage de la palourde et le faible intérêt manifesté par le milieu conchylicole, la SATMAR a décidé de se lancer elle-même dans la production d'animaux de taille marchande. Pour cela elle a aménagé 6 ha. d'anciennes claires dans la région de Marennes en 1980, et elle a ensemencé 1,5 ha. En 1982, sur l'estran, en Bretagne Nord dans le secteur des Abers, enfin en 1983, 7 millions de naissains ont été semés en Normandie à St. Vaast-la-Hougue ; la récolte devrait dépasser la centaine de tonnes à partir de 1985.

Pour mener à bien ces différentes activités la SATMAR a dû recruter et former un personnel relativement nombreux qui constitue aujourd'hui une équipe polyvalente et compétente. Sur un effectif de 18 personnes dont 1/3 de biologistes, une moitié est affectée à l'écloserie, l'autre s'occupant des opérations de prégrossissement ou d'élevage. Les frais de personnel représentent plus de 60 % d'un budget annuel de 4,5 millions de Francs.



## PERSPECTIVES

Après plusieurs exercices bénéficiaires, la SATMAR présentera cependant malgré tout pour 1983, un bilan déficitaire qui correspondra à une forte régression des ventes de naissains d'huîtres creuses, régression qui n'aura pas été compensée par une progression équivalente des ventes de naissains de palourdes ou des animaux actuellement en élevage.

En l'occurrence, les explications ne seront pas à rechercher dans des défaillances de la production mais dans les incertitudes du marché du naissain d'huîtres en corrélation avec les aléas climatiques : en effet une conjonction de facteurs favorables en été 1982 a abouti à des fixations exceptionnelles dans le milieu naturel et a entraîné un effondrement des cours pour 1983. Même si le naissain d'écloserie présente de nombreux avantages par rapport au naissain de captage, justifiant ainsi un prix de vente supérieur, il devient très difficile à écouler quand son prix de revient est quatre fois supérieur au prix de vente de son concurrent (par exemple 6 centimes contre 1,5 centime en 1983). Dans une telle situation deux possibilités sont envisageables pour lutter contre la concurrence :

1. Abaisser le prix de revient du naissain d'écloserie. C'est possible en produisant de très grandes quantités de naissains de petite taille, mais pour les grosses tailles se pose le problème de la nurserie, car pour prégressir davantage de naissains sans accroître la mortalité il faut tout augmenter dans les mêmes proportions : la dimension des installations, le pompage, le personnel etc... D'autre part, attendre des prix aussi bas que ceux pratiqués pour le naissain de captage en période de surproduction semble utopique.
2. Accroître les qualités et les performances du naissain d'écloserie pour le différencier radicalement du naissain de captage. C'est ce qui est tenté actuellement par la SATMAR en sélectionnant, en collaboration avec les professionnels, les caractères qu'ils souhaitent retrouver dans leurs animaux en élevage : forme de la coquille, résistance aux malformations constatées dans certains milieux.

Ces difficultés de commercialisation mettent également en évidence la nécessité de diversifier la production, surtout avec des espèces pour lesquelles le captage s'avère impossible (palourdes, clams) ou difficile sur nos côtes (coquille St Jacques). C'est ainsi que la SATMAR a commercialisé en 1983 550 000 naissains de clams. En 1984 l'accent sera mis sur la production de naissains de coquille St Jacques en application des techniques perfectionnées par de nombreuses années de recherche et en face de débouchés très prometteurs.

Les recherches en vue de trouver une solution aux épizooties frappant les huîtres plates seront poursuivies en testant des espèces de substitution et des possibilités de souches résistantes.

## CONCLUSION

Même quand elle est parvenue à un haut niveau de technicité et de fiabilité, l'écloserie de mollusques bivalves reste un outil fragile, parce que ses marges bénéficiaires sont faibles et que l'essentiel de ses prix de revient est constitué de frais de main d'oeuvre très spécialisée, donc difficilement modulable en fonction de la demande. Elle a malgré tout des domaines où elle est irremplaçable comme la sélection génétique et la production d'espèces nouvelles pour l'élevage ou le repeuplement. Elle peut également accroître sa sécurité financière en intégrant des activités complémentaires plus lucratives comme la vénériculture.

**CRUSTACÉS**



L'ADAPTATION ECOPHYSIOLOGIQUE ET SANITAIRE DE L'ECREVISSE TURQUE

*Astacus leptodactylus* (Eschscholtz 1823) A DES

MILIEUX SAUMATRES : CONTRIBUTION A L'ASTACICULTURE

I. BARBE<sup>(1)</sup>, J. LAUTIER<sup>(1)</sup>, G. VERNET<sup>(1)</sup>  
et A. VEY<sup>(2)</sup>

R E S U M E :

On détermine l'influence de milieux saumâtres sur divers aspects du cycle biologique de l'écrevisse turque *Astacus leptodactylus* ainsi que sur les agents pathogènes les plus communs de l'animal.

Survie et croissance sont examinées chez des juvéniles 0<sup>+</sup> et des intermédiaires 1<sup>+</sup>. Le métabolisme osmotique global et la reproduction sont suivis chez les adultes.

Il apparaît que les très jeunes individus sont particulièrement sensibles à des salinités mêmes modérées (7‰). Les intermédiaires se montrent plus résistants mais la salinité n'améliore pas la survie et la croissance. Chez les adultes le principal point de blocage se situe au niveau de la reproduction ; accouplement, ponte et tenue des oeufs aux pléopodes maternels étant très affectés.

La seule voie prometteuse semble être le traitement prophylactique ou curatif à base d'eau fortement salée, l'animal de par son métabolisme osmotique pouvant résister plusieurs dizaines d'heures à des milieux externes très hyperosmotiques.

A B S T R A C T :

The influence of salt media on different aspects of biological cycle and on most common pathogenic agents of turkish freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* is investigated survival and growing of juveniles 0<sup>+</sup> and intermediary individuals 1<sup>+</sup> are also studied. Total osmotic metabolism and reproduction, have been recorded. It appears that youngest individuals are particularly sensitive to low salinities (7‰). Intermediary ones are more resistant nevertheless salinity does not improve neither survival nor growing.

Copulation, laying and pleopod egg fixation are particularly affected by salt waters. The only promising application of salinity parameter on astaciculture could be wether prophylactic or curative treatment with concentrated salt water in wich animal osmotic resistance enables it to survive in hyperosmotic surrounding media for a period no longer than 48 hours.

M O T S - C L E S : Ecrevisse, *Astacus leptodactylus*, salinité, écophysiologie, pathologie, croissance, survie, reproduction, régulation osmotique, astaciculture.

K E Y W O R D S : crayfish *Astacus leptodactylus*, salinity, ecophysiology, pathology, growing, survival, reproduction, osmotic regulation, astaciculture.

(1) Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 - MONTPELLIER Cedex

(2) Station de recherches de cytologie et de pathologie comparée, I.N.R.A. 30380 - St Christol-les-Alès.



# REGULATION OSMOTIQUE

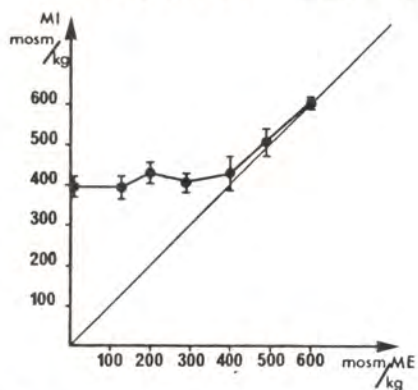


Fig. 1

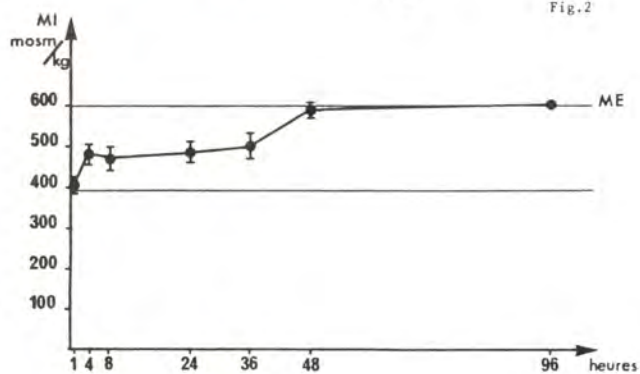


Fig. 2

## Mortalité des 0<sup>+</sup>

20°

15°

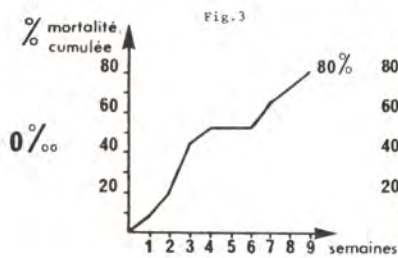


Fig. 3

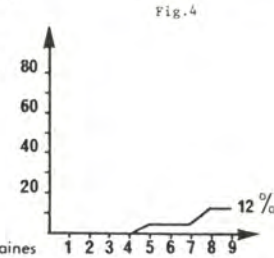


Fig. 4

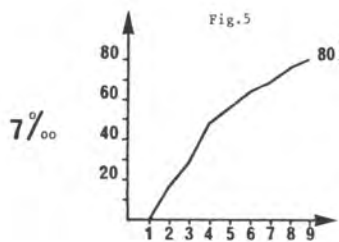


Fig. 5

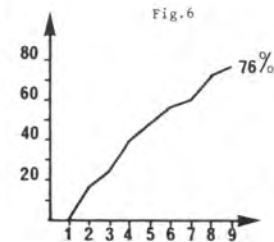


Fig. 6

## INTRODUCTION

L'écrevisse *Astacus leptodactylus* semble pouvoir supporter des eaux légèrement salées puisqu'elle est signalée dans les eaux saumâtres du bassin Pontocaspique (André, 1960, Zenkevitch, 1963, Tcherkashina, 1975).

D'autre part, des expériences préliminaires nous avaient permis de penser que des eaux légèrement salées pourraient être préventives ou curatives vis à vis des différents germes pathogènes dont la prolifération est catastrophique pour les élevages extensifs ou intensifs d'écrevisses. C'est pourquoi, nous avons essayé de déterminer d'une part les modifications physiologiques, d'autre part l'état sanitaire des animaux en fonction de la salinité du milieu.

## P R E M I E R E   P A R T I E

### 1. METABOLISME OSMOTIQUE

#### 1.1. Matériel et Méthodes :

Les animaux sont des adultes mâles en provenance de Turquie. Ils ont été mis en élevage dans des bacs en polyvinylchlorure alimentaire remplis avec 50 litres d'eau. L'eau douce provient d'un forage ; afin d'obtenir les salinités à tester, elle est mélangée à une proportion adéquate d'eau salée provenant de l'étang de Thau. Dans les bacs, sont placés des abris confectionnés avec des tubes de polyvinylchlorure destinés à servir de caches aux animaux. L'éclairage est artificiel avec un rythme 12L 12D. La température est de 20°C, le taux d'O<sub>2</sub> dissous reste voisin de 10 ppm, le pH évolue entre 7,5 et 8,5. Une circulation d'eau est assurée par une pompe EHEIM type 2013 02. Deux séries d'expérimentations ont été effectuées,

- d'une part une montée très progressive de la salinité au moyen d'un dispositif de goutte à goutte. L'augmentation de salinité était de 1°/°° par 24 heures. Le processus de montée en salinité était arrêté 24 heures avant chaque prélèvement d'hémolymphe,
- d'autre part, un stress osmotique : les animaux élevés en eau douce sont plongés dans une eau dont la salinité est 21°/°°.

Dans le premier cas, nous avons suivi l'évolution de la pression osmotique du milieu sérique en fonction de la salinité du milieu externe. Dans la seconde expérience, l'évolution de la pression osmotique fut observée en fonction du temps.

#### 1.2. Résultats :

##### 1.2.1. Adaptation progressive à différentes salinités:

Fig. 1 : jusqu'aux environs de 14°/°° (400 mosm/kg) l'écrevisse *Astacus leptodactylus* est hyperosmotique par rapport au milieu externe. Au delà, elle est strictement isosmotique comme la plupart des Astacidae ou des Parastacidae (Bryan, 1960, sur *Astacus fluviatilis*, Mills et Geddes, 1980 sur *Cherax destructor*). Il faut toutefois mentionner que certaines écrevisses présentent des caractères de régulateurs hypoosmotiques aux fortes salinités (Kerley et Pritchard, 1967 sur *Pacifastacus leniusculus*).

### 1.2.2. Stress osmotique (étude dynamique):

Fig.2 : Lorsque l'écrevisse *Astacus leptodactylus* est plongée brutalement dans un milieu externe dont la salinité est de 21‰ l'équilibre osmotique est atteint en 48 heures. Une première augmentation de la pression osmotique a lieu 1 à 4 heures après le début du stress. Après un palier d'une trentaine d'heures à 480 mosm/kg, la pression osmotique du milieu extracellulaire augmente à nouveau à partir de la 36<sup>e</sup> heure jusqu'à la 48<sup>e</sup> heure, pour finalement atteindre l'équilibre.

### 1.3. Discussion :

Deux faits méritent d'être soulignés :

- jusqu'à une salinité de 14‰, la vie en eau saumâtre ne doit théoriquement pas poser de problème physiologique majeur à *Astacus leptodactylus*.
- L'animal est susceptible de supporter de relatives fortes salinités pendant de courtes périodes. En effet, plongée dans un milieu à 600 mosm/kg (soit 1,5 fois la pression osmotique de son milieu interne), l'écrevisse turque ne subit qu'une augmentation de 20% de l'osmolarité de son milieu extracellulaire durant les premières 24 heures de ce stress.

## 2. SURVIE ET CROISSANCE

### 2.1. Matériel et méthodes :

Survie et croissance ont été évaluées sur deux groupes d'animaux : des juvéniles O<sup>+</sup> ayant un mois d'âge au départ de l'expérimentation et des écrevisses 1<sup>+</sup> âgées de 1 an 1/2 au début de la mise en élevage.

Les juvéniles ont été obtenus au laboratoire à partir de femelles grainées en provenance d'une exploitation astacicole extensive en Dordogne. Les intermédiaires sont issus de l'entreprise Pournis en Loire-Atlantique.

Afin d'éviter les phénomènes de cannibalisme très fréquents chez ces animaux, et dans le but de pouvoir suivre individuellement la croissance, nous avons isolé chaque animal dans une faisselle.

Les O<sup>+</sup> sont nourris avec des fragments de muscles abdominaux d'écrevisses adultes. Les 1<sup>+</sup> reçoivent des moules crues. Dans les deux cas, la nourriture est distribuée à satiété deux fois par semaine. Pour les deux groupes d'animaux, nous avons étudié l'influence de deux températures 20°C et 15°C, en plus de l'action de la salinité ; température et salinité ayant bien souvent des effets liés et synergiques.

Chez les O<sup>+</sup>, les salinités testées ont été 0‰ (témoins) et 7‰. Chez les 1<sup>+</sup>, nous avons également expérimenté à 14‰.

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et les conditions d'éclairage sont identiques à celles utilisées lors de l'étude du métabolisme osmotique.

### 2.2. Résultats :

#### 2.2.1. Survie :

##### 2.2.1.1. Survie chez les O<sup>+</sup> :

(figures 3,4,5,6) : il est très net que le lot élevé à 0‰ et à 15°C présente le taux de mortalité le plus faible (12% en 9 semaines). L'influence de la



salinité ne se fait véritablement sentir qu'à 15° où l'on constate une très nette diminution de la survie à 7°/°° (76% de mortalité en 9 semaines). A 20° on ne note aucun impact de la salinité sur les mortalités (80% à 0% et à 7°/°°), l'effet de la température est sans doute ici trop prépondérant et masque l'influence de la salinité.

#### 2.2.1.2 : Survie chez les intermédiaires 1<sup>+</sup>:

Les intermédiaires 1<sup>+</sup> étant nettement plus résistants, l'étude de la survie a pu être réalisée pendant plus de six mois.

##### 2.2.1.2.1. : survie à la température de 20°C (fig.7,8,9):

Les comportements des lots à 0°/°° et 7°/°° sont à peu près équivalents, toutefois les mortalités débutent un mois plus tôt à 7°/°°. Le meilleur taux de survie est chez les mâles à 7°/°° et chez les femelles à 0°/°°.

Le comportement du lot à 14°/°° se détache considérablement de celui des deux autres lots ; les mortalités y sont massives dès le 2ème mois d'élevage pour aboutir à la quasi disparition des animaux en six mois.

Il faut noter qu'à 20°C, les femelles sont toujours plus résistantes que les mâles.

##### 2.2.1.2.2. : survie à la température de 15°C (fig.10,11,12).

Dans ce cas également, les lots à 0°/°° et 7°/°° suivent à peu près la même évolution à la seule différence que les premières mortalités à 7°/°° interviennent deux mois avant celles du lot témoin. Au terme de l'expérimentation, les survies sont meilleures à 0°/°°. En fait, comme à 20°C, seul le lot à 14°/°° se détache d'une façon très nette avec des mortalités importantes à partir du 3ème mois d'élevage.

Il n'y a pas à 15°C, une meilleure survie des femelles comme c'est le cas à 20°C. Il faut souligner que pour une catégorie d'animaux donnée, les mortalités à 15°C sont toujours inférieures à celles rencontrées à 20°C. Température et salinité croissantes entraînent le même effet : l'augmentation du taux de mortalité.

#### 2.2.2. Croissance.

Deux types de paramètres ont été retenus pour évaluer la croissance des différents lots :

- le pourcentage de mues
- les accroissements linéaire et pondéral journaliers

##### 2.2.1.2 : Evolution du pourcentage de mues :

Chez les juvéniles, ce sont les animaux à 0°/°° et à 15°C qui muent le plus souvent. Tant à 20°C qu'à 15°C, une salinité croissante entraîne une diminution du nombre de mues (fig.13,14,15,16).

Chez les 1<sup>+</sup> à 20°C (fig.17,18,19) les lots à 0°/°° et 7°/°° évoluent à peu près de la même façon : ils présentent deux "pics" de mues, le second plus étalé dans le temps que le premier. A 14°/°°, il y a moins de mues que dans les autres lots. Notons que bien que les lots soient totalement indépendants les uns des autres, il y a synchronisme des "pics" de mue.

Chez les 1<sup>+</sup> à 15°C (fig. 20,21,22), le déclenchement des mues a été plus tardif qu'à 20°C. (1 mois de retard). Nous ne rencontrons qu'une seule période de mue

# Mortalité des 1<sup>+</sup> à 20<sup>o</sup>

— ♂

- - - ♀

Fig.7

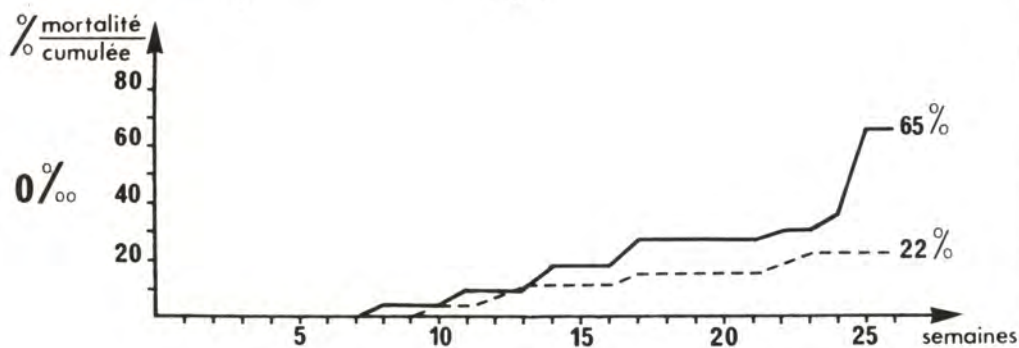


Fig.8

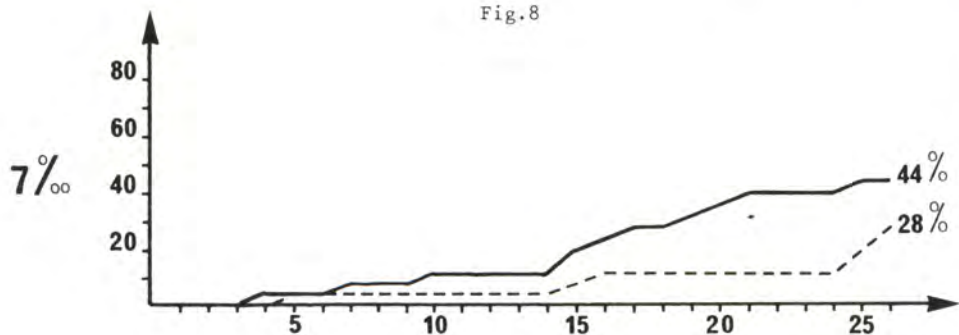
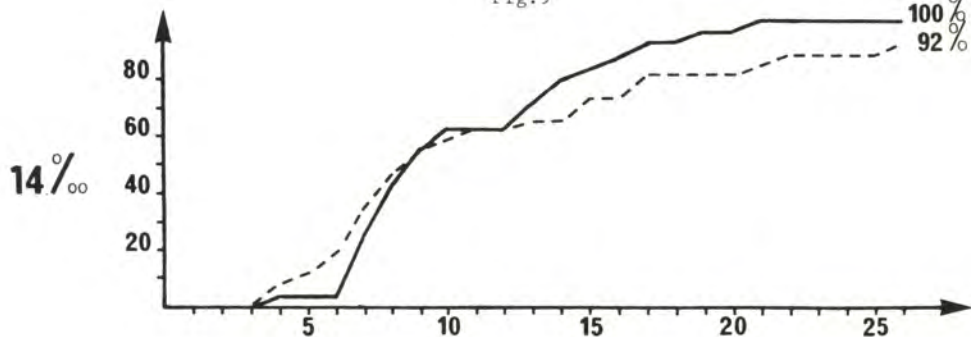
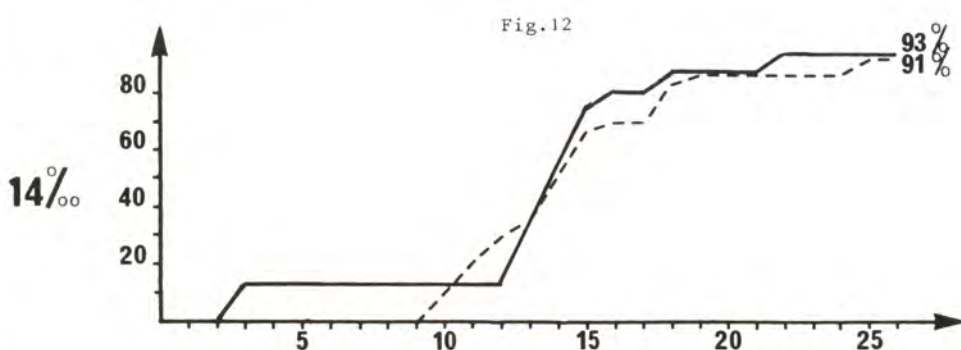
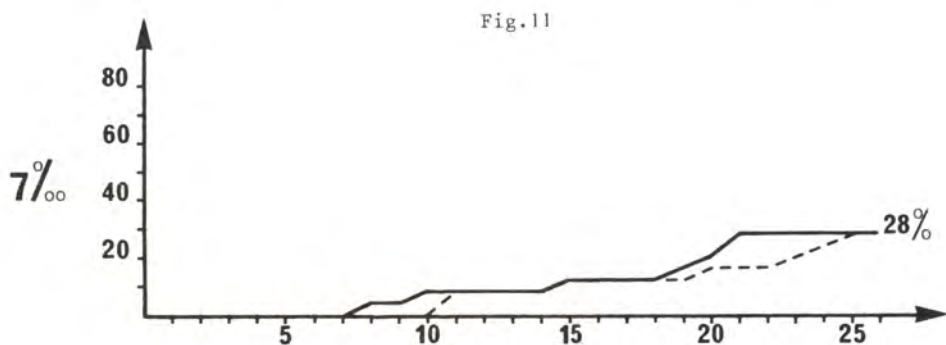
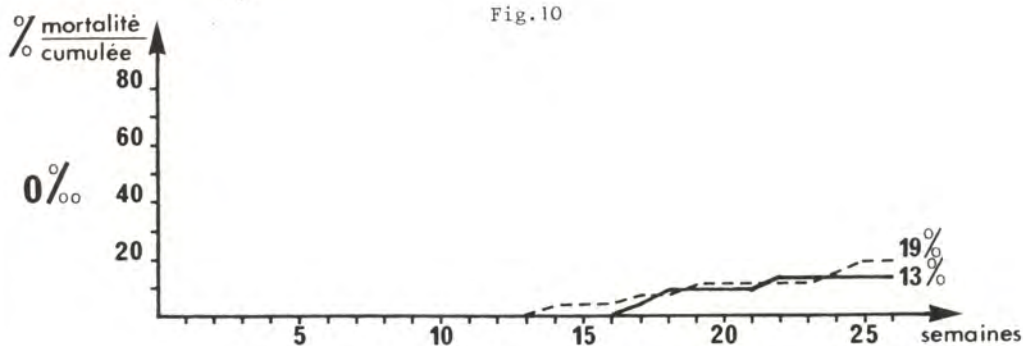


Fig.9



# Mortalité des 1<sup>+</sup> à 15<sup>o</sup>

— ♂  
 - - - ♀

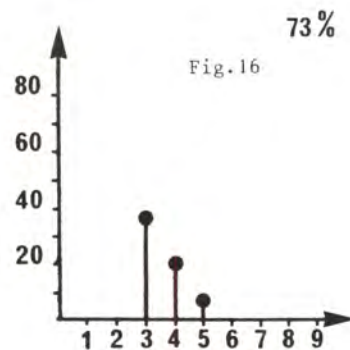
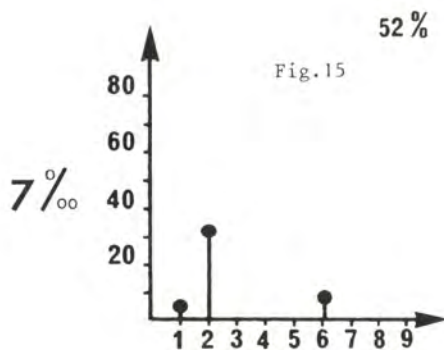
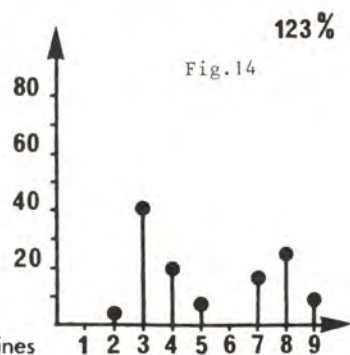
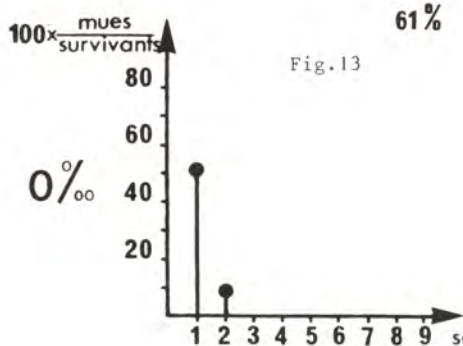




# Taux de mue des $O^+$

$20^\circ$

$15^\circ$



# Taux de mue des 1<sup>+</sup> à 20<sup>o</sup>

● — ♂

○ - - ♀

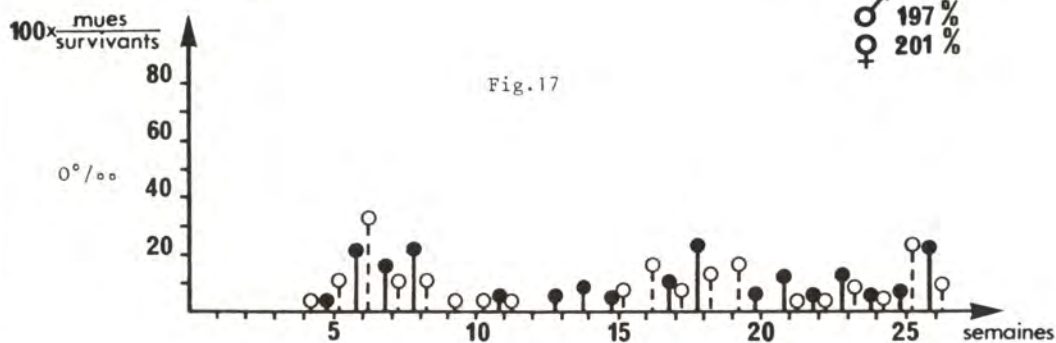


Fig. 18

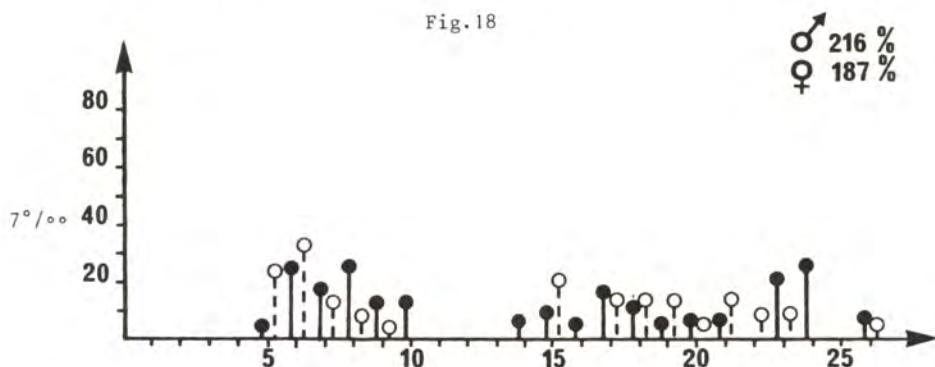
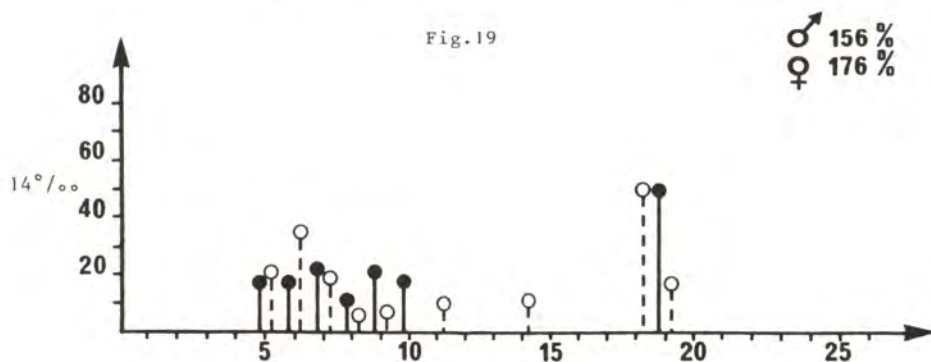


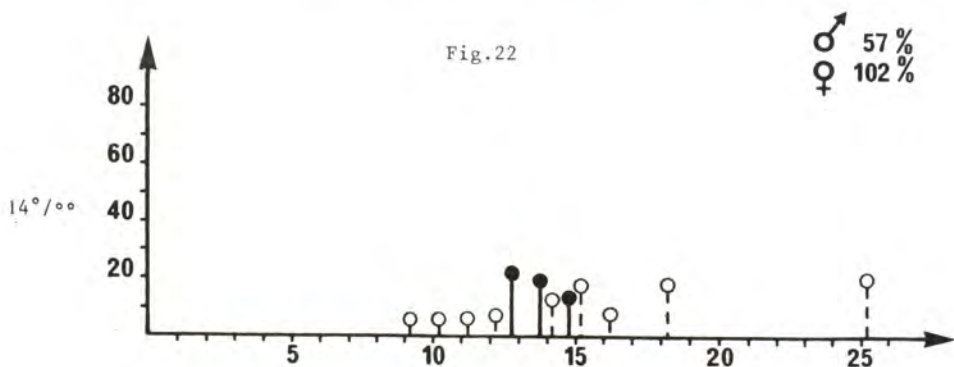
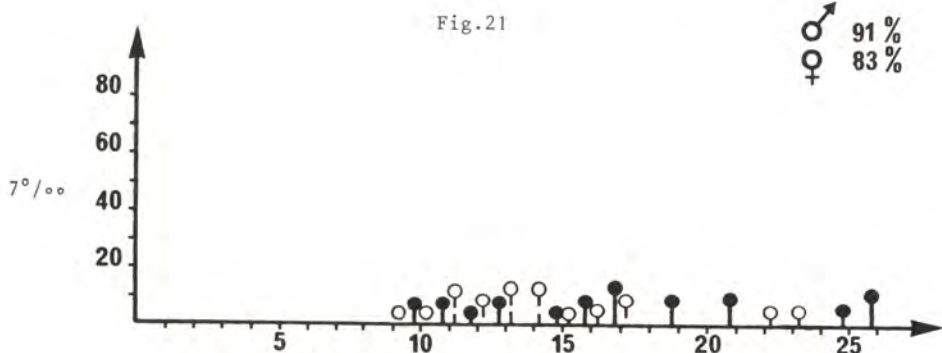
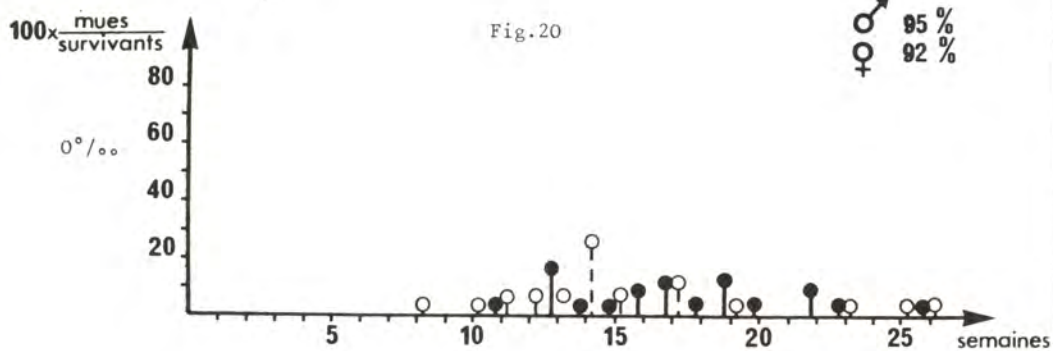
Fig. 19



# Taux de mue des 1<sup>+</sup> à 15<sup>0</sup>

● — ♂

○ - - ♀

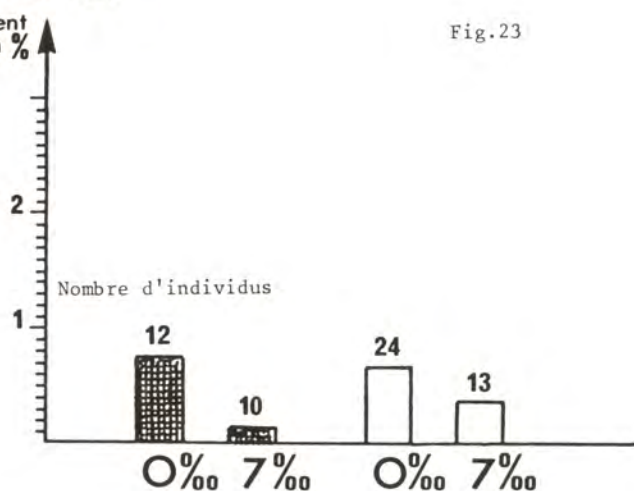




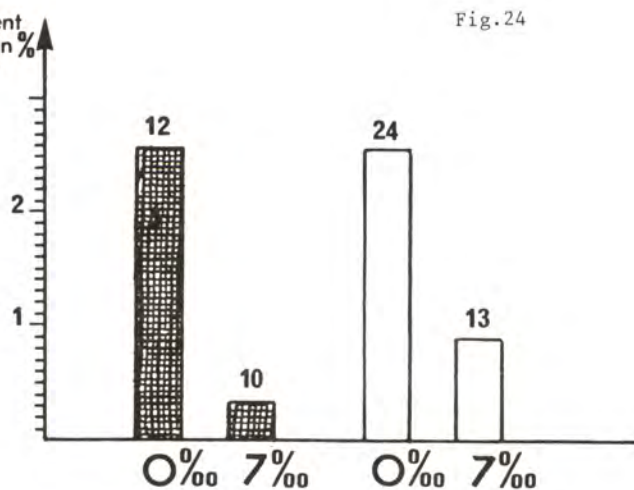
# TAUX DE CROISSANCE DES 0<sup>+</sup>



accroissement  
linéaire en %  
par jour



accroissement  
pondéral en %  
par jour



très étalée dans le temps. Ici aussi une salinité de 14‰ semble globalement (mâles et femelles confondus) moins favorable à la croissance.

#### 2.2.2.2 : Etude des accroissements linéaire et pondéral:

Chez les juvéniles (fig.23,24) ; à 0‰ il n'y a pratiquement pas de différence de croissance entre les animaux élevés à 20°C et ceux élevés à 15°C. Par contre à 7‰ une température de 15°C est plus favorable, globalement l'optimum thermique est donc de 15°C. Toutefois une salinité de 7‰ ralentit considérablement la croissance des juvéniles.

Chez les 1<sup>+</sup> (fig. 25,26) l'optimum de température est de 20°C, les femelles grandissent mieux que les mâles et une salinité de 7‰ ne semble pas avoir d'influence majeure sur la croissance.

A 14‰, il nous a été impossible de disposer de suffisamment d'individus pour évaluer d'une façon valable les taux d'accroissement linéaire et pondéral.

### 2.3. Discussion :

Au niveau de la survie, la salinité est un facteur très limitant surtout chez les très jeunes individus. La salinité ralentit la croissance de façon sensible chez les 0<sup>+</sup> nettement moins chez les 1<sup>+</sup>. Ce résultat n'est pas surprenant, même chez l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus* plus euryhaline qu'*A. leptodactylus* une salinité de moins de 5‰ suffit à ralentir la croissance (Rundquist et Goldman, 1978) sans doute par une simple diminution de la quantité de nourriture ingérée.

## 3. REPRODUCTION :

### 3.1. Matériel et méthodes :

Les écrevisses en provenance de Turquie sont mises en élevage dans des bacs en polyéthylène contenant 400 litres d'eau. L'expérimentation s'est poursuivie durant 15 semaines à partir du 1er novembre 1982 avec une photophase naturelle. La température a été maintenue à 14°C±1°C. Trois lots ont été constitués 0‰, 3‰ et 6‰ de salinité avec 12 mâles et 38 femelles par lot. Nous avons suivi l'évolution de différents paramètres caractéristiques du potentiel reproducteur.

- Le taux de femelles porteuses de spermatophores, ce qui équivaut à un taux des accouplements réussis,

- le taux de femelles porteuses de glandes cémentaires.

Ces glandes sont destinées à sécréter un liquide visqueux qui attachera les oeufs aux pléopodes de la mère après la ponte. Leur présence indique que la femelle n'a pas encore pondu.

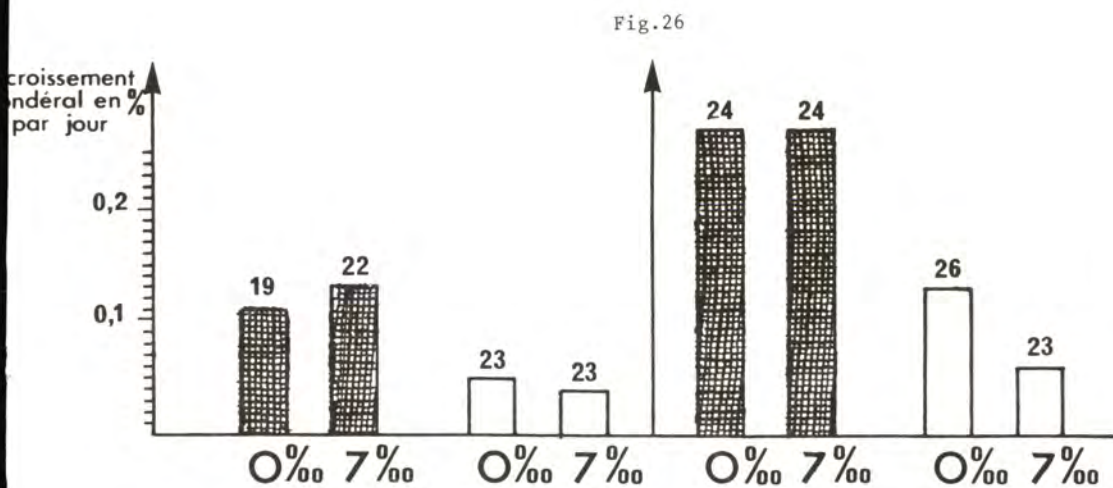
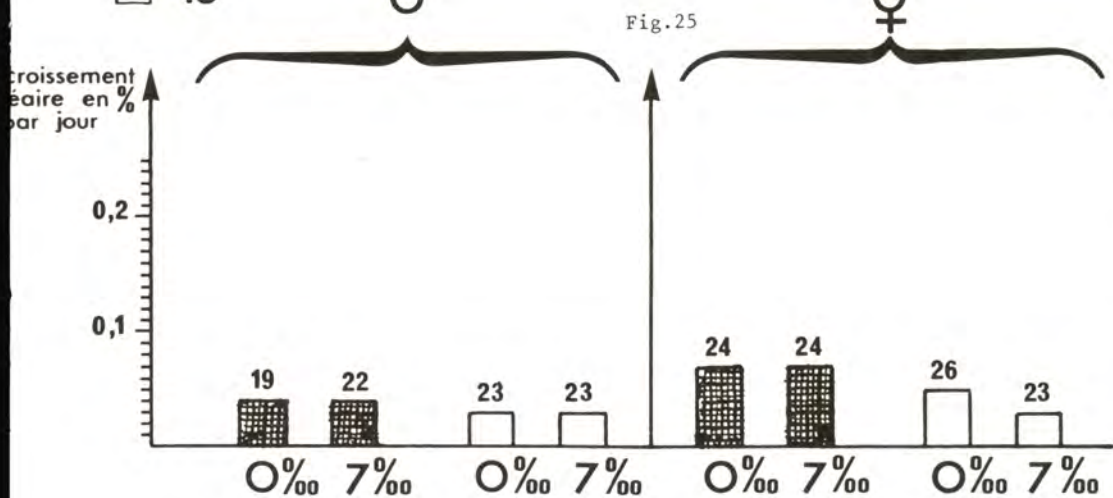
- Le taux de femelles grainées

De plus, nous avons enregistré les mortalités qui ont affecté les mâles et les femelles adultes des différents lots durant la saison de reproduction.

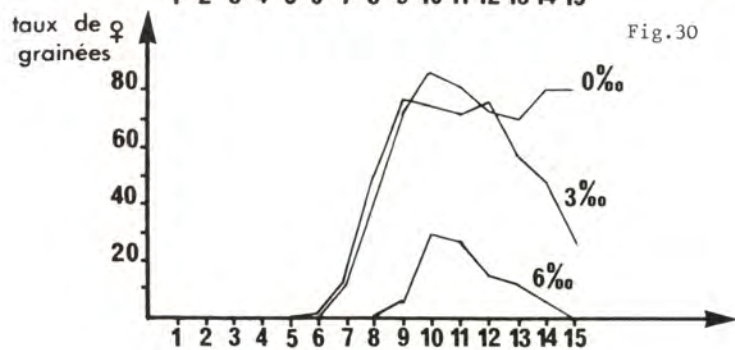
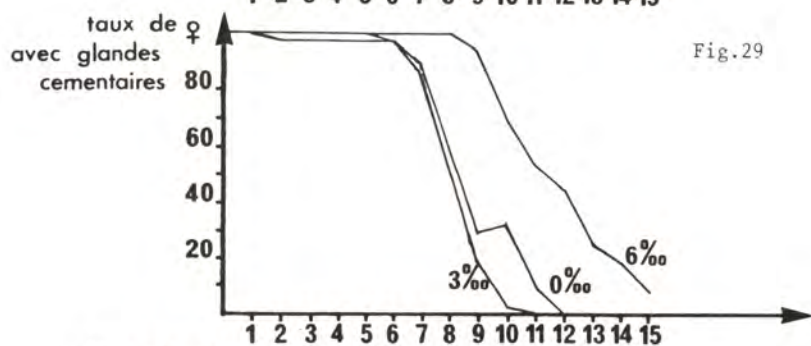
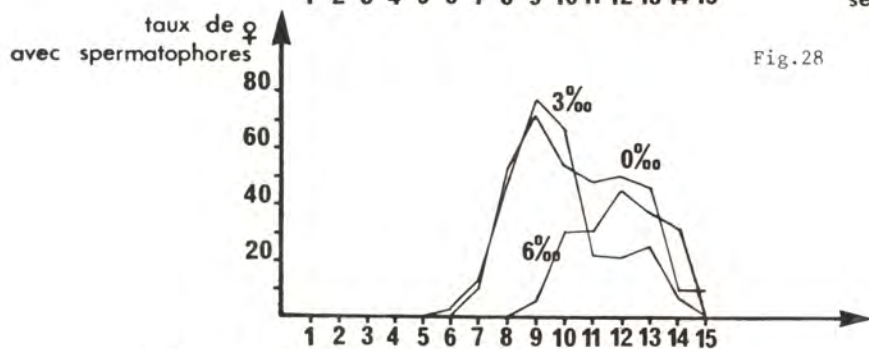
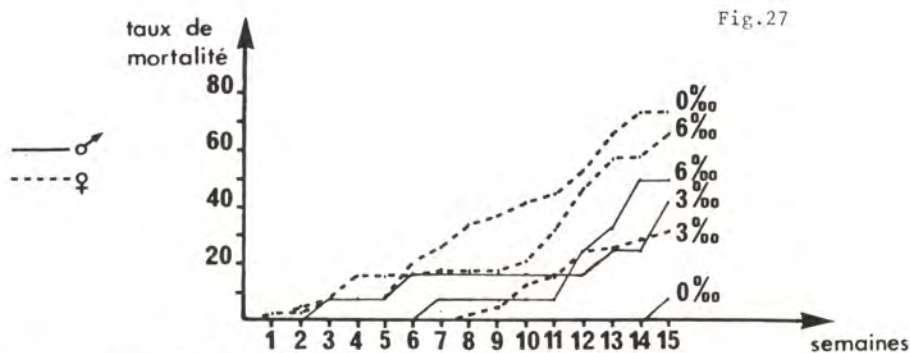
### 3.2. Résultats et discussion :

Nous avons pu constater (fig.27) que beaucoup de femelles meurent sans doute à cause de l'agressivité des mâles lors des accouplements. D'une façon plus générale durant cette période critique, les femelles sont moins résistantes que les mâles. Les accouplements (figure 28) sont fortement affectés par une salinité de 6‰, leur nombre est réduit de moitié et nous avons noté un retard de 2 à 3 semaines par rapport aux animaux témoins. Cette même salinité de 6‰

# TAUX DE CROISSANCE DES 1<sup>+</sup>







entraîne une réduction des deux tiers du nombre de femelles grainées (fig.29,30). Ce phénomène est sans doute à relier au précédent, la ponte semblant dépendre étroitement de l'accouplement chez *Astacus leptodactylus*. Enfin, il est à noter que 6 g de sel par litre d'eau dans le milieu environnant de cet animal provoquent une très nette diminution de la teneur des oeufs aux pléopodes de la mère. Ceci est à relier à la non coagulation en eau salée du liquide visqueux secrété par les glandes cémentaires. Toutefois, l'eau salée est sans effet sur le ciment déjà solidifié.

## DEUXIEME PARTIE

### I. EFFET IN VITRO DE LA SALINITE SUR LA CROISSANCE DE MICROORGANISMES PATHOGENES POUR LES ECREVISSES.

L'action d'une gamme de salinités (0,7,14,21,28‰) sur la croissance de différents germes a été testée sur des souches de bactéries et champignons pathogènes isolées d'écrevisses, notamment d'*A.leptodactylus* et conservées dans la collection de germes de la station de Saint Christol à l'exception de l'isolat J1 d'*Aphanomyces astaci* obtenu grâce à l'amabilité du Dr. K.SÖDERHÄLL, Université d'Uppsala, Suède.

#### 1.1. Bactéries :

La présence de NaCl dans l'eau peptonée utilisée comme milieu de culture a un effet inhibiteur sur la multiplication de bactéries appartenant aux espèces *Pseudomonas fluorescens*, *P.putida* et *Aeromonas hydrophila*, agents d'infections septicémiques. Lorsque l'inoculum bactérien est faible cette action, mesurée par turbidimétrie est déjà décelable à une salinité de 14‰ et devient très importante à 28‰ (Cf.tableau n°1).

#### 1.2. Champignons :

En ce qui concerne les champignons, la croissance mycélienne de Saprolegniales, comme *Saprolegnia* sp. et *Saprolegnia diclina*, testée sur milieu peptone-glucose gélosé est également fortement affectée puisque sensiblement ralentie à 7 et 14‰, et même totalement inhibée à 21 et 28‰ (Cf.tableau 2). Comparativement d'autres cryptogames comme le phycomycète *Aphanomyces astaci*, parasite très dangereux puisque agent de la "peste", et les *Fusarium roseum* Var. *culmorum* hyphomycètes responsables d'infections branchiales, sont nettement moins sensibles. En effet, en comparaison avec les salinités moyennes, seule la concentration de NaCl la plus élevée entraîne une certaine réduction de leur développement végétatif en milieu solide (Cf.tableau 3). On remarquera que, pour *Fusarium*, le milieu totalement dépourvu de sel est aussi défavorable.

### II. EFFET DE LA SALINITE SUR LA GERMINATION DES SPORES FONGIQUES :

Afin de préciser l'impact de la salinité sur germes pathogènes pour les écrevisses, nous avons recherché son effet sur la germination des spores de champignons, stade décisif pour l'établissement de l'infection. Les travaux ont été réalisés sur des suspensions de spores dans des solutions salines à 0 ; 0,015 ; 7 ; 14 ; 21 et 28‰ additionnées d'éléments nutritifs. L'examen des cultures en gouttes pendantes qui ont été préparées a confirmé la grande sensibilité d'agents comme *Saprolegnia* sp. à la présence de NaCl dans le milieu, puisque la germination des zoospores de cette saprolegniale est affectée dès la concentration de 7‰.

TABLEAU 1

EFFET DE LA SALINITE SUR LA MULTIPLICATION DES BACTERIES PATHOGENES AUX ECREVISSES, CONTROLEE PAR MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE

	Salinité				
	0‰	7‰	14‰	21‰	28‰
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (souche S2-E2)	0,94	1,01	0,42	0,16	0,11
<i>Aeromonas hydrophila</i> (souche Roq 1)	1,59	1,45	0,66	0,18	0,10

Rem.: Inoculum =  $4 \times 10^2$  bact/ml. Mesures effectuées après 24h de croissance dans des eaux peptonées de différentes salinités, à 25°C.

TABLEAU 2

EFFET DE LA CONCENTRATION SALINE SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DE *Saprolegnia* sp. PARASITE DE L'ECREVISSE *Astacus leptodactylus* Esch.

	Salinité				
	0‰	7‰	14‰	21‰	28‰
Diamètre des colonies après 2j	2,2	0,8	0	0	0
différents temps 5j	8,5	5,8	1,3	0	0
d'expériences 7j (en cm)	id.	8,5	3,6	0	0

Rem.: La croissance est mesurée par le diamètre des colonies se développant sur milieu peptone-glucose gélosé, à la température de 25°C.

TABLEAU 3

EFFET DE LA SALINITE SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE ET LA GERMINATION DES CONIDIES DE L'HYPHOMYCETE *Fusarium roseum* VAR. *culmorum*

		0‰	0,015‰	7‰	14‰	21‰	28‰
		Diamètre des colonies en cm	2j	1,1	x	1,5	1,4
	4j	5,2	x	7	6,9	6,9	6,3
Taux de germination (après 12h)		34%	96%	75%	75%	55%	35%

Rem.: la croissance des colonies est mesurée sur malt gélosé, à 25°C. Le taux de germination des conidiospores est contrôlé sur des suspensions préparées dans des solutions de Na Cl de différentes concentrations, additionnées de peptone et de glucose (6‰).



Il a en outre établi que la germination des conidiospores de *F. roseum* var. *culmorum*, rapide et très élevée dans une eau dont la teneur en chlorure est celle de l'eau douce, est plus réduite à 7 et 14‰, puis fortement inhibée à 21 et 28‰ (Cf. tableau 3).

Ces observations montrent que, même un germe peu sensible à la salinité en ce qui concerne sa croissance végétative, peut cependant être fortement affecté dans sa capacité à germer.

### 3. EFFET DE LA SALINITE SUR LE DEVELOPPEMENT D'INFECTIONS CHEZ L'HOTE.

Les recherches pathologiques in vivo ont été effectuées sur des lots de 10 *Astacus leptodactylus* adultes. Ces écrevisses sont placées soit dans une eau à 14‰ soit en eau douce après réalisation de coupures hémorragiques au niveau des deux branchostégites.

La mortalité des animaux témoins non traités ou blessés et placés en eau saumâtre est très faible (10%) alors qu'en eau douce les écrevisses porteuses de blessures ont un taux de létalité élevé (50%) dû au développement de bactéries septicémiques et de saprologniales occasionnellement pathogènes ayant mis à profit les portes d'entrée créées expérimentalement.

Par contre, la réalisation de scarifications superficielles non hémorragiques de la cuticule abdominale ventrale ne favorise pas le développement de maladies, ni en eau douce, ni en milieu saumâtre.

### CONCLUSION

L'ensemble des résultats nous amène aux conclusions suivantes :

1. L'effet de salinité sur la croissance et la survie est d'autant plus sensible que l'animal est jeune. Pour une catégorie d'âge donnée, la nocivité est d'autant plus grande que la salinité est forte. Une corrélation très élevée entre la température et la salinité est observée au niveau de la survie. En ce qui concerne la croissance, la salinité est le facteur prépondérant chez les 0<sup>+</sup> alors que chez les 1<sup>+</sup>, c'est la température.

Au niveau de la reproduction, les effets inhibiteurs apparaissent à des salinités peu importantes voisines de 5‰. Ils affectent le processus d'accouplement, la ponte et la tenue des oeufs avant la prise du ciment.

De ce fait, il est permis de s'interroger sur la présence permanente d'*A. leptodactylus* en mer Caspienne dans des eaux de 12 à 14‰. Il est possible que l'animal effectue les migrations adéquates ou bien que les écrevisses de la mer Caspienne constituent une race géographique très différente des animaux expérimentés, en provenance de Turquie.

2. Les résultats obtenus au cours des expérimentations in vitro établissent l'existence d'un effet inhibiteur de la salinité sur la croissance et surtout sur la germination de microorganismes pathogènes aux écrevisses. Ce facteur présente donc une potentialité élevée à s'opposer au déclenchement d'épizooties. L'effet protecteur du milieu saumâtre vis-à-vis des germes facultativement pathogènes présents dans l'environnement a été confirmée par les expériences réalisées sur animaux vivants.

Ces données présentent un grand intérêt au plan fondamental pour la compréhension de l'effet des qualités du milieu sur le développement des épizooties chez les écrevisses, et au plan appliqué, en ce qui concerne les perspectives de développement de l'astaciculture en milieu saumâtre.

En résumé, l'utilisation d'eaux saumâtres d'une façon continue chez *Astacus leptodactylus* paraît peu propice pour l'astaciculture. En effet, des salinités faibles de l'ordre de 7‰ toxiques chez les juvéniles ne présentent pas d'intérêt sanitaire pour les adultes puisque la plupart des germes pathogènes ne sont pas affectés par de telles concentrations en NaCl.

Par contre, il est tout à fait certain que des salinités assez fortes (21-28‰) inhibitrices de beaucoup d'agents pathogènes dulçaquicoles sont supportables sur de très courtes périodes (moins de 48 heures) par *Astacus leptodactylus*. Dès lors, l'augmentation de salinité peut être envisagée comme traitement préventif ou curatif de ce type d'agents pathogènes.

- 
- André (1960). - Les écrevisses françaises Ed. P. Lechevalier, 1 vol., 293p.
- Bryan G.W. (1960). - Sodium regulation in the crayfish *Astacus fluviatilis* III. *J.exp.Biol.* 27 113-128.
- Kerley D.E. & Pritchard A.W. (1967). - Osmotic regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, Stepwise acclimated to dilutions of sea water *Comp.Biochem.Physiol* 20, 101-113.
- Mills B.J., & Geddes M.C. (1980). - Salinity tolerance and osmoregulation of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae) *Aust.J.Mar.Freshwater Res.* 31, 667-676.
- Rundquist J.C. & Goldman, Ch.R. (1978). - Growth and food conversion efficiency of juvenile *Pacifastacus leniusculus* along a salinity gradient. *Freshwater crayfish IV*. Ed. by P.J.Laurent, 105-113.
- Tcherkashina N.Ya (1975). - Distribution and biology of crayfishes of genus *Astacus* (Crustacea, Decapoda, Astacidae) in the turkmen waters of the Caspian sea. *Freshwater crayfish II*. Ed. by J.W.Avault 553-555.
- Zenkevitch L. (1963). - Biology of the seas of the U.S.S.R. Ed. Georges Allen & Unwin Ltd. 1vol. 950p.

VARIABILITE GENETIQUE DE QUELQUES ESPECES DE CREVETTES PENEIDES D'INTERET AQUICOLE

G. L. Ko<sup>1</sup>, N. Pasteur<sup>1</sup>, F. Bonhomme<sup>1</sup>, Aquacop<sup>2</sup>, Seafdec<sup>3</sup> et D. Liao<sup>4</sup>

Résumé

Treize populations appartenant à sept espèces de Crevettes Pénéides (Crustacea, Decapoda), ont été analysées à 29 locus protéiques par électrophorèse enzymatique. Les résultats montrent une très faible variabilité génétique tant interpopulationnelle qu'intrapopulationnelle.

Summary

Thirteen populations belonging to seven species of Penaeid prawns (Crustacea, Decapoda) were analyzed at 29 protein loci. We show that both inter- and intrapopulation genetic diversity are very low. These results are discussed in view of their use as guidance for aquaculture programs.

Mots-clés : Crustacés, crevettes Pénéides, variabilité génétique, polymorphisme enzymatique.

Key Words : Crustacea, Penaeid prawns, genetic diversity, enzyme polymorphism.

1- Laboratoire de Génétique - Institut des Sciences de l'Evolution  
USTL - Pl. E.-Bataillon - 34060 Montpellier cedex

2- Equipe d'aquaculture - Centre Océanologique du Pacifique  
CNEXO - BP 7004 - Taravao - TAHITI

3- Crustacean Hatchery, Seafdec Aquaculture Dpt., Tigbavan, Ilo-Ilo - Philippines

4- Tunkang Marine Laboratory, Pingtung, TAIWAN 916 - Republic of China.



Espèce	Statut	Origine	Nombre d'individus	Hétérozygotie	Nombre de locus polymorphes
<i>P. japonicus</i>	C.O.B. élevage	Japon	25	0,015	1
<i>stylirostris</i>	C.O.P. élevage	Equateur	18	0,045	4
<i>stylirostris</i>	C.O.P. élevage	Mexique	15	0,036	3
<i>vannamei</i>	C.O.P. élevage	-	19	0,016	1
<i>vannamei</i>	C.O.P. élevage	Equateur	16	0,031	2
<i>monodon</i>	C.O.P. élevage	-	21	0,016	2
<i>monodon</i>	sauvages	Taiwan	32	0	0
<i>monodon</i>	sauvages	Fidji	5	0,023	2
<i>monodon</i>	sauvages	Philippines	24	0,011	3
<i>indicus</i>	C.O.P. élevage	Philippines	11	0,014	1
<i>indicus ?</i>	sauvages	Kénya	20	0,026	4
<i>orientalis</i>	C.O.P. élevage	Hong-Kong	12	0,021	3
<i>kerathurus</i>	sauvages	France	21	0,051	5

TABLEAU I  
Hétérozygotie moyenne et nombre de locus polymorphes  
pour 13 populations de Crevettes Pénéides étudiées à 29 locus

		Identité protéique
STY/EQU	STY/MEX	0,89
VAN/COP	VAN/EQU	0,99
MON/COP	MON/TAI	0,96
MON/COP	MON/FIDJ	0,99
MON/COP	MON/PHI	0,96
MON/TAI	MON/FIDJ	0,96
MON/TAI	MON/PHI	0,93
MON/FIJ	MON/PHI	0,96
IND/PHI	IND ? / KEN	0,82

I moyenne :  
 $\bar{I} = 0,96$

TABLEAU II  
Identités protéiques intraspécifiques

## INTRODUCTION

Nous avons entrepris une étude de la diversification génétique inter- et intrapopulationnelle de quelques crevettes Pénéides d'intérêt aquicole, ceci dans le but de préciser nos connaissances sur la structure de ces espèces et d'en tirer des enseignements pour la gestion des stocks d'élevage et leur éventuelle amélioration. La bibliographie sur ce sujet est très pauvre, comprend peu d'espèces d'intérêt aquicole, et représente un échantillonnage géographiquement très restreint. Ceci justifiait donc la présente étude .

## MATERIEL ET METHODE

Animaux: Le tableau I donne dans ses premières colonnes la liste des animaux que nous avons analysés, leur nombre, leur appartenance spécifique et leur provenance géographique.

Techniques: Nous avons employé les techniques maintenant classiques de l'électrophorèse enzymatique. Vingt-neuf locus communs au treize échantillons ont été analysés: *Aat-1*, *Aat-2*, *Acp*, *Es-A*, *Glo*, *Gpi*, *Hpd*, *Ldh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Me*, *Mpi*, *Pgm*, *Pt-A*, *Pt-B*, *Sod*, *Ao-1*, *Ao-2*, *Amy*, *Lap-3*, *Lap-4*, *βGal*, *Akp-1*, *Akp-2*, *Akp-3*, *Car-1*, *Car-2*, *Car-3*, *Dia*. Le détail des techniques électrophorétiques employées et des fréquences alléliques obtenues pour chaque protéine est disponible auprès des auteurs.

## RESULTATS

Variabilité intrapopulationnelle. Le tableau I donne dans ses dernières colonnes la mesure de l'hétérozygotie moyenne de chaque population, ainsi que le nombre de locus polymorphes. Il apparaît immédiatement que tous les taux d'hétérozygotie enregistrés sont extrêmement bas, et que ces espèces sont extrêmement peu polymorphes. Ceci confirme les résultats obtenus par LESTER (1979), MULLEY & LATTER (1980) ou SBORDONI et coll. (1982) chez d'autres espèces. Par rapport à l'ensemble des Invertébrés, ces taux sont très faibles. Par rapport à l'ensemble des Crustacés Décapodes, ils sont également faibles puisque NELSON & HEGECKOCK (1980) trouvent pour quarante quatre espèces d'entre eux des valeurs de H comprises entre 0,8% et 12,8% .

c'est-à-dire employant très peu de combinaisons chromosomiques maintenues à l'état hétérozygote par des phénomènes de sélection balancée, de superdominance ou de flux génétique à longue distance entre populations différenciées. Ce type de situation serait rencontré pour des espèces mobiles installées dans une niche écologique stable et durable comme cela semble être le cas pour ces Pénéides. Le type de structure génétique diamétralement opposée serait par exemple celui d'Invertébrés sessiles comme *Mytilus edulis* qui vivent dans un milieu contrarié (zone de balancement des marées) et démontrent une très forte hétérozygotie. Quoiqu'il en soit du débat théorique de fond sous-jacent à l'interprétation de ces données, la conséquence la plus immédiate pour l'aquiculture des Pénéides serait que ces animaux supporteraient bien la consanguinité (ils sont déjà virtuellement homozygotes) ce qui semble être attesté par la facilité avec laquelle nombre d'élevages de Décapodes ont été initiés avec un nombre extrêmement réduit de géniteurs. Une autre question importante est de savoir si ce manque d'hétérozygotie au niveau des locus codant des enzymes est associé à un manque de variabilité des caractères quantitatifs nécessaire à tout programme d'amélioration génétique par sélection artificielle : la réponse est probablement non. Ces caractères sont fortement polygéniques, donc facilement variables, et dans toutes les espèces animales où l'on a pu la mesurer, la variance génétique additive semble toujours présente. Cependant, dans le cas des Pénéides, l'héritabilité qui est inversement proportionnelle à la variance totale (c'est le rapport de la variance génétique additive sur la somme de la variance environnementale et de la variance génétique) pourrait être très faible : les effets environnementaux, épigénétiques, aléatoires, sont d'une ampleur telle que, de la nauplie jusqu'à l'individu de taille commerciale ou reproductrice, il y a tout un ensemble d'aléas qui peuvent modifier de façon énorme la valeur phénotypique des animaux et masquer complètement d'éventuels effets génétiques.

- Corrolairement à ce qui précède, une conséquence de la très faible hétérogénéité interpopulationnelle est qu'il faut s'adresser à des populations éloignées sur le plan géographique pour obtenir des souches de composition génétique suffisamment différentes. Pour l'aquiculture, la tentation peut être d'exploiter ces différences pour essayer d'obtenir par croisements des effets d'hétérosis significatifs à la  $F_1$ , et donc de tirer



parti d'effets d'interaction. Quoique cette voie ne soit pas à négliger, en particulier pour les espèces qui ont une répartition indo-pacifique et donc susceptibles de présenter des différences sensibles d'un bassin océanique à l'autre, il ne faut pas en attendre trop. Les résultats obtenus par ces méthodes chez la Chevrette *Macrobrachium rosenbergi* sont en effet décevants (MALECHA, 1980), et sur le plan théorique on attend des phénomènes d'hétérosis plutôt pour les espèces assez hétérozygotes qui maintiennent polymorphes des combinaisons récessives défavorables à l'état homozygote, ce qui ne semble pas être le cas des Pénéides.

---

LAUBIER, A., PASTEUR, N. & MORIYASU, M., 1984 - Polymorphisme enzymatique d'une population de *Penaeus japonicus* maintenue en élevage depuis quatre générations. *Oceanologica Acta* (soumis).

LESTER, L.J., 1979 - Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *J. of Hered.*, 70 : 175-180.

MALECHA, S.R., 1980 - Characterization of genetic stocks of *M. rosenbergii* and their hybrids for domestication. *U. of Hawaii Sea Grant Quarterly*, 2 (4) : 1-5.

MULLEY, F.C. & LATTER, B.D.H., 1980 - Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid shrimps. *Evolution*, 34 (5) : 904-916.

NELSON, K. & HEDGECOCK, D., 1980 - Enzyme polymorphism and adaptative strategy in the Decapod Crustacea. *Amer. Natur.*, 116 (2) : 238-280.

SBORDONI, V.S., ALLEGRUCI, G., CACCONE, A., CESARONII, D., COBOLLI, M., DE MATHAEIS E., 1982-International Symposium on genetics in aquaculture. Galway, Ireland. March 29th-April 2nd, 1982.

DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE PALAEMON SERRATUS : RESULTATS  
PRELIMINAIRES.

Chantal BELLON-HUMBERT.

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, 29279 BREST.

RESUME

La formation des appendices, du tube digestif, du système nerveux, des structures sensorielles et hormonales commence chez l'embryon de cette crevette au stade C, selon la terminologie de Richard (1974) et s'achève au stade H. Le tube digestif se différencie avec un gradient caudo-céphalique. La glande digestive se forme, au moins partiellement à partir d'une assise de vitellophages. Le S.N. se forme avec un gradient céphalocaudal. Les régions du pédoncule oculaire s'individualisent très tôt. L'organe de Bellonci et le pore sensoriel apparaissent indépendamment au stade F. Les premières cellules neurosécrétrices sont décelées dans le cerveau au stade G.

ABSTRACT

The formation of the limbs, the digestive tract, the nervous system, the sensory and hormonal structures begins in this prawn during the embryonic stage C, according to Richard's definition (1974) and is performed at the stage H. The digestive tract differentiates with a caudo-cephalic gradient. The digestive gland is formed at least partially by vitellophags. The C.N.S. appears with a cephalo-caudal gradient and the regions of the eyestalk are quickly differentiated. The organ of Bellonci and the sensory pore appear independently during the stage F. The first neurosecretory cells are detected in the brain during the stage D.

MOIS-CLES : Crevette - Développement embryonnaire - Organe de Bellonci

KEY-WORDS: Prawn - Embryonic development - Organ of Bellonci.

---

Depuis ISHIKAWA (1885), peu d'auteurs ont examiné les phases du développement embryonnaire des Caridés, bien que la connaissance du métabolisme embryonnaire ait progressé et nécessite une base morphologique d'appui. L'analyse du développement embryonnaire de cette espèce

par SOLLAUD (1923) et pour une espèce voisine par WEYGOLDT (1961) indique bien la complexité des phénomènes qui se déroulent dans l'oeuf. Elle requiert aussi un complément d'information sur le développement des formations endocrines et sensorielles.

#### METHODES

Les oeufs sont prélevés sur des femelles grainées pêchées en Baie de Concarneau durant l'hiver (entre 10 et 13°). Ils sont fixés au Bouin, au Halmi avant d'être inclus dans la gélose, puis dans le paraplâst. Les colorations à l'azan ou au trichrome de Gabe ont donné de très bons résultats.

La terminologie des stades utilisée est celle de RICHARD (1974), basée sur l'observation macroscopique des oeufs, mais qui ne peut rendre compte des événements relatifs à la segmentation et à la gastrulation, invisibles à l'observation directe.

#### RESULTATS

La segmentation chez Palaemon serratus est partielle, inégale et superficielle, les blastomères enveloppant la masse centrale de vitellus. L'embryon se constitue à partir d'un disque germinatif au pôle animal de l'oeuf et à la surface du vitellus qui devient dorsal, et dans l'aire blastoporique.

Dès la formation du blastopore, il se produit une première invagination de cellules endovitellines et un remaniement cellulaire à la surface de l'oeuf qui conduit à la formation d'une ébauche embryonnaire sous forme de deux bandelettes divergentes à partir du blastopore. La fermeture du blastopore est due à une prolifération cellulaire à laquelle se trouvent liées la formation des lames mésodermiques, la migration de cellules vitellophages et la formation de pyramides vitellines. On distingue donc très vite le feuillet ectodermique superficiel, origine de l'épiderme et du neurectoderme, les masses mésodermiques antérieures et postérieures qui fourniront la musculature, le coeur et l'intestin postérieur et les cellules endovitellines qui participeront à la formation de la glande digestive. Ces événements qui constituent une étape A ne sont pas perceptibles à l'observation directe des oeufs.



Stade B : A ce stade, le disque germinatif est visible à la surface de l'oeuf.

On voit apparaître dans la région du blastopore une fente caudale autour de laquelle se disposent en arc de cercle des cellules particulières, ectodermiques, puis mésodermiques, les téloblastes. Leur division engendre l'élongation de la région postérieure sous forme d'une papille caudale qui représente l'abdomen replié de l'embryon. On voit s'ouvrir dans cette papille la fossette anale. La partie antérieure de l'embryon s'épaissit et dans la zone médiane apparaît l'ouverture de la bouche.

Stade C : A ce stade, les deux bandelettes divergentes se sont rapprochées de la ligne médiane et leurs extrémités renflées deviennent coalescentes à leur base. Ce sont les lobes optiques sous lesquels se forment les ébauches des antennules A 1, des mandibules, puis des antennes A 2 entre les deux. La papille caudale se soulève et s'allonge.

La différenciation du tube digestif commence par la formation de l'intestin postérieur, tandis que le système nerveux se différencie sous la forme d'un plexus nerveux dans la tête et la région thoracique de l'embryon.

Stade D : Dans la papille caudale, très fortement allongée, les masses musculaires s'organisent en cinq somites et le telson bilobé se termine par 8 épines, indiquant ainsi une cuticulogénèse très précoce.

Dans la partie antérieure, aux appendices précédents s'ajoutent les 1ères et 2èmes maxilles et les 3 paires de pmx sous forme de bourgeons. Les dents de la mandibule sont apparentes.

La S.N. comprend maintenant des masses ganglionnaires représentant le cerveau et la chaîne thoracique.

Le coeur est formé sur le bord postérieur du vitellus. L'aorte antérieure et l'aorte postérieure sont bien visibles.

La masse vitelline a diminué de moitié et les vitellophages se disposent en une assise simple sur la bordure postérieure du vitellus. Ce début d'épithélialisation est à l'origine de la formation de la glande digestive.

Les différentes parties de l'oeil commencent à être discernables il y a formation de la membrane basale des ommatidies séparant la masse des cellules, qui constitueront les différentes unités des ommatidies, des cellules nerveuses qui formeront les neuropiles optiques. La première indication du pigment rétinien distal apparaît dans la zone ventrale de l'oeil, en bordure du vitellus. En même temps les deux medullae distales : lamina ganglionaris

et medulla externa s'individualisent directement à partir des éléments du lobe optique.

Stade E : A l'observation, ce stade se manifeste par l'apparition des taches oculaires, des chromatophores du corps, la présence de tous les appendices de la zone, les battements du coeur et les mouvements de brassage du vitellus.

Sur les coupes histologiques, on constate une évolution très rapide du S.N.: le cerveau a ses 3 régions distinctes, le protocérébron avec l'oeil nauplien, le deutocérébron et le tritocérébron relié par le collier perioesophagien à la chaîne thoracique qui compte 8 ganglions doubles et qui se continue par une chaîne abdominale de 6 ganglions. Les nerfs segmentaires se différencient à ce stade.

Dans le T.D., l'oesophage et l'estomac sont incomplètement formés (pas de revêtement cuticulaire) tandis que se poursuit l'épithélialisation des vitellophages qui atteint le bord antérieur du vitellus.

Dans l'oeil, on discerne une zone de prolifération cellulaire sous les ommatidies dont on distingue maintenant les cellules cornéagennes et les cellules rétinienne pigmentaires, disposées en croissant, les autres éléments visuels étant encore indifférenciés. Un 3ème ganglion optique, issu du protocérébron représente la médulla interna et la médulla terminalis du lobe optique. En outre, de nombreuses cellules à noyau vésiculeux sont dispersées à ce stade dans les lobes optiques et dans le cerveau. Enfin il se constitue, à ce stade seulement, dans la bordure dorsale du vitellus, un amas cellulaire appelé par les auteurs, organe dorsal, dont le rôle n'est pas connu et qui se désagrège très rapidement dans le vitellus, car on ne le retrouve pas au stade suivant.

Stade F : La réduction du vitellus, divisé en 4 lobes par la musculature de la mandibule qui s'attache au dos de l'embryon est le caractère visible de ce stade.

Les cellules endovitellines se disposent contre ces parois formant les 4 lobes de l'hépatopancréas ; le revêtement cuticulaire de l'estomac se forme mais la jonction des divers éléments du T.D. ne s'est pas encore opérée.

Dans le futur pédoncule oculaire, la medulla interna s'est séparée de la medulla terminalis, les ommatidies sont formées. Chacune comprend une lentille entourée de quatre cellules cornéennes, un cône cristallin sécrété par des cellules cristallines, les cellules rétiniennes pigmentaires et les cellules rétiniennes responsables du rhabdome. Les fibres optiques convergent dans la lamina ganglionaris.

L'organe de Bellonci apparaît sur le bord dorsal du P.O., au niveau proximal de la medulla terminalis : il est constitué de une à quatre grosses cellules et de un à quatre corps en oignon. Le pore sensoriel se forme indépendamment au niveau de la lamina ganglionaris, sur le bord externe aussi. A son voisinage se trouve une petite vésicule.

Dans le cerveau comme dans le P.O. les cellules vésiculeuses sont très nombreuses. Dans le protocérébron, deux cellules d'aspect neurosécréteur sont présentes.

Stade G : l'embryon ressemble tout à fait par sa morphologie à la larve zoe qui va éclore. Tous ses appendices y compris les bourgeons des deux premières pattes thoraciques, le rostre inerme sont présents et achevés dans leurs détails cuticulaires.

Le T.D. prend une allure fonctionnelle avec la jonction des lobes hépatiques, de l'estomac et de l'intestin.

L'ébauche de la gonade est visible à la base de la papille caudale sous le plancher du péricarde.

Des glandes médio-thoraciques sont présentes sur le plancher ventral au niveau des mandibules et des maxilles. Elles diffèrent des organes endocrines connus (organe Y, apparu au stade C. Le Roux, Colloque/ Aquac. Montpellier 1983 ; organe mandibulaire, apparition tardive au cours de la vie larvaire, Le Roux, communication personnelle). Ces glandes qui ont une structure en rosette ont été décrites une seule fois par Hubschman (1971) et ont une vie éphémère puisqu'elles disparaissent au moment de la métamorphose larvaire, comme nous avons pu le constater sur cette espèce.

Enfin dans l'oeil, l'organe de Bellonci a acquis des cellules et des corps en oignon supplémentaires et des vésicules apparaissent sur les bords de la zone de prolifération cellulaire notamment.

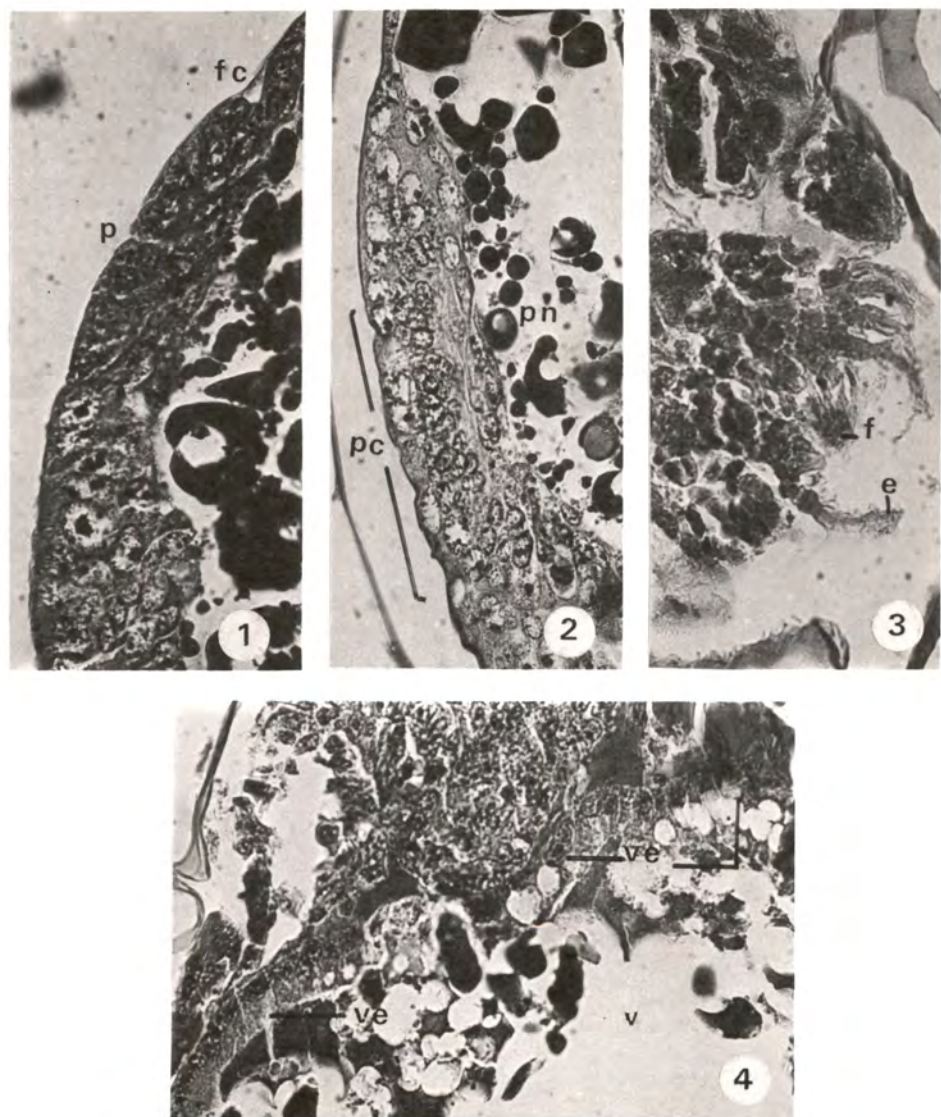


Stade H : précède l'éclosion. Il reste très peu de vitellus intra-embryonnaire. Les yeux sont sessiles et rabattus sur le côté.

Il est à noter que la larve sur le point d'éclore a subi au moins une mue dans l'oeuf. A la naissance, son équipement en appendices est encore incomplet : les pattes thoraciques 3,4 et 5, les pléopodes apparaîtront au cours de la vie larvaire. A la fin de celle-ci, les exopodites des 3 paires de pmx disparaîtront lors de la mue de métamorphose ainsi que les organes de Hubschman. Il faut noter aussi que, dans l'oeil, aucun des chiasmas optiques n'est encore réalisé que seul le pigment rétinien distal est présent (les deux autres pigments rétinien apparaissant très tard), que le pore sensoriel larvaire est seul présent (le pore principal n'existe qu'à partir de la métamorphose), que ce pore et l'organe de Bellonci ont une position dorsale qui ne sera modifiée que par la rotation des medullæ pendant la vie larvaire. (BELLON et al ,1978) et qu'enfin, il n'y a de cellules neuro-sécrétrices que dans le cerveau et le ganglion sous-oesophagien.

L'un des traits essentiels de cette évolution embryologique est la différenciation céphalo-caudale du S.N. et la différenciation inverse caudo-céphalique du T.D.

- 
1. BELLON-HUMBERT C., H.H. THIJSSSEN et F. VAN HERP, 1978 : Development, location and relocation of sensory and neurosecretory sites in the eyestalk during the larval and postlarval life of Palaemon serratus. J. mar. Biol. Ass. U.K., 58, 851-868.
  2. HUBSCHMAN J., 1971 : Transient larval glands in Palaemonetes. 4th Europ. Mar. Biol. Symp.295-300.
  3. ISHIKAWA C., 1885 : On the development of a fresh water Crustacean, Atyaephyra compressa. Quart. J.Microsc. 25.
  4. RICHARD P., 1974 : Contribution à l'étude du développement larvaire et de l'organogénèse chez Palaemon serratus, et du métabolisme des acides aminés libres chez cette espèce et Penaeus kerathurus. Thèse 3ème cycle, Aix-Marseille
  5. SOLLAUD E., 1923 : L'embryogénie des Crustacés Décapodes de la sous-famille des Palaemoninae. Bull. Biol. Fr et Belg. , suppl. 5.
  6. WEYGOLDTP., 1961 : Beitrag zur Kenntnis der Ontogenie der Dekapoden : Embryologische Untersuchungen an Palaemonetes varians. Zool. Jb. Anat. Bd. 79, 223-270.



- Fig.1 - Formation de la papille caudale au stade B  
(fc : fente caudale - p : proctodeum) (x 400)
- Fig.2 - Formation du plexus nerveux au stade C  
(pc : papille caudale - pn : plexus nerveux) (x 400)
- Fig.3 - Cuticulogénèse du telson au stade D  
(e : épines - f : furca) (x 400)
- Fig.4 - Epithélialisation des vitellophages en bordure du vitellus : début de formation de la glande digestive au stade D  
(v : vitellus -ve : vitellophages épithélialisés) (x 400)

- Fig.5 - Formation du système nerveux ganglionnaire et des somites abdominaux au stade D  
 (a1 : antennes 1 - b : bouche - ba : bourgeon d'appendice thoracique - gnt : ganglion thoracique - gna : ganglion abdominal - sa : somite abdominal - t : telson - v : vitellus) (x 200)
- Fig.6 - S.N. et coeur au stade E  
 (apt : appendice thoracique - b : bouche - c : cerveau - coe : coeur - e : estomac - gd : glande digestive - gnt : ganglion thoracique - v : vitellus) (x 200)
- Fig.7 - Embryon au stade F  
 (a 1,2 : antennes 1,2 - ab : abdomen - b : bouche - c : cerveau - coe : coeur - m : mandibule - mx 1,2 : maxilles 1,2 - pe 1 : bourgeon patte 1 - pmx 1,2,3 : maxillipèdes 1,2,3 - po : pédoncule oculaire - sn : système nerveux thoracique - t : telson - v : vitellus) (x 100)





Fig.8 - Apparition des premières cellules pigmentaires des omatidies dans le lobe optique au stade D

(cc : cellules cornéennes - cp : cellules pigmentaires - mb : membrane basale - n : neuroblastes ) (x 400)

Fig.9 - Formation de la zone de prolifération (zp) dans l'oeil au stade E

Fig.10- Les ganglions du lobe optique au stade E (x 400)

(lg : lamina ganglionaris - me : medulla externa - mi : medulla interna - mt : medulla terminalis.- oe : oeil en formation )

Fig.11- Structure de l'oeil au stade F

(cc : cellules cornéennes - ccr : cellules du cône cristallin - cp : cellules pigmentaires - cr : cellules du rhabdome - fo : fibres optiques - r : rhabdome ) (x 400)

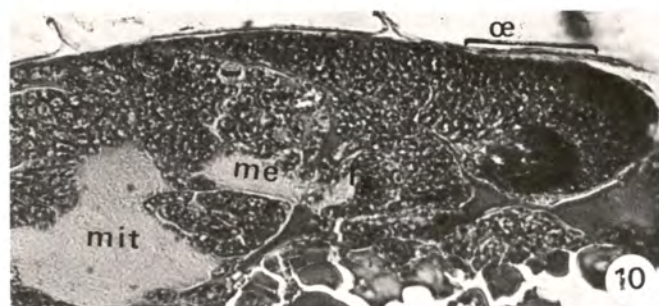
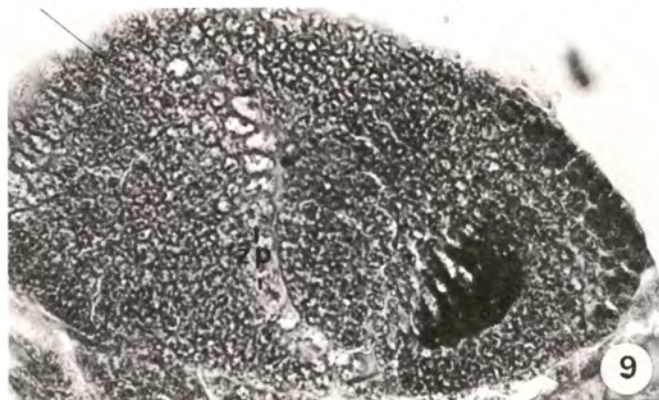
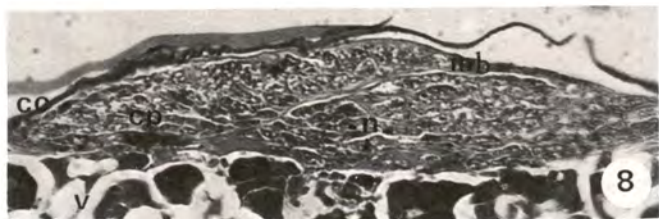




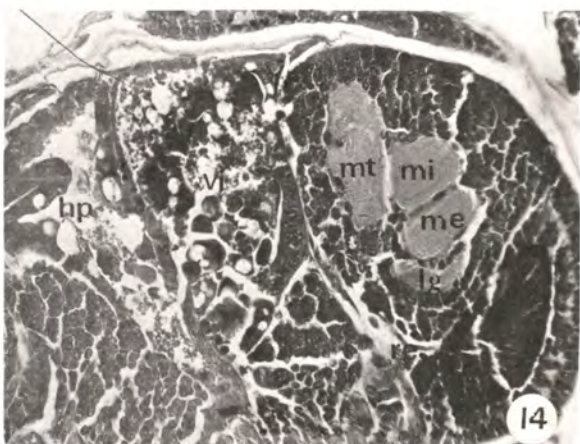
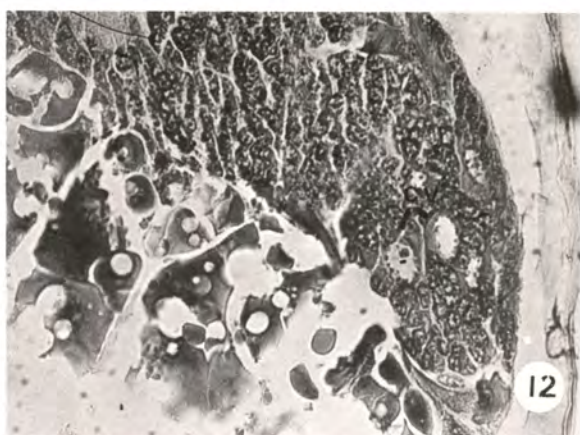
Fig. I2- Cellules vésiculeuses (cv) du lobe optique au stade F (x 400)

Fig. I3- Apparition de l'organe de Bellonci au stade F

(co : corps en oignon - cs : cellules sensorielles - mit :  
medulla interna et terminalis - OB : organe de Bellonci- pr :  
proto-cerebron ) (x 400)

Fig. I4 - Formation des lobes de l'hepatopancréas et structure du doncule  
oculaire au stade G

( hp : hepatopancreas - lg : lamina ganglionaris - me : ~~medulla~~  
externa - mi : medulla interna - mt : medulla terminalis - re :  
rétine - vi : vitellus intra-embryonnaire ) (x 200)



MORPHOGENESE SEXUELLE ET REGULATION HORMONALE DE L'ACTIVITE GENITALE  
CHEZ LA CREVETTE *PENAEUS JAPONICUS* EN ELEVAGE

LAUBIER A. (1) (2), CHIM L. (2) et PAYEN G.G. (3)

**R E S U M E** - L'étude de la physiologie sexuelle des crevettes Penaeidae, réalisée essentiellement sur l'espèce *Penaeus japonicus*, est abordée sous l'angle descriptif et expérimental à partir des élevages contrôlés réalisés au Centre Océanologique de Bretagne (CNEEXO-COB) à Brest.

Dans la première partie du travail, une étude de la morphogénèse sexuelle a été réalisée. Cette étude préliminaire a permis d'obtenir des critères simples de détermination de l'état du développement génital des crevettes au cours de leur croissance.

Dans une deuxième partie, l'étude du contrôle neuroendocrine du développement de l'appareil génital a été abordée par des ablations de pédonculaires oculaires et par des injections d'extraits pédonculaires de mâles sur des crevettes épédonculées de même sexe. Enfin, dans une troisième partie, nous avons recherché un critère biochimique permettant d'éprouver l'action d'extraits pédonculaires sur la croissance de l'appareil génital. L'évolution de l'activité spécifique de l'aspartate transcarbamylase (ATCs) a été suivie et discutée.

**A B S T R A C T** - A study of the sexual physiology of penaeid prawns essentially based upon *Penaeus japonicus*, is performed in both descriptive and experimental ways, using the controlled rearings conducted at the Centre Océanologique de Bretagne (CNEEXO-COB), Brest.

In a first part, the sexual morphogenesis is described. As a result, this preliminary study enables to define simple criteria for determination of the stage of genital development of the prawns during their growth.

In a second part, the neuroendocrine control of the genital system development is studied, using eyestalks ablations and male eyestalks extracts injections in prawns belonging to the same sex. In a third and final part, we have tried to find a biochemical criterion as a test of the effect of eyestalks extract injections on the genital system development. The evolution of the specific activity of aspartate transcarbamylase (ATC) has been followed and results are discussed.

*Penaeus japonicus*, élevage contrôlé, physiologie sexuelle, morphogénèse sexuelle, contrôle neuroendocrine de la reproduction.

*Penaeus japonicus*, controlled rearing, sexual physiology, sexual morphogenesis, neuroendocrine control of reproduction.

- (1) Institut Océanographique, 195 rue Saint-Jacques, 75005 PARIS
- (2) IFREMER, Centre de Brest, B.P. 337, 29273 BREST CEDEX
- (3) U.P.M.C., Laboratoire "Sexualité et Reproduction des Invertébrés" - CNRS, ERA 070409, 4 place Jussieu - Bâtiment A, 75230 PARIS CEDEX 05.



Les Penaeïdes occupent une place privilégiée en tant que ressources de pêche ou d'aquaculture exploitable. Au plan économique, les pêches mondiales de Décapodes Natantia qui atteignent plus de 1 650 000 tonnes pour l'année 1980 (source FAO), comprennent pour un dixième à peine des crevettes Caridae (Pandalidés, Crangonidés, Palaemonidés) : le groupe des Penaeïdes représente à lui seul plus de 1 500 000 tonnes, chiffre en progression rapide depuis une vingtaine d'années (moins de 1 million de tonnes en 1968, 1,3 millions de tonnes en 1975). Ceci contribue à expliquer l'importance des travaux consacrés à ce groupe dont l'intérêt réside également dans une croissance très rapide. Sur les 300 espèces identifiées dans le monde, espèces littorales et espèces profondes, WICKINS et BEARD citent en 1978 le chiffre de 42 pays travaillant sur une cinquantaine d'espèces de Penaeïdes littorales, compte non tenu des espèces traditionnellement élevées dans les pays du Sud-Est Asiatique (Indonésie, Philippines, Malaisie, etc...). Ces auteurs totalisent à 80 les espèces de Penaeïdes exploitées par la pêche ou par l'aquaculture traditionnelle ou moderne à l'échelle mondiale (exactement 81 espèces appartenant à 13 genres différents, par rapport à un total actuel de 313 espèces).

Depuis 1960, et à la suite des travaux de Fujinaga (1942) de nombreuses fermes à crevettes Penaeïdes se sont implantées au Japon, la production de juvéniles étant obtenue à partir de femelles sauvages gravides capturées en mer et mises à pondre dans des écloséries (SHIGUENO, 1975). La disponibilité de géniteurs, problème primordial pour une éclosérie, est apparue d'autant plus sérieuse en France que l'espèce n'est pas indigène ; par contre, les premiers essais de grossissement réalisés à partir de 1973 ont démontré l'intérêt de *Penaeus japonicus* tant en métropole qu'en région tempérée chaude.

La reproduction en milieu contrôlé de *Penaeus japonicus* a été obtenue de manière fiable au Centre Océanologique de Bretagne (C.O.B.) en 1975 (LAUBIER-BONICHON, 1975, 1978) et a été renouvelée depuis sur six générations successives. Les difficultés liées à l'acclimatation de l'espèce aux conditions d'élevage sont désormais pour une grande part surmontées, mais de nombreux problèmes demeurent. Les uns font intervenir des études de génétique, base de l'approche de sélection en vue d'amélioration de l'espèce ; ce sujet est abordé par ailleurs (LAUBIER, PASTEUR et MORIYASU, sous presse), d'autres, nombreux, sont encore liés à l'obtention et au déclenchement des pontes.

Le rôle primordial des facteurs externes sur le déroulement des différentes étapes de la vitellogenèse a été démontré de façon incontestable dans nos élevages (LAUBIER-BONICHON, 1978), mais il s'agit là de l'approche première concernant le problème du comportement d'une espèce soumise à toute une série d'influences exteroceptives que l'on a donc pu identifier et quantifier (température, photopériode, nourriture, protection vis-à-vis des agressions : stress) et qui appartiennent au "reflexe neuroendocrinien". Les maillons intermédiaires représentés par les phénomènes d'intégration nerveuse et neuroendocrine, les mécanismes endocrines qui contrôlent la reproduction chez les Penaeïdes sont encore mal connus. Un certain nombre d'investigations existent toutefois chez quelques espèces de Crustacés Décapodes, Brachyours, Macroures ou Natantia Caridae (CHARNIAUX-COTTON, 1980 ; PAYEN, 1980). Mais, de plus, le caractère primitif des Penaeïdes rend intéressante la comparaison de ce groupe avec les autres Malacostracés. On peut songer à un modèle concernant la reproduction chez les crustacés.

Avant d'envisager l'approche endocrine de la reproduction des Penaeides, il nous est apparu indispensable de retracer, chez *Penaeus japonicus*, la séquence des étapes du développement des caractères sexuels externes d'une part, internes d'autre part, afin de définir ainsi les périodes d'action des facteurs endogènes conditionnant la différenciation de ces caractères et l'initiation de l'activité génitale. Une attention toute particulière a été portée à la zone germination, région bien individualisée des gonades et dans laquelle sont localisées les gonies de réserve. Une première approche avait déjà été réalisée par BIZOT-ESPIARD (1980) chez les mâles de *P. japonicus*.

Dans le cadre des recherches concernant le contrôle neuroendocrine du développement des caractères sexuels et de l'activité génitale, nous avons abordé une étude ultrastructurale et cytochimique de la glande androgène.

Enfin, dans la perspective de caractérisation du facteur neurohormonal pédonculaire régulant le développement de l'appareil génital, nous avons procédé à la mise au point d'un test biochimique de croissance.

#### MORPHOLOGIE SEXUELLE EXTERNE

Chez les Crustacés, on sait que la fonction de reproduction se met en place assez tard au cours du développement. Ayant affaire à des animaux sauvages, qui plus est des Invertébrés marins, on se heurte au problème de l'âge, âge biologique et âge physiologique étant indéterminables. Il est par conséquent difficile de préciser un âge correspondant à la puberté.

Nous avons été amenés dans un premier temps à consacrer une place importante à la définition des séquences du développement des caractères sexuels. En effet, les données relatives à la reproduction, et plus particulièrement au développement génital, nombreuses, sont également succinctes. Il était donc indispensable de définir de façon rigoureuse des critères précis et simples de détermination de l'état du développement génital au cours de la croissance de *Penaeus japonicus*. Ce travail préliminaire indispensable a été rendu possible puisqu'il a été réalisé sur des fratries de plusieurs milliers d'individus d'âge connu, élevés dans des conditions définies reproductibles d'un élevage à l'autre (LAUBIER-BONICHON, 1978). L'étude a porté d'une part sur la différenciation des caractères sexuels externes pour les deux sexes, d'autre part sur la différenciation de l'appareil génital, plus particulièrement chez le mâle, une étude de l'appareil génital des femelles et de son développement étant réalisée par ailleurs.

Chez les Crevettes Penaeides, les sexes sont séparés. Un dimorphisme sexuel net de certains caractères externes et de l'appareil génital existe (HELDT, 1938 ; PEREZ-FARFANTE, 1975 ; TIERNIEZI et JAVED, 1976 ; HABIB-UL-HOUSAN, 1981). La puberté, phase où sont acquis les caractères de fécondité et de reproduction de l'espèce, n'a jamais été décrite avec précision chez *P. japonicus*. Nous avons d'ailleurs pu constater que la puberté externe et la puberté génitale ne sont pas synchrones dans le même sexe.

La puberté externe correspond à l'acquisition de la forme fonctionnelle de caractères sexuels secondaires, les variants sexuels. Les critères morphologiques externes retenus ici sont chez le mâle l'appendix masculina et le petasma, chez la femelle le thélycum (ou réceptacle séminal) et les endopodites de la première paire de pléopodes. L'étude de leur différenciation nous a permis de définir la taille à partir de laquelle débute le dimorphisme sexuel. La mesure de référence utilisée pour caractériser les animaux dans ce travail est la longueur céphalothoracique (LC), distance qui sépare l'échancrure orbitaire de la marge postérieure du céphalothorax.



Chez *Penaeus japonicus*, on n'observe pas de différenciation sexuelle durant la première phase de vie qui recouvre l'ensemble des phases larvaires, nauplius, zoé, mysis, et la première partie des stades postlarvaires. Le premier caractère permettant de distinguer les femelles et les mâles est l'apparition chez ces derniers d'une dépression sur la face interne du protopodite de la première paire de pléopodes, au point d'insertion avec l'endopodite. On l'observe chez des individus dont la longueur céphalothoracique (LC) atteint 0,4 cm. Chez les individus un peu plus âgés (LC = 0,6 cm), et uniquement pour le sexe mâle, les endopodites de la première paire de pléopodes s'élargissent, se transformant en une lame triangulaire. Par la suite, le développement sur le bord interne de cette lame de formations en crochets, les cincinnuli, permettront la formation du pétasma par l'engrenage des deux endopodites. En même temps, c'est-à-dire pour une longueur céphalothoracique de 0,6 cm, on note le développement de l'appendix masculina, excroissance située à la base interne de l'endopodite de la deuxième paire de pléopodes ; il se présente sous la forme d'un simple lobe creusé du côté interne et muni à son bord libre de soies raides qui se développeront au cours de la croissance. Cet appendice fonctionne comme organe copulateur chez les Natantia Caridae ; dans l'état actuel de nos connaissances, on ne sait s'il joue un rôle dans la copulation chez les Penaeidae.

Chez les femelles, l'ébauche du thélycum se forme sur la face ventrale du 8ème sternite à partir d'une longueur céphalothoracique de 0,8 cm (CHIM, 1983). Jusqu'à cette taille, aucun caractère sexuel n'apparaît chez celles-ci et c'est donc ce manque de caractère sexuel chez les individus entre 0,4 et 0,8 cm de LC qui caractérise alors le sexe femelle. En outre, chez les femelles, les endopodites de la première paire de pléopodes restent atrophiés et subsistent sous forme d'une tigarette située à la face interne du protopodite.

Les ouvertures génitales de chaque sexe sont reconnaissables à partir d'une LC de 0,8 cm chez les mâles à la base des coxopodites des 5èmes péréiopodes chez les femelles au niveau des coxopodites de la 3ème paire de péréiopodes.

Des résultats complémentaires, obtenus par l'étude de la croissance relative (CHIM, 1983) du pétasma chez les mâles et de l'endopodite de la première paire de pléopodes chez les femelles, nous ont permis de distinguer trois étapes dans la croissance de *Penaeus japonicus* :

- l'étape juvénile pour les crevettes de LC comprise entre 0,25 cm et 0,8 cm ; elle correspond en partie à une phase indifférenciée sexuellement quant à la longueur de ces appendices, puisque leur sexualisation débute pour une LC de 0,6 cm chez le mâle.

- l'étape de prépuberté débute chez les animaux de LC moyenne de 0,8 cm et se termine à la "mue de puberté", lorsque la longueur céphalothoracique atteint 2 cm.

- l'étape de puberté se réalise à partir de la "mue de puberté" chez des animaux d'une LC moyenne de 2 cm.

L'ensemble des résultats obtenus est schématisé dans le tableau I. La phase juvénile se termine au moment de la différenciation des pores génitaux chez les mâles comme chez les femelles. La mue de puberté correspond à la réalisation de la forme définitive du thélycum chez les femelles, du pétasma chez les mâles. En ce qui concerne la croissance relative de l'appendix masculina, seules deux étapes sont mises en évidence, l'étape de prépuberté et l'étape de puberté.



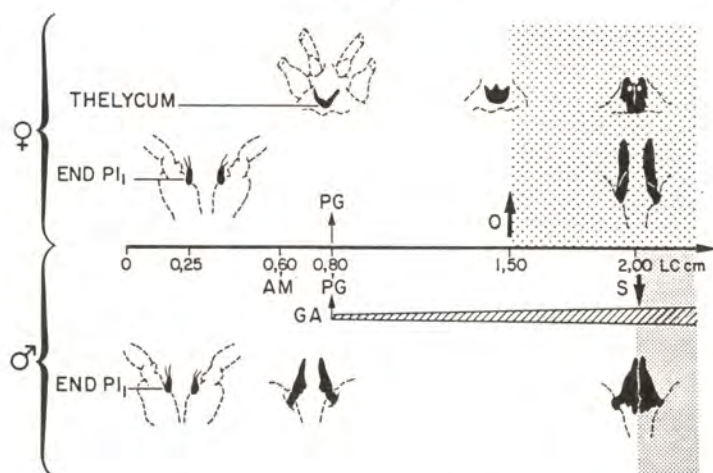


TABLEAU I - Récapitulation de quelques étapes de la morphogénèse sexuelle de *Penaeus japonicus*.

AM, appendix masculina ; END PL1, endopodite de la première paire de pléopodes ; GA, glande androgène ; LC, longueur céphalothoracique ; O, démarrage de l'ovogénèse ; PG, pores génitaux ; S, démarrage de la spermatogénèse.

#### MORPHOLOGIE SEXUELLE INTERNE

La connaissance de la puberté externe ne permet pas de conclure quant à la puberté génitale ; cette dernière ne peut être comprise que par une étude de la gonade au cours de son développement. Nous avons cherché à établir des corrélations entre le développement des caractères sexuels externes d'une part, des appareils reproducteurs de l'autre. Nous ne traiterons ici que le cas des mâles.

Comme chez d'autres Crustacés déjà étudiés (PAYEN, 1980), on note pour la gonade de *Penaeus japonicus* une période d'indifférenciation morphologique et structurale qui recouvre toute la vie larvaire et les premiers stades postlarvaires. Avant le 8ème stade postlarvaire, les gonades se présentent sous forme de deux amas de cellules germinales associées à des cellules somatiques. Nous n'avons pas vu de voies déférentes jusqu'à ce stade. C'est à partir des 10ème et 11ème stades postlarvaires (LC = 0,25 cm) que l'on peut observer les spermiductes chez les mâles ; on note déjà une légère dilatation dans leur région distale, prémice de la formation de l'ampoule terminale. L'ébauche de la glande androgène n'apparaît qu'à un stade un peu plus tardif, pour une longueur céphalothoracique de 0,8 cm. Le développement des glandes androgènes, qui se réalise donc après le début de la différenciation sexuelle, pose le problème de la différenciation du sexe chez les Penaeides.

A partir d'une taille correspondant à 0,8 cm de LC, quand les glandes androgènes s'individualisent, on observe des mitoses goniales dans les testicules. C'est à ce stade que les ouvertures génitales sont visibles. La méiose mâle ne s'engage que plus tard, lorsque la longueur céphalothoracique atteint 2 cm ; les spermiductes acquièrent à cette taille leur forme définitive et les premières sécrétions y sont détectées. En même temps a lieu l'engrenage des deux endopodites différenciés de la première paire de pléopodes pour former le pétasma. Faut-il attribuer l'ensemble des modifications qui conduisent à la maturité sexuelle mâle à l'activité de la glande androgène ? Un tel synchronisme a été signalé par l'un d'entre nous (PAYEN, 1974) chez des Décapodes Reptantia. Des données complémentaires sont nécessaires.

Une description précise des différentes régions de l'appareil génital mâle de *Penaeus japonicus* a été faite au C.O.B. par BIZOT-ESPIARD (1980). Au cours de ces recherches, un certain nombre de problèmes n'avaient pu être abordés, en particulier celui de la différenciation des testicules, et celui de la spermatogénèse, que nous traitons ici.

#### GAMETOGENESES

Chez les mâles de LC inférieure à 0,8 cm, les gonades sont organisées en tubules testiculaires ramifiés formant des groupes de réseaux, disposés symétriquement de part et d'autre d'un canal collecteur unique en "fer à cheval". Cette organisation en réseau n'a jamais été mise en évidence chez d'autres Malacostracés (CHIM, 1983). Chez les mâles pubères, les gonades sont formées de lobes, chaque lobe testiculaire étant constitué de tubules, unités fonctionnelles dans lesquelles se déroule la spermatogénèse. L'examen histologique des tubules testiculaires déroulés nous a permis de vérifier que la zone germinative est continue. Cette zone contient des gonies primaires mêlées à des cellules mésodermiques. Les gonies primaires, donc non engagées dans la gamétogénèse, effectuent des mitoses constituant la réserve de cellules germinales.

Un examen ultrastructural révèle l'existence de desmosomes entre les digitations des cellules mésodermiques ; la présence de jonctions entre les cellules mésodermiques de la zone germinative n'avait jamais été signalée chez les Crustacés. Enfin, contrairement aux Malacostracés étudiés, une distinction morphologique nette est faite chez *Penaeus japonicus* entre nuages et corps chromatoïdes, formations cytoplasmiques souvent confondues dans la littérature. Les corps chromatoïdes apparaissent dans les spermatoocytes primaires et coexistent avec les nuages, marqueurs caractéristiques des cellules germinales primordiales et des gonies. Les gonies secondaires sont situées en dehors de la zone germinative et ne sont pas emprisonnées dans le réseau de tissu somatique.

L'étude de la spermatogénèse nous a permis de montrer que chez *P. japonicus* la périodicité de sortie des gonies de la zone germinative donne au fonctionnement du testicule un caractère cyclique.

Cinq types d'association de cellules germinales représentatifs de cinq phases constituant le cycle spermatogénétique ont été définis au niveau des tubules testiculaires de *P. japonicus*. La durée relative de chaque phase a été évaluée statistiquement par l'observation histologique de 1 037 sections de tubules testiculaires :

- la phase I occupe 35 % de cycle total. Elle se caractérise par la présence des spermatogonies II issues de spermatogonies primaires (qui sortent de la zone germinative). Des spermatoïdes sont également présentes.



- la phase II a une durée relative de 13 %. Les spermatogonies II entrent de façon synchrone en prophase de méiose et se transforment en spermatocytes I que l'on observe en leptotène. Des spermatozoïdes sont visibles.

- la phase III constitue 10 % du cycle total. Elle compte des spermatocytes I en zygotène-pachytène qui occupent le tubule testiculaire, refoulant les spermatozoïdes dans le canal collecteur.

- la phase IV est la plus longue du cycle. Elle représente 40 % du cycle total. On reconnaît la zone germinative et des spermatocytes I zygotène-pachytène.

- la phase V ne dure que 2 % du cycle total. Des spermatocytes II coexistent avec des spermatogonies II et la zone germinative.

#### GLANDE ANDROGENE

En ce qui concerne la glande androgène, les premières recherches chez *Penaeus japonicus* ont été tentées par BIZOT-ESPIARD (1980). Par la suite, nous avons pu l'identifier nettement chez des animaux de longueur céphalothoracique de 0,8 cm grâce à la présence d'un ruban de tissu conjonctif. Situées dans la région subterminale des spermiductes, les glandes androgènes (G.A.) ont fait l'objet d'une étude ultrastructurale et cytochimique. Jusqu'alors, aucune description cytochimique de glande androgène n'avait été réalisée. Seuls les résultats préliminaires sont présentés (PAYEN et al., 1982) Planche I.

Comme chez les Amphipodes, les Isopodes et les Décapodes déjà étudiés, le rapport nucléocytoplasmique des cellules androgènes de *P. japonicus* est élevé et le cytoplasme renferme un réticulum endoplasmique granulaire très développé. Nous avons mis en évidence des particules  $\beta$  de glycogène par la réaction de Thiéry après action de la thiocarbohydrazide durant 20 minutes. Des corps denses aux électrons, digérés partiellement après traitement par la pronase et ayant une activité phosphatasique acide sont également caractéristique des GA des mâles fonctionnels ; ce sont des lysosomes. Des jonctions de type gap et des desmosomes primaires ou plaques d'attachement assurent les contacts intercellulaires. Des hémocytes participent à la résorption des zones de cytolysse. Les cellules en dégénérescence accumulent le glycogène ; elles sont souvent séparées par des faisceaux de fibrilles de collagène dont la visualisation a été facilitée par traitement à l'acide tannique.

A cet ensemble de caractères ultrastructuraux et cytochimiques, il convient d'ajouter que le fait d'avoir observé des portions de la musculature du spermiducte emprisonnées dans des massifs de cellules androgènes est fortement en faveur de l'origine génitale des organes androgènes. Il faut rappeler que le problème de la formation de ces organes n'est toujours pas résolu chez les Malacostracés.

#### CONTROLE NEUROENDOCRINE DU DEVELOPPEMENT DES CARACTERES SEXUELS ET DE L'ACTIVITE GENITALE

Chez les Décapodes, la fonction neuroendocrine des pédoncules oculaires est bien démontrée, le complexe neurosécréteur - organe X - glande du sinus exerçant un effet inhibiteur sur l'activité ovarienne d'une part, et sur le développement des glandes androgènes et de l'appareil génital mâle d'autre part (KLEINHOLZ et KELLER, 1979). Les effets de l'ablation d'un pédoncule oculaire sont utilisés de façon empirique chez les femelles de *Penaeus*



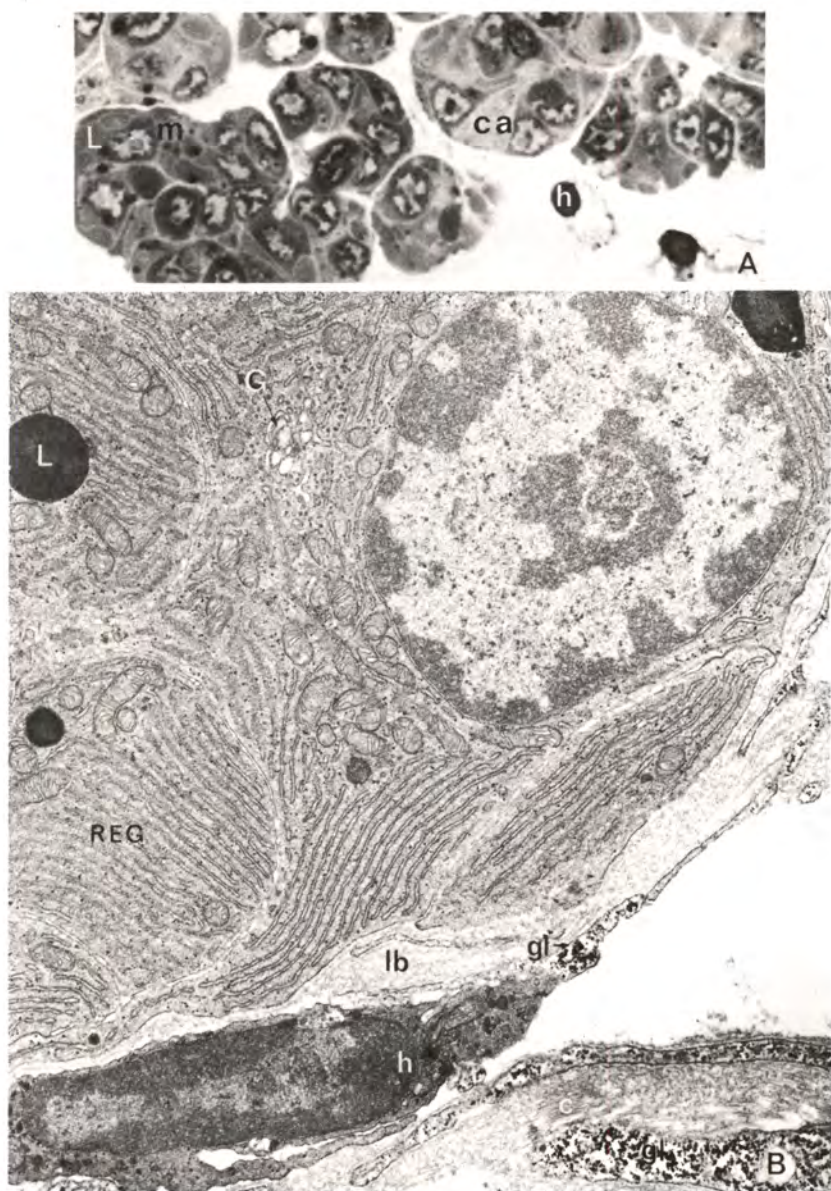


PLANCHE I - Glande androgène de *Penaeus japonicus* prélevée chez un mâle pubère fonctionnel.

- A. Coupe semi-fine montrant l'agencement des cellules androgènes en cordons repliés (ca) et en massifs (m) (x 3 200).
- B. Mise en évidence du glycogène (thiocarbohydrazide : 20 minutes).  
 Noter la répartition des particules  $\beta$  dispersées entre les citernes du réticulum endoplasmique dont la granulation est peu visible par suite du traitement cytochimique (x 19 200, sans contraste).
- c, collagène ; G, appareil de Golgi ; gl, glycogène ; h, hémocyte ; L, lysosome ; lb, lame basale.

en aquaculture afin d'accélérer les pontes. Mais une approche plus rationnelle de cette pratique était nécessaire. Dans ce travail, nous ne relaterons que les résultats obtenus chez les mâles ; il faut préciser que pour l'ensemble des Décapodes mâles, la preuve de l'existence d'une neurohormone pédonculaire responsable de l'inhibition de la croissance de l'appareil génital restait à fournir.

Notre approche a consisté à étudier l'effet de l'épédonculation et l'action d'extraits de pédoncules oculaires de mâles chez des animaux épédonculés. Les résultats sont publiés (CHIM et al., 1983) ; un bref résumé est donné ici.

Chez les crevettes mâles juvéniles et prépubères, l'épédonculation entraîne un développement accéléré des caractères sexuels internes et externes ; au niveau de l'appareil génital, on observe une initiation précoce de la spermatogénèse et du fonctionnement des spermiductes, les glandes androgènes ont une croissance accélérée, le diamètre de l'ampoule terminale (dAT) s'accroît de façon importante par rapport à celui des crevettes témoins de même LC, il est supérieur à 40 %.

Chez ces animaux, on note une morphogénèse plus rapide du pétasma et de l'appendix masculina qui acquièrent précocement leur forme définitive. Tout se passe comme si, durant les étapes juvénile et prépubère, les pédoncules oculaires exerçaient donc une répression sur le développement de l'appareil génital et des caractères sexuels secondaires, celle-ci, dans les conditions normales, étant levée à la puberté. La suppression de l'inhibition pédonculaire par ablation des pédoncules oculaires entraîne donc une puberté précoce chez les jeunes crevettes.

Chez les crevettes pubères, LC supérieure à 2 cm, les épédonculations provoquent en quelques jours une augmentation sensible de l'activité génitale et de la glande androgène. Le diamètre de l'ampoule terminale (dAT) est supérieur à celui des crevettes non opérées ; pour une même longueur céphalothoracique, ce diamètre augmente d'environ 40 %. Chez des animaux épédonculés depuis deux mois, la spermatogénèse est perturbée et apparaît bloquée à deux niveaux : au stade gonies primaires et au stade spermatocytes primaires. Il semble donc que les pédoncules oculaires ont un effet freinateur sur l'activité génitale des animaux pubères ; ils apparaissent nécessaires à la réalisation de la gamétogénèse mâle.

Nous avons étudié les effets d'injections d'extraits pédonculaires totaux de *Penaeus vannamei* mâles<sup>\*\*</sup> chez des mâles épédonculés de *Penaeus japonicus*.

#### - Test biologique

Les variations du plus grand diamètre de l'ampoule terminale (dAT) -région distale bien différenciée du spermiducte dans laquelle s'accumulent les spermatophores mûrs chez les mâles fonctionnels- en fonction de la LC des Crevettes, ont été retenues comme critère pour étudier l'action des différentes interventions expérimentales sur le développement de l'appareil génital. L'ampoule terminale, orientée de façon définie, est mesurée à l'aide d'un projecteur de coupes (type Nikon V 12).

<sup>\*\*</sup> Extraits préparés par le Professeur L.H. KLEINHOLZ (Portland, Oregon, U.S.A.) à partir de pédoncules oculaires de *Penaeus vannamei* fournis par le Dr. SHLESER de l'Institut Océanique d'Hawaï.



- Méthode statistique.

Les dAT moyens sont comparés par une analyse de covariance selon la méthode des Y ajustés qui permet de tenir compte de la variation de la LC. Le dAT moyen ajusté pour une même LC est ensuite calculé.

Les effets de l'injection d'extraits de PO sur la morphogénèse de l'appareil génital mâle ont été étudiés en fonction du test d'activité décrit ci-dessus. L'analyse de covariance montre qu'il existe une différence hautement significative entre les *P. japonicus* ayant subi l'ablation des PO puis injectées avec de l'eau de mer et les crevettes témoins non opérées ( $P < 0,005$ ). En ce qui concerne les *P. japonicus* épédonculées et traitées par un extrait non chauffé de *P. vannamei* mâles et celles traitées par l'eau de mer, aucune différence ne peut être relevée ( $P > 0,05$ ). En revanche, des différences significatives existent entre les traitements par l'extrait pédonculaire chauffé de *P. vannamei* mâles et l'eau de mer d'une part ( $P < 0,01$ ), entre les traitements par l'extrait chauffé et non chauffé d'autre part ( $P < 0,005$ ).

L'injection d'extraits pédonculaires de Crevettes Penaeides mâles chez des mâles épédonculés appartenant à la même famille nous a donc permis de démontrer l'action inhibitrice d'un facteur pédonculaire thermostable sur le développement accéléré de l'appareil génital mâle de *P. japonicus*. Ces résultats permettent de conclure également que le contrôle pédonculaire inhibiteur -ou plus exactement modérateur- du développement de l'appareil génital mâle est du type neurohormonal.

Chez les Décapodes mâles, l'existence d'un contrôle pédonculaire inhibiteur de la croissance de l'appareil génital est donc admise. Toutefois, jusqu'à présent, nous ne possédons aucun indice biologique suffisamment sensible qui donne une estimation de l'action d'extraits de pédoncules oculaires sur la croissance de l'appareil génital mâle. Le besoin d'un indice plus rapide que celui faisant intervenir une réponse morphogénétique, délicate à apprécier et s'étendant par ailleurs sur un temps assez long, 14 jours, avec un taux de mortalité relativement élevé lié aux opérations, est évident. Sans cet indice, il est difficile d'envisager de procéder à la purification du ou des facteurs pédonculaires inhibiteurs de la croissance de l'appareil génital mâle.

L'évolution de l'activité spécifique de l'aspartate transcarbamylase (ATCs), une enzyme impliquée dans la synthèse des bases pyrimidiques, constituants des acides nucléiques, est considérée comme un bon indice de croissance. En effet, l'aspartate transcarbamylase (ATC) intervient au début de la chaîne de réactions enzymatiques de biosynthèse des bases pyrimidiques. Des corrélations entre le taux d'activité de l'enzyme et la multiplication cellulaire ont été démontrées dans de nombreux tissus, végétaux (STEIN et COHEN, 1959) et animaux au niveau de tumeurs (CALVA et al., 1959), foetaux ou en régénération (NORDMANN et al., 1964 ; KIM et COHEN, 1965 ; HERZFELD et KNOX, 1972 ; WAYMURE et NISHIKAWARA, 1972). Enfin des corrélations entre l'activité de l'ATC de gonades du Mollusque *Pecten maximus* et le taux de croissance relative ont été mises en évidence (BERGERON et ALAYSE-DANET, 1981).

La mise en activité rapide et précoce de l'appareil génital après épédonculation supposant une importante demande en bases pyrimidiques pour la synthèse des nucléotides, nous nous sommes intéressés à étudier les variations



de l'activité de l'enzyme régulant la première réaction de la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques : l'Aspartate Transcarbamylase (ATC). Le niveau de son activité devrait donc être représentatif du taux de formation des bases pour la synthèse des acides nucléiques nécessaires aux multiplications cellulaires (synthèse d'ADN) et à la transcription (synthèse d'ARN). Le dosage de l'activité de cette enzyme a donc été effectué dans les appareils génitaux de mâles dans différentes conditions expérimentales (CHIM et al., 1983).

Chez les mâles, il existe une étroite relation temporelle entre l'évolution de l'activité spécifique de l'ATC (ATCs) et celle de l'appareil génital. La période pubertaire (initiation de la spermatogénèse et du fonctionnement des spermatozoaires) est caractérisée par une élévation rapide de l'activité spécifique jusqu'à une valeur maximale proche de 20 (nmoles/mm/mg de protéines). C'est durant cette période que débute la phase de croissance rapide de l'appareil génital, comme le prouve sa croissance pondérale.

L'épédonculation bilatérale pratiquée chez des mâles juvéniles et juste pubères n'entraîne pas, après 60 et 100 heures, de modification du niveau moyen des ATCs. Par contre, la même opération effectuée chez des Crevettes pubères (d'une LC moyenne de 3,1 cm), provoque une élévation significative de la valeur moyenne des ATCs, 30 heures après l'opération. Cette élévation de l'activité enzymatique doit être mise en relation avec les données qui montrent une croissance plus rapide de l'appareil génital mâle quelques jours après épédonculation.

L'ensemble des résultats met donc en évidence une relation entre le niveau d'activité de l'ATC et l'évolution fonctionnelle de l'appareil génital mâle. De plus, le niveau d'ATCs ainsi que la croissance de l'appareil génital apparaissent inhibés par les pédonculaires oculaires.

Des expériences d'injection de différentes fractions purifiées de PO chez des mâles montrent que l'une de ces fractions est capable d'inhiber significativement l'activité spécifique de l'Aspartate Transcarbamylase. Le facteur responsable de cette inhibition est thermostable et serait une petite molécule puisqu'elle est éluée dans la même zone que la DRPH (Distal Retinal Pigment Light-Adapting Hormone), hormone pédonculaire dont le poids moléculaire est estimé entre 2 000 et 3 000. L'Aspartate Transcarbamylase apparaît donc comme un bon indice biochimique pouvant être utilisé pour tester l'activité inhibitrice d'extraits purifiés de PO sur la croissance de l'appareil génital mâle.

---

BERGERON J.P. et ALAYSE-DANET A.M., 1981 - L'aspartate transcarbamylase de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* L. (Mollusque Lamellibranche) : méthode de dosage et variations de l'activité dans le manteau et la gonade. J. exp. mar. Biol. Ecol., 50, p. 99-117.

BIZOT-ESPIARD A., 1980 - Croissance et reproduction de la crevette *Penaeus japonicus* (Bate) en élevage. Effet de l'épédonculation, histologie de l'appareil génital mâle. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, 168 p.

CALVA E., LOWENSTEIN J.M. et COHEN P.P., 1959 - Carbamyl phosphate-aspartate transcarbamylase activity in tumors. Cancer Research, 19, p. 101-103.

CHARNIAUX-COTTON H., 1980 - Experimental studies of reproduction in Malacostraca crustaceans. Description of vitellogenesis and of its endocrine control. in Adv. Inv. Reprod., W.H. Clark et T.S. Adams, Ed., p. 177-185.

CHIM L., 1983 - La morphogénèse sexuelle, la gamétogénèse et leur contrôle neuro-hormonal chez la Crevette *Penaeus japonicus* Bate : utilisation de l'aspartate transcarbamylase comme indice de croissance de l'appareil génital. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 107 p.

- CHIM L., BERGERON J.P., PAYEN G.G. et LAUBIER-BONICHON A., 1983 - L'Aspartate Transcarbamylase : indice biochimique de croissance de l'appareil génital de la crevette *Penaeus japonicus*. VII<sup>e</sup> Réunion des Carcinologistes de Langue Française, Liège, 29 août - 2 septembre 1983.
- CHIM L., KLEINHOLZ L.H., PAYEN G.G. et LAUBIER-BONICHON A., 1983 - Effet inhibiteur d'un extrait de pédoncules oculaires de la crevette mâle *Penaeus vannamei* Boone sur le développement précoce de l'appareil génital du mâle épédonculé de *P. japonicus* Bate. C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III, 296, p. 185-190.
- FUJINAGA M., 1942 - Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. Jap. Journ. Zool., 10, p. 305-393.
- HABIB-UL-HASSAN, 1981 - The genital organs and their development in *Metapenaeus affinis* (Decapoda, Penaeidae), studied through rearing them in the laboratory. Hydrobiologia, 78 (1), p. 49-58.
- HELDT J.H., 1938 - La reproduction chez les Crustacés Décapodes de la famille des Penaeides. Ann. Inst. Oceanogr., 18, p. 31-206.
- HERZFELD A. et KNOX W.E., 1972 - Aspartate transcarbamylase concentrations in relation to growth rates of fetal, adult and neoplastic rat tissue. Cancer Research, 32, p. 1842-1847.
- KLEINHOLZ L.H. et KELLER R., 1979 - Endocrine regulation in Crustacea. Hormones and Evolution, vol. I, Barrington E. J. W. Ed., Academic Press, p. 160-243.
- LAUBIER-BONICHON A., 1975 - Induction de la maturation sexuelle et ponte chez la crevette *Penaeus japonicus* Bate en milieu contrôlé. C.R. Acad. Sc. Paris, sér. D, 281, p. 2013-2016.
- LAUBIER-BONICHON A., 1978 - Ecophysiologie de la reproduction chez la crevette *Penaeus japonicus*. Trois années d'expérience en milieu contrôlé. Oceanol. Acta, 1 (2), p. 135-150.
- LAUBIER-BONICHON A., PASTEUR N., MORIYASU M. - Polymorphisme enzymatique d'une population de *Penaeus japonicus* maintenue en élevage depuis quatre générations. Oceano. Acta, sous presse.
- NORDMANN Y., HURWITZ R. et KRETCHMER N., 1964 - Activity of aspartate transcarbamylase in heart and liver of the developing rat. Nature, 201, p. 616-617.
- PAYEN G.G., 1980 - Aspects fondamentaux de l'endocrinologie de la reproduction chez les Crustacés marins. Oceanis, 6 (3), p. 309-339.
- PAYEN G.G., CHIM L., LAUBIER-BONICHON A. et CHARNIAUX-COTTON H., 1982 - The androgenic gland of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate. Description, role and control by the eyestalks. Gen. Comp. Endocrinol., 46 (3), p. 384.
- PEREZ-FARFANTE I., 1975 - Spermatophores and thelyca of the American white Shrimps, genus *Penaeus*, Subgenus *Litopenaeus*. Fish. Bull., 73 (3), p. 463-486.
- SHIGUENO K., 1975 - Shrimp culture in Japan. Assoc. Intern. Techn. Promotion Ed., Tokyo, 153 p.
- TIRMIZI N.M. et JAVED W., 1976 - Study of juveniles of *Metapenaeus stebbingi nobili* (Decapoda, Penaeidae) with particular reference to the structure and development of the genitalia. Crustaceana, 30 (1), p. 55-67.
- STEIN L.I. et COHEN P.P., 1965 - Correlation of growth and aspartate transcarbamylase activity in the higher plants. Arch. Biochem. Biophys., 109, p. 429-433.
- WAYMIRE J.C. et M.T. NISHIKAWARA, 1972 - Increased aspartate carbamytransferase activity in compensatory renal growth. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 139 (4), p. 1398-1400.
- WICKINS J.F. et BEARD T.W., 1978 - Prawn culture research. Minist. Agric. Fish. Food., Dir. Fish. Res. Lab. Leaflet. Lowestoft, 42, p. 1-41.



LES CELLULES FOLLICULAIRES SECONDAIRES  
DE LA CREVETTE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (DECAPODE PALAEMONIDE) :  
MISE EN EVIDENCE D'UN RESEAU TUBULAIRE IMPLIQUÉ  
DANS LES ECHANGES ENTRE L'HEMOLYPHE ET L'OVOCYTE

J.J. MEUSY, P. JUGAN et C. ZERBIB  
Laboratoire de Sexualité et Reproduction des Invertébrés  
Université Paris VI, Bât. A, 4 place Jussieu,  
75230 PARIS Cedex 05.

R E S U M E

L'étude ultrastructurale de l'ovaire de la crevette *Macrobrachium rosenbergii* a permis de mettre en évidence dans les cellules de l'épithélium folliculaire secondaire un réseau tubulaire de 0,15 µm environ de diamètre. Ce réseau, très anastomosé et circonvolutionné est en communication avec l'espace extracellulaire. Il constitue une structure temporaire qui a pour effet d'augmenter considérablement la perméabilité de l'épithélium folliculaire.

A B S T R A C T

The epithelial cells of the ovary secondary follicles have been studied in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* using electron microscope and horse-radish peroxidase. A network of circonvolutioned and anastomosed tubules, measuring about 0,15 µm in diameter, communicates with the extracellular space. This tubular network is a temporary structure which extensively increases the permeability of the follicular epithelium.

M O T S - C L E S : *Macrobrachium rosenbergii*, vitellogénèse, épithélium folliculaire, réseau tubulaire, vitellogénine.

K E Y W O R D S : *Macrobrachium rosenbergii*, vitellogenesis, follicular epithelium, tubular network, vitellogenin.

---

La vitellogénèse secondaire est caractérisée par l'entrée de la vitellogénine dans les ovocytes (voir revue dans Meusy, 1980 ; Meusy et Charniaux-Cotton, 1983-84). Ceux-ci sont entourés individuellement par une assise de cellules folliculaires dites "secondaires", provenant d'un tissu permanent (Charniaux-Cotton, 1974, 1980).

Rappelons que la vitellogénine, précurseur sérique du vitellus protéique, est une lipo-glyco-caroténoprotéine de haut poids moléculaire, synthétisée par le tissu adipeux ; elle est véhiculée par l'hémolymphe et pénètre dans les ovocytes en vitellogénèse secondaire par endocytose (micropinocytose).



Chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii* dont l'ovaire a fait l'objet de travaux récents (Fauvel, 1981, 1983), une étude ultrastructurale de l'épithélium folliculaire secondaire fait apparaître des structures inhabituelles qui semblent constituer une voie de transit vers l'ovocyte.

#### MATERIEL ET METHODES

Les crevettes *M. rosenbergii* proviennent des élevages du Centre Océanologique du Pacifique (Tahiti, Polynésie française). Elles sont élevées au laboratoire à une température de 28°C. La photophase est de 12 h. L'alimentation est constituée de moules.

Les ovaires sont fragmentés et préfixés durant 1 h par une solution de glutaraldéhyde 2 % - paraformaldéhyde 3 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M à pH 7,4. Après rinçage de quelques minutes dans ce même tampon, les ovaires sont fixés durant 30 mn par une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon. Ils sont rincés, déshydratés par l'éthanol et inclus dans l'Epon. Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Elles sont observées au microscope électronique Philips EM 200 ou EM 300.

Des fragments d'ovaires en début de vitellogenèse secondaire sont incubés durant 5 mn dans une solution saline enrichie de 5 % de peroxydase (Sigma grade VI ; PM : 40 000 daltons). Les ovaires sont préfixés durant 3 h, rincés 24 h dans le tampon cacodylate de sodium. La peroxydase est révélée par le tétrachlorhydrate de diaminobenzidine (DAB Sigma) suivant la méthode de Graham et Karnovsky (1966). Ils sont ensuite fixés par le tétroxyde d'osmium comme précédemment. Des témoins sont effectués en omettant le DAB, l'eau oxygénée ou l'incubation dans la solution de peroxydase.

#### RESULTATS

Les cellules folliculaires secondaires forment un épithélium simple autour de l'ovocyte (fig. 1 et 2). Leur cytoplasme présente un réticulum endoplasmique bien développé, de nombreuses mitochondries à crêtes transversales, des dictyosomes et des microtubules peu abondants. Leur noyau est ovale (5 x 3 µm).

La structure qui retient surtout l'attention est constituée par un réseau de tubules anastomosés et circonvolutionnés, d'un diamètre de 0,15 µm environ, délimités par une membrane unique (fig. 3). Leur contenu, assez dense aux électrons, présente un aspect finement granulaire. Ce réseau communique avec tous les espaces extracellulaires : vers l'extérieur du follicule, entre les cellules folliculaires adjacentes (fig. 3, 4), vers l'ovocyte où il peut être pénétré par des microvillosités (fig. 5). Sa répartition dans la cellule n'est pas toujours homogène mais ne paraît pas privilégier systématiquement une région particulière, centrale ou périphérique, ni traduire une polarité. Aucune relation n'a pu être observée entre ce réseau et les organites cytoplasmiques, notamment le réticulum endoplasmique granulaire.

Il est important de préciser que le réseau tubulaire est absent des cellules de l'épithélium folliculaire lorsque celles-ci n'ont pas encore entouré les ovocytes prêts à entrer en vitellogenèse secondaire (fig. 6). Au début de la mise en place de l'enveloppe folliculaire secondaire (intervenant au début du stade C du cycle de mue), certaines cellules épithéliales possèdent un réseau tubulaire encore peu développé (fig. 7). Celui-ci apparaît alors essentiellement sous forme de dilatations qui affectent localement des systèmes membranaires en

communication avec l'espace extracellulaire. Ces dilatations sont souvent terminales mais peuvent aussi former des branchements perpendiculaires.

Après incubation pendant 5 mn de fragments d'ovaires en vitellogenèse secondaire dans un milieu contenant de la peroxydase, une réaction positive à la diaminobenzidine est observée au niveau de la lame basale, dans le réseau tubulaire, à la surface des microvillosités ovocytaires et dans certains globules vitellins périphériques (fig. 8, 9, 10).

## DISCUSSION

Les études cytologiques réalisées jusqu'à présent chez les Crustacés Malacostracés (Zerbib, 1977 ; Rateau et Zerbib, 1978 ; Shade et Shivers, 1980 ; Talbot, 1981), de même que chez les Insectes (Rubenstein, 1979), les Poissons (Selman et Wallace, 1982), les Amphibiens (Dumont, 1978) et les Reptiles (Neaves, 1972) n'ont pas révélé dans les cellules folliculaires de structure analogue au réseau tubulaire observé chez *Macrobrachium rosenbergii* et suggèrent que la vitellogénine transite par les espaces intercellulaires.

En revanche, une structure d'apparence analogue au réseau tubulaire des cellules folliculaires de *M. rosenbergii* a été décrite dans les cellules à chlorures des branchies de poissons (Laurent et Dunel, 1980 ; Pisam, 1981) où elle est impliquée dans les mécanismes d'osmorégulation.

Le réseau tubulaire est une structure temporaire concomitante de la vitellogenèse secondaire, c'est-à-dire de l'entrée de la vitellogénine dans les ovocytes. Les résultats des incubations d'ovaires en présence de peroxydase indiquent qu'il est perméable aux molécules d'assez grosse taille qui atteignent ainsi rapidement l'ovocyte. Après 5 mn d'incubation, les globules vitellins périphériques sont déjà marqués par la peroxydase alors que 30 mn sont nécessaires pour obtenir le même résultat chez *Orchestia gammarellus* (Zerbib, 1977). Il est probable que le réseau tubulaire participe, grâce à ses multiples anastomoses, au transfert de la vitellogénine du compartiment hémolympatique au compartiment ovocyttaire. Des expériences de marquage devraient permettre d'apporter prochainement des éléments complémentaires.

L'origine du réseau tubulaire ainsi que son devenir après la ponte ne sont pas clairement établis. Sa formation semble résulter de profonds remaniements qui affectent les systèmes membranaires de l'épithélium folliculaire.

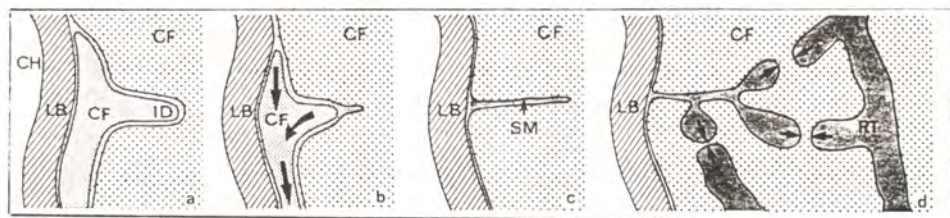


Figure 11. Représentation hypothétique de la formation du réseau tubulaire.  
 a. Cellules de l'épithélium folliculaire avant la formation du follicule secondaire. Les cellules présentent de nombreuses interdigitations.  
 b. Formation du follicule secondaire. Les cellules de l'épithélium folliculaire s'étalent sur l'ovocyte en croissance et les digitations se rétractent.  
 c. Formation du follicule secondaire (suite). Des systèmes membranaires en communication avec l'espace extracellulaire subsistent.  
 d. Formation du réseau tubulaire. Les systèmes membranaires se vésiculisent et s'anastomosent.  
 (Mêmes abréviations que pour les figures 1-10)



Il est probable que les interdigitations affectant les cellules de l'épithélium folliculaire se rétractent au moment où ces cellules s'étalent à la surface de l'ovocyte en croissance (fig. 11). Les systèmes membranaires subsistant après ce processus de rétraction se vésiculiseraient et, après anastomoses, formeraient le réseau tubulaire.

Cette structure semble revêtir un intérêt particulièrement important pour la connaissance du rôle de l'épithélium folliculaire dans les mécanismes de la vitellogenèse secondaire.

#### Addendum

MM. J.M. Arcier et M. Bréhelin nous ont informés, lors de la tenue du Colloque, qu'ils avaient mentionné dans une publication récente l'existence d'un réseau semblable dans l'épithélium folliculaire d'un autre Palaemonidé, *Palaemon adspersus* (Etude histologique et ultrastructurale du tissu folliculaire au cours des cycles de développement ovarien chez *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837). *Arch. Biol.*, 93, 79-97 (1982)). Cette structure est en effet identifiable sur la figure 6 de l'article précité. Il serait intéressant de savoir si la présence du réseau tubulaire est limitée aux seuls Décapodes Palaemonidés.

#### Remerciements

Nous remercions vivement le Centre Océanologique du Pacifique, particulièrement MM. D. Cognie et A. Michel, de nous approvisionner en matériel vivant. Nous sommes également reconnaissants au Bureau du Transport du Centre d'Expérimentation du Pacifique pour les facilités d'acheminement qu'il nous offre.

- 
- Charniaux-Cotton, H., 1974 - Données nouvelles concernant la vitellogenèse des Crustacés Malacostracés obtenues chez l'Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) : folliculogénèse à partir d'un tissu permanent ; action du busulfan ; action inhibitrice de l'hormone juvénile. *C.R. Acad. Sci.*, 279, sér. D, p. 563-566.
- Charniaux-Cotton, H., 1980 - Experimental studies of reproduction in Malacostraca Crustaceans. Description of vitellogenesis and its endocrine control. *Advances in Invertebrate Reproduction*, W.H. Clark Jr. and T.S. Adams, eds, Elsevier North Holland, p. 177-186.
- Dumont, J.N., 1978 - Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). VI. The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte. *J. Exp. Zool.*, 204, p. 193-218.
- Fauvel, C. 1981. - Etude de l'ovaire de la Crevette d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) au cours du cycle de reproduction. Première description de la folliculogénèse secondaire chez un Crustacé Décapode. *C.R. Acad. Sci.*, 292, sér. III, p. 547-552.
- Fauvel, C., 1983 - L'ovaire de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Crustacé Décapode) au moment de l'ovulation. *C.R. Acad. Sci.*, 296, sér. III, p. 1053-1058.



- Graham, R.C. et Karnovsky M.J., 1966 - The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, p. 291-302.
- Laurent P. et Dunel S., 1980 - Morphology of gill epithelia in fish. *Ann. J. Physiol.*, 238, R 147 - R 159.
- Meusy, J.J., 1980 - Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea : a review. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20, p. 1-21.
- Meusy, J.J. et Charniaux-Cotton, H., 1983-84 - Endocrine control of vitellogenesis in Malacostraca Crustaceans. *Advances in Invertebrate Reproduction*, Elsevier North Holland (sous-presse).
- Neaves, W.B., 1972 - The passage of extracellular tracers through the follicular epithelium of lizard ovaries. *J. Exp. Zool.*, 179, p. 339-364.
- Pisam, M., 1981 - Membranous systems in the "chloride cell" of teleostean fish gill ; their modifications in response to the salinity of the environment. *Anat. Rec.*, 200, p. 401-414.
- Rateau, J.G. et Zerbib, C., 1978 - Etude ultrastructurale des follicules ovocytaires chez les Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). *C.R. Acad. Sci.*, 286, sér. D, p. 65-68.
- Rubenstein, C., 1979 - The role of an epithelial occlusion zone in the termination of vitellogenesis in *Hyalophora cecropia* ovarian follicles. *Develop. Biol.*, 71, p. 115-127.
- Selman, K. and Wallace, R.A., 1982 - Oocyte growth in the sheepshead minnow : uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. *Tissue and Cell*, 14, 555-571.
- Shade, M.L. and Shivers, R.S., 1980 - Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocytes during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope - protein tracer study. *J. Morphol.*, 163, 13-26.
- Talbot, P., 1981 - The ovary of the lobster, *Homarus americanus*. II. Structure of the mature follicle and origine of the chorion. *J. Ultrastruct. Res.*, 76, 249-262.
- Zerbib, C., 1977 - Endocytose ovocytaire chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Démonstration par la peroxydase. *C.R. Acad. Sci.*, 284, sér. D, 757-760.

## LEGENDE DES FIGURES 1-10

### Abréviations utilisées

CF : cellule de l'épithélium folliculaire secondaire ; CH : compartiment hémolympatique ; EV : enveloppe vitelline ; G : appareil de Golgi ; GL : globule lipidique ; GV : globule vitellin ; ID : interdigitation ; LB : lame basale ; M : mitochondrie ; MAV : macrovillosité ; MIV : microvillosité ; MT : microtubule ; N : noyau ; OV : ovocyte en vitellogenèse secondaire ; REG : réticulum endoplasmique granulaire ; RT : réseau tubulaire ; SM : système membranaire ; VP : vésicule de pinocytose.

Fig. 1 et 2 : Aspect d'ensemble d'une cellule de l'épithélium folliculaire secondaire montrant le réseau tubulaire. L'ovocyte est en vitellogenèse secondaire.

Fig. 3 : Cellules de l'épithélium folliculaire secondaire (détail). On remarque que le réseau tubulaire communique avec l'espace extracellulaire situé entre les cellules folliculaires adjacentes et à l'extérieur du follicule (côté de la lame basale).

Fig. 4 : Cellule de l'épithélium folliculaire (détail). Communication du réseau tubulaire avec l'extérieur du follicule (compartiment hémolympatique).

Fig. 5 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire (détail). Le réseau tubulaire est pénétré par les microvillosités de l'ovocyte qui est ici au début de la vitellogenèse secondaire (l'enveloppe vitelline n'est pas encore présente). Il est donc en continuité avec l'espace périovocytaire.

Fig. 6 : Tissu folliculaire secondaire avant la formation des follicules secondaires. On remarque l'absence de réseau tubulaire et les nombreuses interdigitations cytoplasmiques. Les noyaux sont très lobés et présentent une chromatine très condensée.

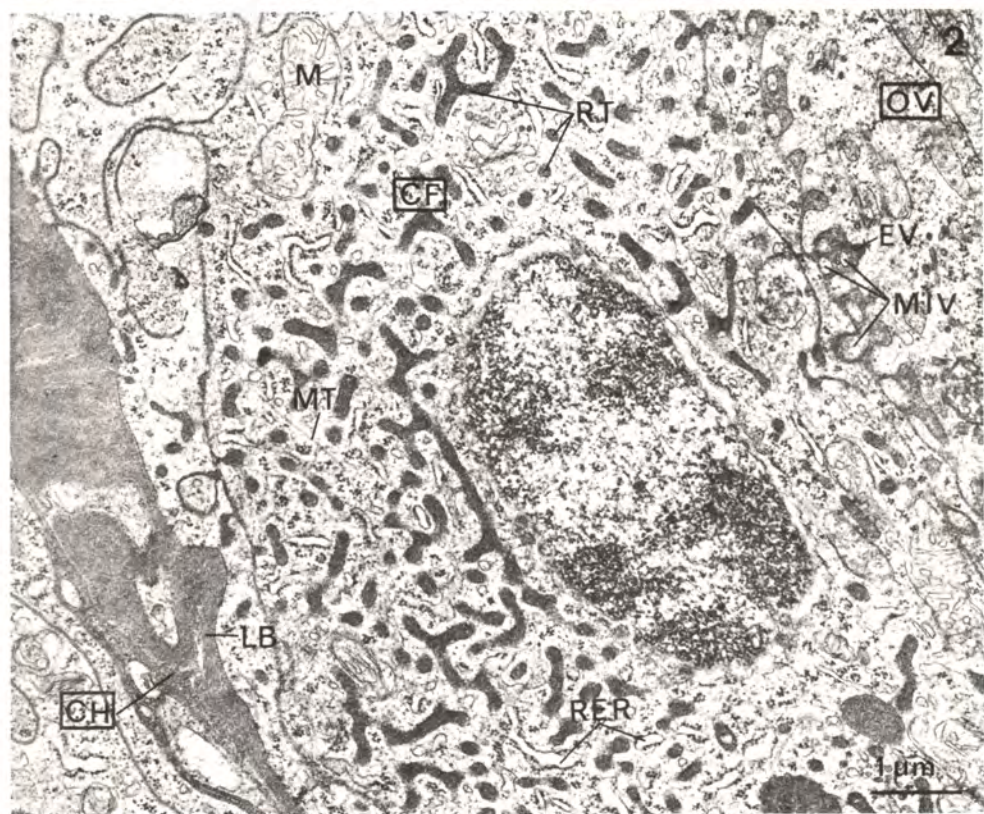
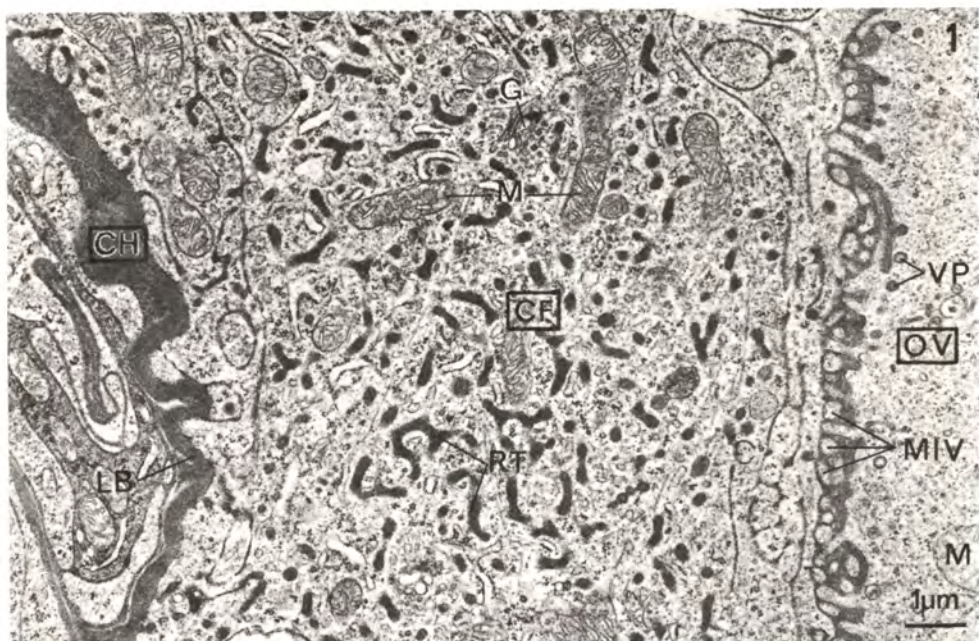
Fig. 7 : Cellules de l'épithélium folliculaire secondaire en début de vitellogenèse secondaire. Le réseau tubulaire est encore peu développé. Il apparaît essentiellement sous forme de dilatations affectant des systèmes membranaires en communication avec l'espace extracellulaire.

Fig. 8 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire après 5 mn d'incubation dans une solution de peroxydase. La peroxydase apparaît au niveau de la lame basale, de l'ensemble du réseau tubulaire, des microvillosités ovocytaires, des vésicules d'endocytose et des globules vitellins périphériques.

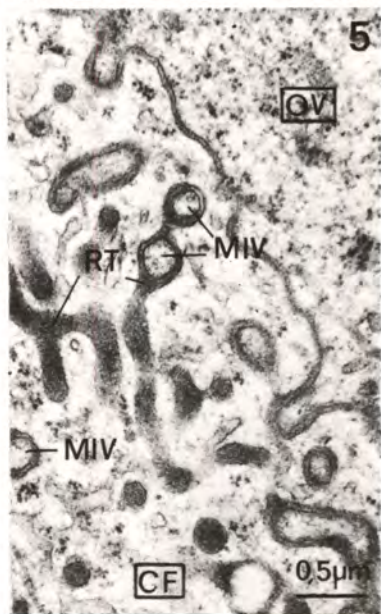
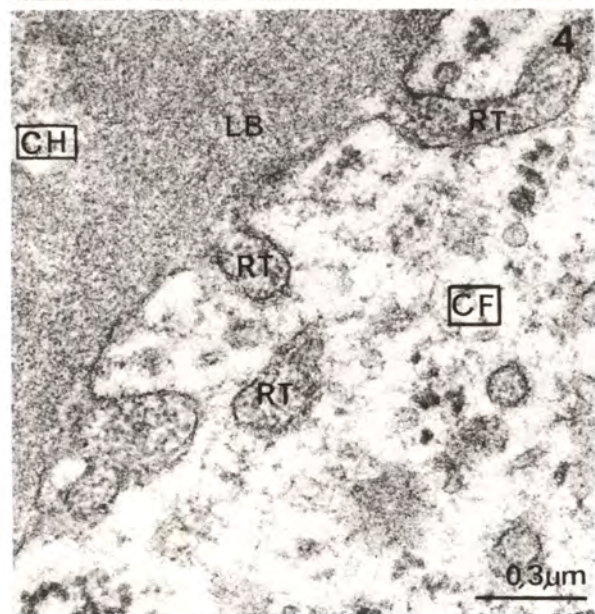
Fig. 9 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire après 5 mn d'incubation dans une solution de peroxydase (détail). La lame basale et l'ensemble du réseau tubulaire sont fortement marqués par la peroxydase.

Fig. 10 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire après 5 mn d'incubation dans une solution de peroxydase (détail). La peroxydase pénètre dans tous les systèmes membranaires et le réseau tubulaire.

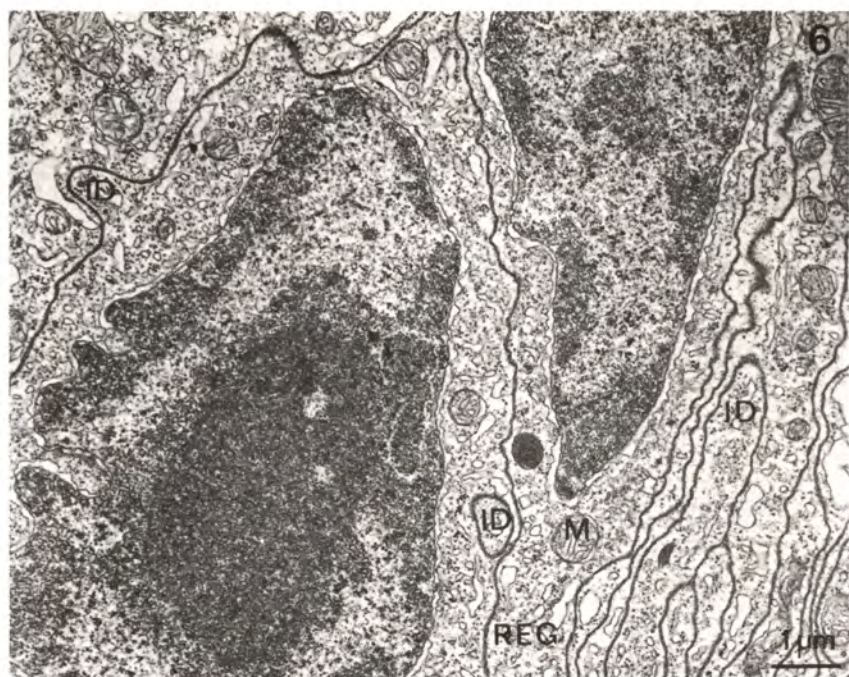




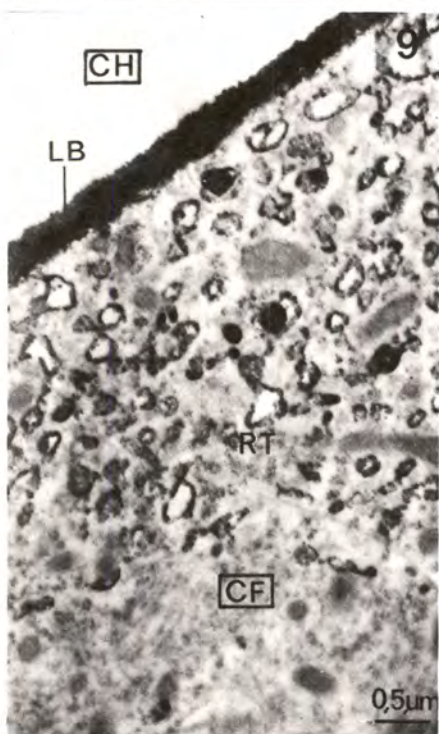
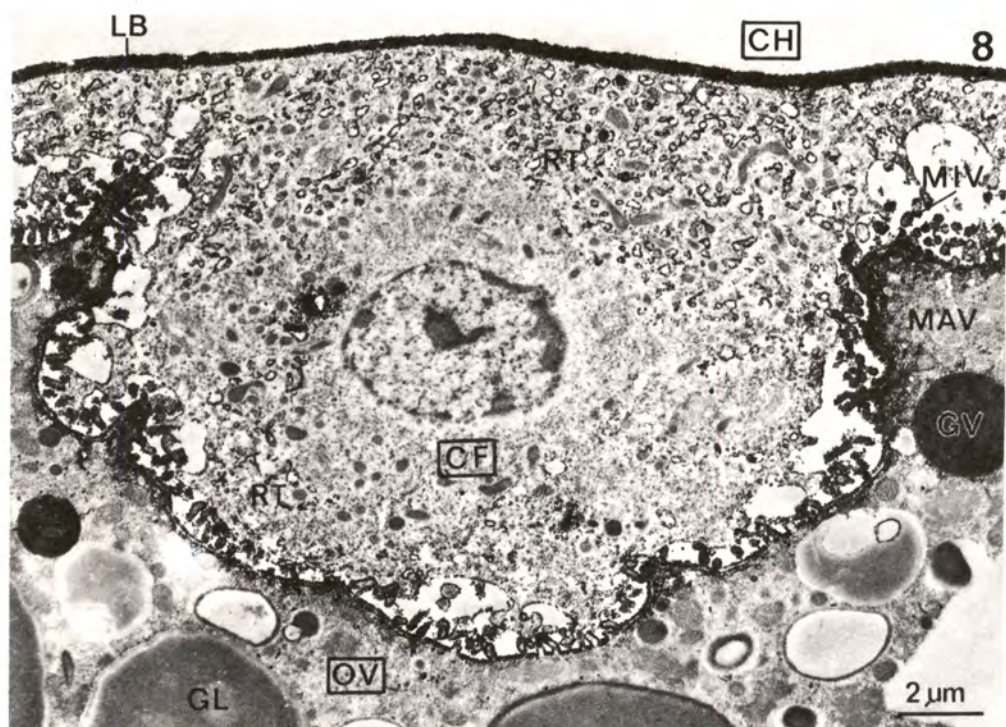














DONNEES CYTOLOGIQUES, ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES RELATIVES  
AU PHENOMENE DE FECONDATION CHEZ LE HOMARD (HOMARUS GAMMARUS (L.)) -  
IMPLICATION DU PROCESSUS D'ACTIVATION SUR LE MECANISME D'ATTACHE  
DES OEUFS PONDUS.

Marie GOUDEAU, Fabienne LACHAISE, Pascale KUBISZ et Henri GOUDEAU  
Université Pierre et Marie CURIE, 4 place JUSSIEU  
Laboratoires de Zoologie et de Biophysique - 75 005 PARIS  
et Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'ULM - 75 005 PARIS  
Station Biologique de ROSCOFF-29211  
C.E.N. SACLAY, Dept Biol. - 91191 Gif sur Yvette.

RESUME

Des mesures électrophysiologiques de potentiel membranaire d'ovocytes immatures et prématures de Homarus gammarus ont été effectuées dans différentes conditions expérimentales. Des contrôles cytologiques parallèles ont été réalisés. Il a été également établi, grâce à l'utilisation de techniques de chromatographie (HPLC) et de dosages radio-immunologiques, que ces mêmes ovocytes prématures de Homard contiennent différents ecdystéroïdes. D'autre part, la structure du pédicule d'attache (ou funicule) de l'oeuf pondu a été étudiée. Cette structure est constituée des deux enveloppes vitellines superposées, modifiées probablement lors de la réaction corticale à la fécondation. Enfin, les différentes enveloppes, sécrétées successivement par l'embryon au cours de son développement, ont été dénombrées et définies. Les taux d'ecdystéroïdes de l'embryon ont été également mesurés.

ABSTRACT

Electrophysiological measurements and related cytological controls were done on immature and submature oocytes of Homarus gammarus. By chromatography (HPLC) and radio-immunoassays (RIA) it was established that submature oocytes displayed different ecdysteroids. Furthermore, the structure of the stalk (funiculus) for the laid egg's attachment was analyzed. It consisted of the two superimposed vitelline envelopes which were likely modified by the cortical reaction exudate during the fertilization process. In addition, the successive secretory phases, regarding to the embryonic envelopes were evidenced. Finally, the ecdysteroid titers of embryonic stages were measured.

MOTS-CLEFS : Ovocyte, Potentiel membranaire, Ecdystéroïdes, Enveloppe de fécondation, Mues embryonnaires, Funicule, Crustacé, Décapode, Homard.

KEY WORDS : Oocyte, membrane potential, Ecdysteroids, Fertilization envelope, Embryonic molts, Funiculus, Crustacea, Decapoda, Lobster.

## INTRODUCTION

Les travaux relatifs au processus de fécondation chez les Crustacés Décapodes Reptantia sont relativement peu nombreux, mis à part quelques éléments intéressant les Brachyours (Brown, 1966; Hinsch, 1971) et une étude cytologique extensive que nous avons réalisée chez le crabe Carcinus maenas (Goudeau et Lachaise, 1980 a; 1980 b; Goudeau, 1982a; 1982b; Goudeau et Becker, 1982). L'ensemble de ces données, bien qu'amenant des résultats certains en ce qui concerne le processus de fécondation, ne permettent pas par la seule approche cytologique de saisir l'ensemble du phénomène. Récemment nous avons pu, par une étude électrophysiologique couplée à une analyse anatomique de l'oeuf en cours de fécondation réalisée chez les Brachyours Maia squinado et Carcinus maenas, appréhender les étapes du phénomène et apprécier le temps nécessaire à leur réalisation *in vitro* (résultats soumis pour publication). Dans le but d'atteindre les mêmes objectifs chez Homarus gammarus, nous avons entrepris une étude anatomo-électrophysiologique. Nous rapportons ici les résultats préliminaires concernant cette espèce, relatifs aux caractéristiques électrophysiologiques de la membrane de l'ovocyte immature et prémature, ainsi qu'à l'effet de l'agent activant A 23 187 (ionophore calcium) sur ce modèle. De plus, nous avons réalisé une étude biochimique préliminaire centrée sur la détection, au niveau des ovocytes prématures, d'ecdystéroïdes afin de tenter d'établir le rôle que pourraient jouer ces hormones dans certains phénomènes liés au processus de fécondation. Par ailleurs, nous définissons dans ce travail, en ce qui concerne l'oeuf pondu de Homarus gammarus, la structure du funicule d'attache dont la réalisation est issue pour partie de la réaction corticale chez les crabes, lors de la fécondation (Goudeau et Lachaise, 1983). A l'encontre des différents stades du développement embryonnaire de Homarus gammarus nous avons défini également les enveloppes embryonnaires et déterminé qualitativement et quantitativement les ecdystéroïdes présents chez certains de ces stades embryonnaires.

## MATERIEL ET METHODES

### A. Matériel

Des femelles pubères de Homarus gammarus (L.), de longueur supérieure à 29 centimètres, ont été fournies par la Société anonyme "la Langouste" de Roscoff. Les ovocytes ont été prélevés, en vue d'expérimentations, au niveau ovarien et conservés dans l'eau de mer artificielle. Les "oeufs" pondus ont été récoltés sur les soies pléopodales de femelles ovigères.

### B. Méthodes en vue d'études en microscopie électronique

#### 1) Microscopie électronique à balayage

Les "oeufs" pondus ont été fixés durant 3 heures à la température du laboratoire, dans un liquide fixateur comprenant 2,8% de glutaraldehyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,4M) à pH 7,2. Du saccharose a été ajouté au liquide fixateur afin de réajuster la pression osmotique de ce dernier. Les spécimens ont été post-fixés avec une solution d'acide osmique à 1% dans le même tampon cacodylate de sodium, durant 2 heures. Après une deshydratation extrêmement progressive, les spécimens ont été traités par une série graduelle d'éthanol-acétate d'amyle, puis finalement maintenus dans l'acétate d'amyle pur. Ils ont été ensuite deshydratés par la méthode du point critique, puis métallisés avec un mélange d'or-palladium et enfin examinés à l'aide d'un microscope électronique Jeol.

#### 2) Microscopie électronique à transmission

Les ovocytes provenant d'expérimentations électrophysiologiques ainsi que leurs témoins, et les "oeufs" pondus, ont été fixés dans un mélange comprenant 1,4% de glutaraldehyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,4M



à pH 7,2) et 1% de chlorure de calcium, durant 45 minutes à 90 minutes, à la température du laboratoire. La pression osmotique du liquide fixateur a été réajustée par adjonction de saccharose. Les spécimens ont été ensuite post-fixés dans un mélange d'acide osmique à 1% dans le même tampon cacodylate de sodium, durant 1 à 2 heures. Après deshydratation, les spécimens ont été inclus dans l'Epon 812 ou bien dans l'ERL 4206 dont l'extrême viscosité permet une meilleure impregnation des tissus.

Les coupes ultrafines ont été réalisées à l'aide d'ultramicrotomes LKB et Reichert et colorées avec de l'acetate d'uranyl en solution alcoolique et contrastées avec du citrate de plomb selon Reynolds(1963).

Les coupes ont été observées à l'aide de microscopes électroniques Jeol 100 et Philips 300.

### C. Techniques électrophysiologiques

Les ovocytes ont été empalés, sous contrôle microscopique, à l'aide de microélectrodes de verre remplies de KCl (2M; 30 à 60 M $\Omega$  de résistance dans l'eau de mer). La microélectrode est connectée à un amplificateur à haute impédance d'entrée, le circuit étant fermé grâce à une électrode d'argent-argent chloruré reliée à l'eau de mer par un pont d'agar- KCl 2M. Les empalements sont réalisés grâce à un micromanipulateur à moteur pas-à-pas, ce qui minimise les lésions mécaniques de la membrane. La résistance de la membrane est appréciée en injectant du courant dans la microélectrode.

### D. Techniques de détection des ecdyxtéroïdes

Les extraits d'ovaires et d'"oeufs" pondus ont été analysés en chromatographie liquide de haute performance (HPLC) par injection sur colonne de silice après une purification en phase reverse. Les différents ecdystéroïdes sont ensuite dosés par radio-immunologie.

## RESULTATS

### I- ETUDE ANATOMO-ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET DETERMINATION DES ECDYSTEROIDES DES OVOCYTES DE HOMARUS GAMMARUS (L.).

#### A. Etude anatomo-électrophysiologique

##### 1) Données électrophysiologiques

a- Ovocytes immatures: Les ovocytes immatures ont un potentiel de membrane de  $-65 \pm 2$  mV, valeur qui est très proche de celle mesurée pour les crabes Maia squinado et Carcinus maenas.

Des expériences de substitutions d'ions (Fig. 1a) nous ont permis de préciser le déterminisme ionique de cette différence de potentiel. Ainsi, le remplacement total du sodium de l'eau de mer par du potassium, provoque une dépolarisation moyenne de la membrane de  $84,5 \pm 1,5$  mV. Cette valeur se rapproche suffisamment des 93 mV théoriques que l'on obtiendrait si la membrane de l'ovocyte n'était qu'exclusivement perméable au potassium, pour que l'on puisse affirmer que le potentiel de membrane est essentiellement potassium-dépendant. Ce résultat est corroboré par le fait que la suppression totale du chlorure ou du sodium hyperpolarise la membrane de  $10 \pm 1$  mV et la dépolarise de  $8 \pm 1$  mV respectivement. L'hyperpolarisation de la membrane sous l'effet de la suppression du chlorure a déjà été décrite chez d'autres espèces animales (Hagiwara et Jaffe, 1979) et ne peut s'expliquer simplement. Elle exclut l'existence d'une perméabilité importante pour l'anion. Cette observation est aussi valable pour le sodium. L'ajout dans l'eau de mer de l'ionophore calcium A 23 187 ne provoque aucun changement de la différence de potentiel transmembranaire (Fig. 1a). La résistance de la membrane est en moyenne inférieure à 1 M $\Omega$ , avec ou sans cet agent activant.

b- Ovocytes prématures: La maturation meiotique se manifeste, chez Maia squinado et chez Carcinus maenas par une diminution brutale de la polari-



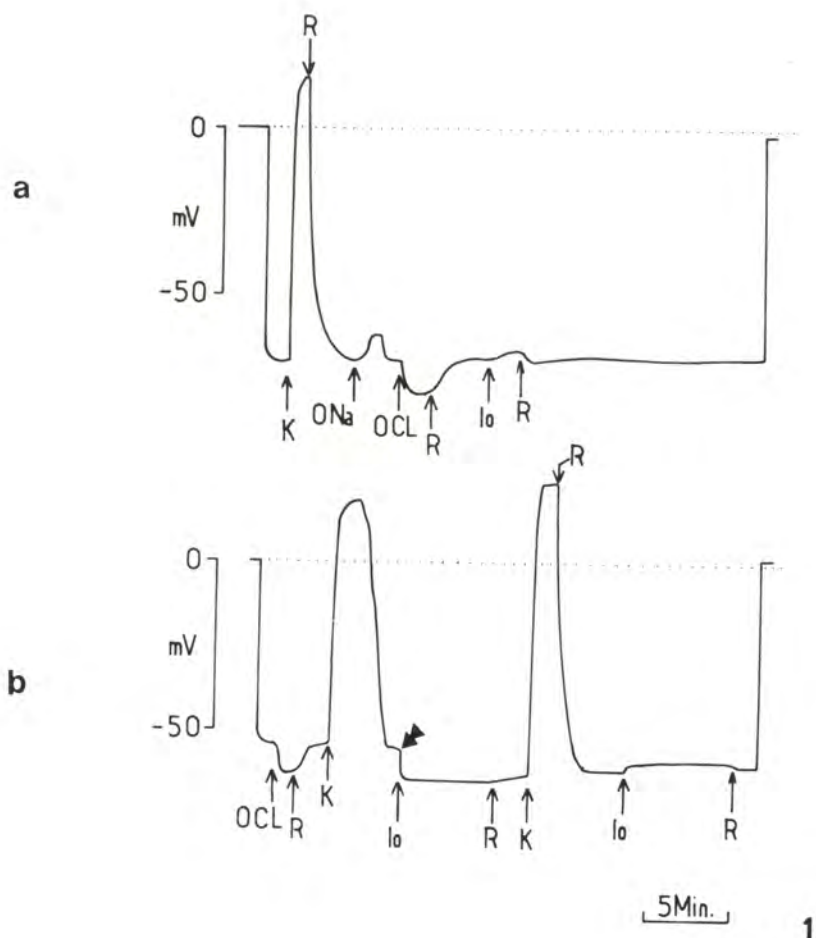


Fig. 1 - Potentiel de membrane de l'ovocyte immature et submature de Homarus gammarus.

La figure la représente l'enregistrement de potentiel trans-membranaire d'un ovocyte immature. Lorsque tout le sodium de l'eau de mer est remplacé par du potassium(K), la membrane se dépolarise de 85 mV et reprend sa polarisation lorsque l'eau de mer baigne à nouveau l'ovocyte(R). La suppression du chlorure de l'eau de mer(OCl) hyperpolarise légèrement la membrane. L'ajout de l'ionophore A23 197( $2 \cdot 10^{-6}$  M dans l'eau de mer) ( $I_o$ ), ne provoque aucun effet.

La figure lb représente le même type de mesure effectuée sur un ovocyte submature. Dans ce cas, l'ajout de l'ionophore A23 187 ( $2 \cdot 10^{-6}$  M) provoque une hyperpolarisation de la membrane ( $\blacktriangle$ ) qui est lentement réversible. Notez, juste après la suppression de l'ionophore, la dépolarisation de la membrane sous l'effet du potassium(K) qui paraît largement augmentée.

sation membranaire qui s'accompagne de changements drastiques de la perméabilité de la membrane : celle-ci, en effet, acquiert une sélectivité vis à vis du chlorure, mais perd celle qu'elle possédait vis à vis du potassium (Goudeau et Goudeau, soumis pour publication). Ce phénomène se produit qualitativement aussi chez Homarus gammarus mais semble prendre, pour s'installer, plus de temps. Ainsi, nous avons mesuré sur les ovocytes prématures de Homarus gammarus des valeurs de potentiel que nous avons rangées en deux classes. Cette variabilité dans les valeurs de potentiel traduit probablement une évolution dans le temps du processus de maturation. Ainsi, les ovocytes de deux femelles (Fig. 1b) ont fourni une valeur moyenne de potentiel de  $-49 \pm 2$  mV (n=12). Leur membrane se dépolarise de  $64 \pm 2,5$  mV lorsque tout le sodium de l'eau de mer est remplacé par du potassium. Les effets de la suppression du chlorure sont identiques à ceux détectés sur l'ovocyte immature, tandis que ceux produits par la suppression du sodium sont insignifiants. Ainsi, la membrane a essentiellement perdu une partie de sa perméabilité au potassium. Sa résistance augmente d'ailleurs et peut atteindre 2 à 4 M $\Omega$ . L'ajout de ionophore A 23 187 dans l'eau de mer provoque immédiatement une hyperpolarisation (lentement réversible au rinçage) qui amène la membrane à une valeur moyenne de potentiel de  $-62 \pm 2,5$  mV (n = 11). Juste après le rinçage de l'ionophore le remplacement du sodium par du potassium dépolarise la membrane de  $81 \pm 2$  mV, sans modifier la réponse à la suppression du chlorure ou du sodium. Ainsi, sur les ovocytes traités par l'ionophore les valeurs de potentiel de membrane et de dépolarisation, provoquées par le potassium, sont pratiquement identiques à celles observées sur les ovocytes immatures. L'agent activant qui, fonctionnellement, augmente la concentration intracytosolique de calcium (Steinhardt et Epel, 1974) rend donc à la membrane sa perméabilité exclusive pour le potassium. Nous avons regroupé les ovocytes de deux autres femelles (Fig. 2a) dans une autre classe de valeurs: en effet la valeur moyenne du potentiel de membrane de ces ovocytes est alors de  $-31 \pm 3$  mV (n=16). La membrane se dépolarise de  $45 \pm 4$  mV (n = 15) sous l'effet du potassium, tandis que la suppression du chlorure provoque un effet variable, soit légèrement hyperpolarisant, soit dépolarisant (de 10 mV en moyenne) comme sur les ovocytes maturés de Maia squinado ou de Carcinus maenas (Fig. 2a et 2b). Cette dépolarisation de la membrane lors de la suppression du chlorure de l'eau de mer est due à une sortie de l'anion hors de l'ovocyte et signale donc l'apparition d'une perméabilité au chlorure. La résistance de la membrane est de nouveau inférieure à 1 M $\Omega$ . Lorsque l'ionophore A 23 187 est ajouté à l'eau de mer, la membrane s'hyperpolarise de 10 à 15 mV, le potentiel de membrane, après complétion de l'effet, étant égal à  $-48 \pm 3$  mV (n = 8), et la dépolarisation induite par le potassium de  $74 \pm 6$  mV (n = 4). Il est important de noter que, au rinçage de l'ionophore, le potentiel reprend immédiatement sa valeur initiale (alors que son effet était plus permanent sur les ovocytes prématures précédemment décrits). Ainsi l'agent activant augmente dans ce cas aussi la perméabilité de la membrane au potassium mais d'une manière moins complète et moins soutenue que pour les ovocytes prématures déjà mentionnés.

## 2) Données cytologiques

Les ovocytes immatures et prématures étudiés électrophysiologiquement et traités au ionophore calcium A 23 187 ont été ensuite analysés d'un point de vue ultrastructural. Les témoins de ces spécimens, maintenus dans de l'eau de mer sans adjonction d'agent activant ont été pareillement observés. L'étude ultrastructurale du cortex de ces ovocytes expérimentales et de leurs témoins indique qu'il n'existe aucun signe de réaction corticale pour chacune des situations expérimentales envisagées (Fig. 4). En effet, il est impossible de déceler dans l'espace perivitellin de rejet d'une substance finement granuleuse qui puisse être comparable au premier exudat que nous avons observé dans la réaction corticale, chez les crabes Carcinus maenas (Goudeau, 1982b; Goudeau et Becker, 1982) et Maia squinado (Goudeau et Goudeau, soumis

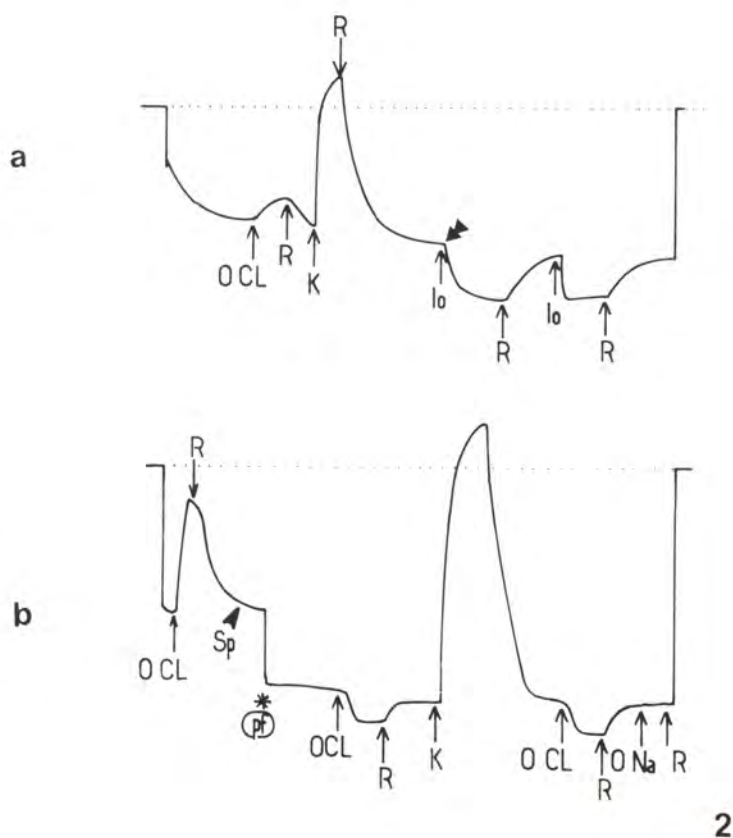


Fig. 2 - Potentiel de membrane de l'ovocyte submature de Homarus gammarus et de l'ovocyte mûr puis fécondé de Maia squinado. La figure 2a représente l'enregistrement de la mesure de potentiel transmembranaire d'un ovocyte submature de Homarus gammarus n'ayant pas encore atteint le stade de maturation où il peut être fécondé. La suppression du chlorure (OCL) dépoliarise légèrement la membrane de même que le remplacement du sodium par du potassium(K). L'ajout d'ionophore A23 187 ( $2.10^{-6}$  M dans l'eau de mer) (▲) provoque une hyperpolarisation conséquente, mais réversible de la membrane. La figure 2b représente l'enregistrement d'un potentiel de fécondation (pf\*) obtenu sur un ovocyte physiologiquement mûr de Maia squinado. On peut noter l'analogie entre ce potentiel de fécondation et l'hyperpolarisation due au ionophore(I<sub>0</sub>).



pour publication). De plus, l'analyse des coupes ultrafines permet de déceler que les vésicules contenant des éléments en forme d'anneau, demeurent en place dans le cortex ovocytaire et ne subissent aucun phénomène d'exocytose ( Fig. 5). A ce sujet, nous devons rappeler que, pour le modèle crabe, ces éléments représentent le deuxième matériel précurseur impliqué dans la réaction corticale et fournissant après exocytose l'essentiel de l'enveloppe 2. Cette enveloppe, associée au revêtement vitellin sus-jacent, a été définie comme étant l'enveloppe de fécondation ( Goudeau, 1982b, Goudeau et Becker, 1982). Par ailleurs, l'analyse ultrastructurale de ces spécimens révèle l'exocytose d'un matériel ovocytaire granuleux, qui sans aucun doute représente un précurseur de l'enveloppe vitelline 1b alors en formation et dont les éléments viennent s'accoler à l'enveloppe vitelline 1a préexistante (Fig. 6). Cette observation complète les données publiées par Talbot(1981), concernant l'origine et l'élaboration de cette enveloppe vitelline la plus interne, dont le précurseur principal est issu des cellules folliculaires environnantes. Pour conclure, l'enveloppe vitelline 1b comprendrait un stroma granuleux d'origine ovocytaire et des éléments principaux d'origine folliculaire.

## B. Détermination des ecdystéroïdes

### 1) Ovocytes prématures

La figure 3a représente le résultat de la détection des ecdystéroïdes dans les ovocytes prématures de Homarus gammarus. Il apparaît que deux ecdystéroïdes en quantité relativement importante sont présents dans l'ovocyte prémature: de la ponastérone A ( 130 nano grammes / gramme de poids frais) et de la 20-hydroxyecdysone (10 nano grammes / gramme de poids frais). Il existe de plus, des traces d'ecdysone. La présence concomitante dans les ovocytes prématures, de ces deux hormones, dont l'une est le précurseur de l'autre, est pour l'instant de signification obscure.

### 2) Embryons

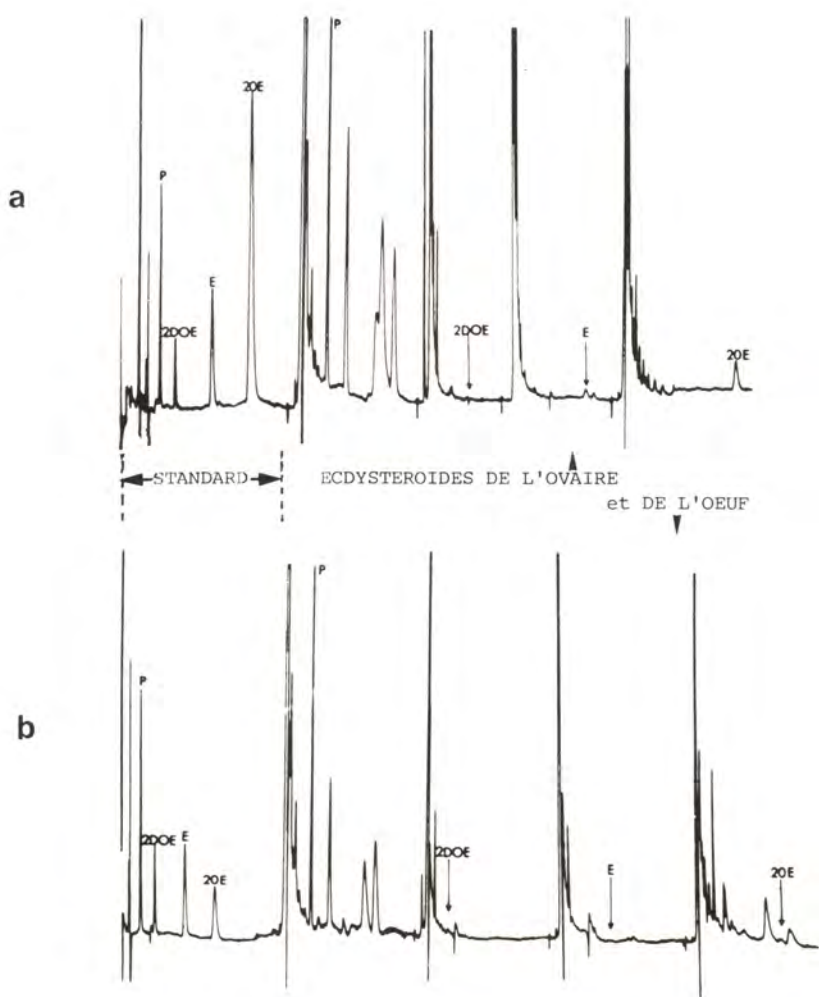
Les mêmes analyses biochimiques permettent de détecter la présence exclusive de ponastérone A dans les embryons en fin de développement (35 nano grammes / gramme de poids frais).

## II- ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DU MECANISME D'ATTACHE DE L'"OEUF" PONDU DE HOMARUS GAMMARUS(L.)

L'"oeuf" nouvellement pondu de Homarus gammarus, comme celui d'autres Décapodes, est relié aux soies ovigères maternelles, par l'intermédiaire d'un pédicule d'attache ou funicule ( Fig. 7). Nous nous sommes appliqués à analyser sa constitution, à comprendre le mécanisme de son élaboration, et à analyser son contact avec la soie ovigère (Fig. 8).

Dans ce but, nous avons effectué des coupes ultrafines et semi-fines au niveau de la zone d'accolement du funicule à la soie ovigère ( sectionnée transversalement), et à l'embase du funicule. De l'ensemble de ces observations il résulte que le funicule de l'"oeuf" pondu de Homarus gammarus est constitué par l'association des enveloppes vitellines 1a et 1b accolées, comme cela a déjà été défini pour le crabe Carcinus maenas ( Goudeau et Lachaise, 1983). Ces enveloppes vitellines, extrêmement étirées forment l'embase(Figs.11, 13 et 14) et le corps du funicule (Figs. 13 et 14). Il faut noter que lorsque le funicule est élaboré, l'enveloppe 1b s'amenuise autour de l'oeuf à partir de l'embase du funicule, et n'est plus décelable sur la majorité de la superficie de l'oeuf. Celui-ci n'est plus donc limité que par l'enveloppe 1a externe (Fig.15).

A son apex, le funicule s'accolle à la soie (Fig. 9), vraisemblablement par son extrémité aveugle limitée par l'enveloppe 1a. Celle-ci est



3

Fig. 3a - Mise en évidence des ecdystéroïdes dans les ovaires submature de Homarus gammarus (L.).

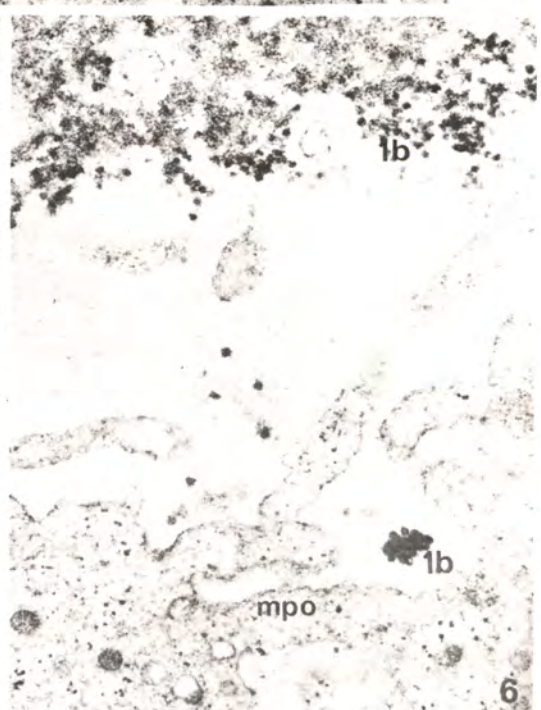
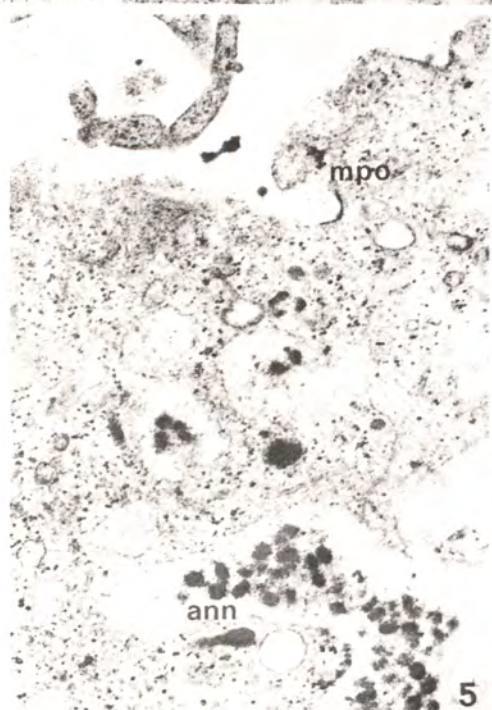
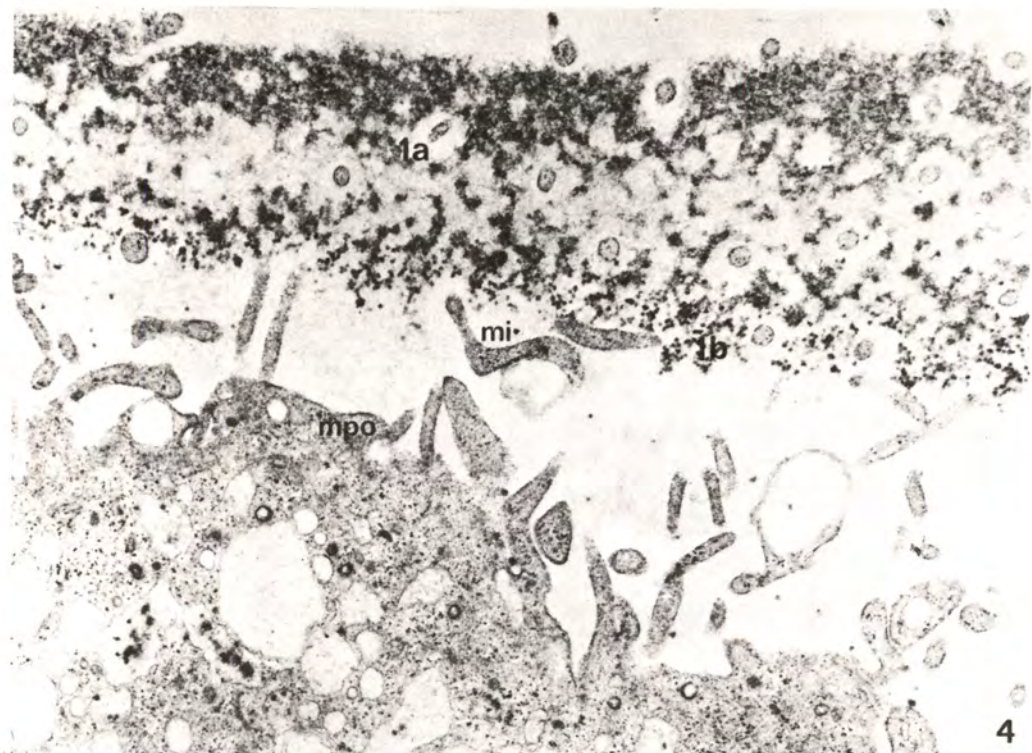
La figure représente un enregistrement typique des pics d'ecdystéroïdes obtenus en chromatographie liquide de haute performance (HPLC) par injection sur colonne de silice après une purification en phase inverse. Les pics sont étalonnés grâce à l'injection des ecdystéroïdes de référence en quantité connue (STANDARD). P, 2 DOE, E, 20E représentent respectivement la ponastérone A, la 2 deoxyecdysone, l'ecdysone et la 20 hydroxyecdysone.

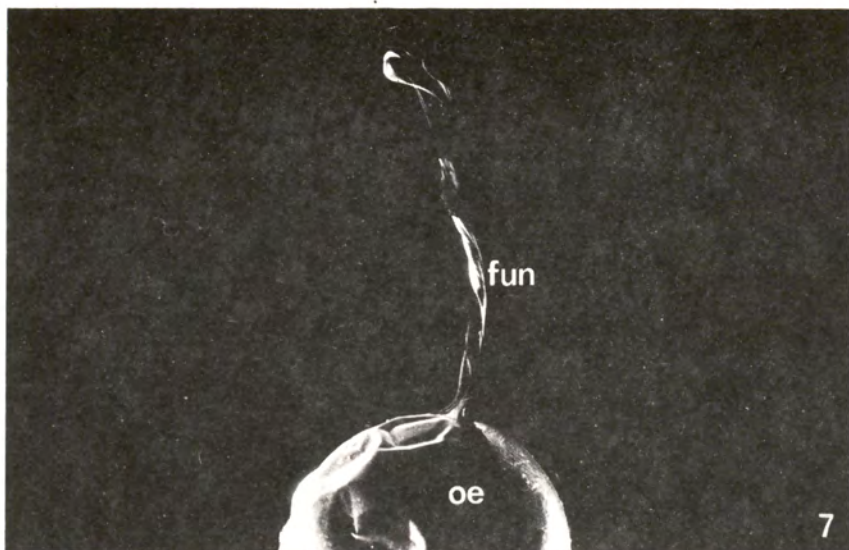
Fig. 3b - Mise en évidence des ecdystéroïdes dans les oeufs de Homarus gammarus(L.) (phase embryonnaire "zoé" avec l'enveloppe embryonnaire 6 sécrétée).



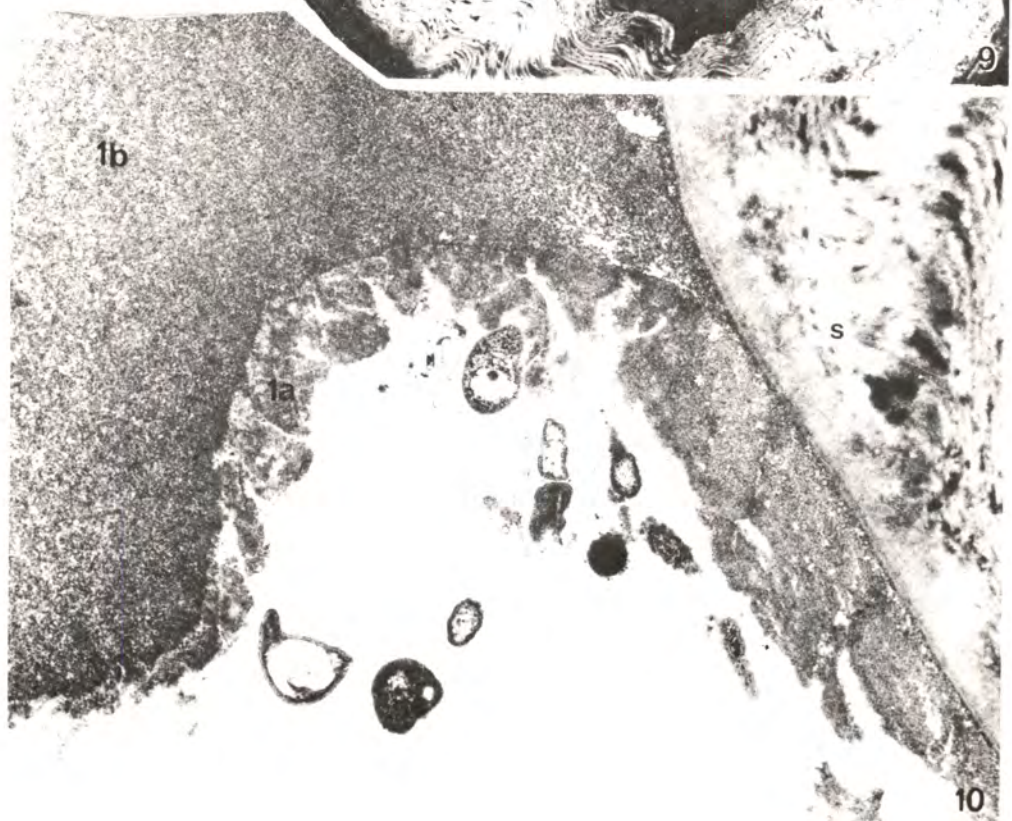
- Fig. 4 - Vue de la région corticale d'un ovocyte submaturation de Homarus gammarus(L.) en coupe ultrafine . L'ovocyte impliqué est celui dont on montre également les caractéristiques électrophysiologiques(Fig.1b) après application d'ionophore A 23 187, qui provoque une réponse analogue à un potentiel de fécondation . Ici, malgré la réponse électrique membranaire, le cortex de l'ovocyte ne réagit pas , et l'on n'observe aucune réaction corticale. (X 26 000)
- Fig. 5 - Détail de la région corticale de l'ovocyte décrit dans la figure 4. On observera la présence de vésicules corticales remplies d'éléments en forme d'anneaux analogues à ceux définis comme étant le deuxième précurseur de la réaction corticale chez les Crustacés Brachyours. (X 40 000)
- Fig. 6 - Détail de la région corticale de l'ovocyte décrit dans la figure 4. Cette coupe montre la sécrétion par l'ovocyte d'une substance granuleuse qui correspond à l'un des précurseurs de l'enveloppe vitelline 1b , en formation. (X 54 000)
- Fig. 7 - Vue épiscopique, au microscope électronique à balayage, d'un oeuf pondu muni de son pédicule d'attache(ou funicule) aux soies ovigères de la femelle. (X 34)
- Fig. 8 - Vue au microscope électronique à balayage de la zone d'accroissement, du funicule d'un oeuf pondu, à un faisceau de soies ovigères. (X 440)
- Fig. 9 - Vue en coupe ultrafine du point d'attache d'un funicule à une soie ovigère sectionnée transversalement. (X 8 000)
- Fig. 10 - Détail d'une coupe ultrafine effectuée au niveau du point d'attache du funicule à la soie ovigère de Homarus gammarus. (X 26 000)
- Fig. 11 - Vue d'une section ultrafine effectuée au niveau des enveloppes superposées entourant un stade embryonnaire "naupius", chez Homarus gammarus. La section intéresse la base du funicule et révèle, encore à ce niveau, la présence de l'enveloppe vitelline 1b. Notez la présence d'une substance surnuméraire sur l'enveloppe 1a ( flèche). (X 16 400)
- Fig. 12 - Détail d'une coupe ultrafine effectuée au point d'accroissement du funicule à une soie ovigère. (X 40 000)
- Fig. 13 - Vue, en coupe sagittale semi-fine, de l'ensemble du funicule d'attache formé par les enveloppes vitellines superposées 1a+1b, d'un oeuf pondu. On observera que ces enveloppes vitellines sont extrêmement étirées au niveau du funicule et que par ailleurs l'enveloppe 1b n'existe exclusivement qu'à l'embase du funicule et s'amenuise brutalement autour de l'embryon. (X 200)
- Fig. 14 - Détail en coupe ultrafine de l'embase du funicule d'attache d'un stade embryonnaire "nauplius". Notez la présence d'une substance surnuméraire appliquée sur l'enveloppe 1a ( flèche). (X 11 200)
- Fig. 15 - Vue, en coupe ultrafine, de la région superficielle d'un stade embryonnaire "zoé" de Homarus gammarus, montrant la superposition de l'enveloppe de fécondation (= enveloppe vitelline + enveloppe 2) et des enveloppes embryonnaires successivement sécrétées par l'embryon ( enveloppes 3, 4,5,6). (X 16 400)
- Fig. 16 - Détail de la membrane plasmique apicale d'une cellule superficielle d'un stade embryonnaire "zoé". Cette coupe ultrafine révèle la présence de microvillosités à l'apex desquelles on peut observer le précurseur ( flèches) de l'enveloppe 6 en cours de sécrétion. (X 54 000)
- Fig. 17 - Vue, en coupe, de la région superficielle d'un stade d'éclosion ( 1ère mysis) de Homarus gammarus, montrant la cuticule larvaire (= enveloppe 7) sécrétée au cours du dernier stade embryonnaire. Le revêtement cuticulaire est sous-jacent à l'enveloppe embryonnaire 6. (X 20 000)
- Fig. 18 - Vue d'une coupe ultrafine révélant le détail de la structure des enveloppes embryonnaires superposées 4, 5 et 6 , de Homarus gammarus. (X 54 000)
- Fig. 19 - Détail de l'aspect ultrastructural de l'enveloppe embryonnaire 5. (X 54 000)
- Fig. 20 - Vue en coupe des enveloppes embryonnaires superposées 4, 5 et 6. (X 32 000)
- Fig. 21 - Vue d'une coupe ultrafine effectuée au niveau de l'enveloppe embryonnaire 6 et de la cuticule de la future 1ère mysis (= enveloppe 7). On observera l'agencement cuticulaire "en contraplaqué torsadé". (X 40 000)
- Figs. 22 et 23 - Détail de la sécrétion de la cuticule de la future 1ère mysis (= enveloppe embryonnaire 7), en cours de sécrétion. On remarquera, à l'apex de nombreuses microvillosités des cellules épidermiques , le dépôt de précurseurs ( flèches) de la cuticule de la mysis. (X 54 000 et X 40 000)



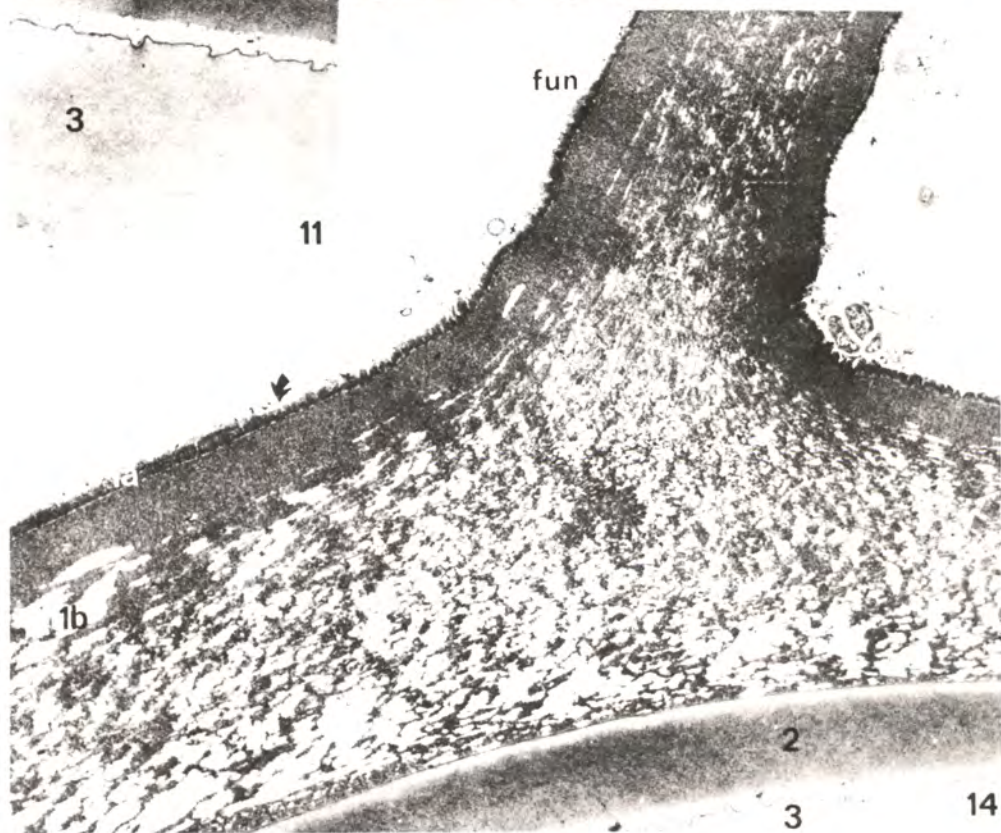
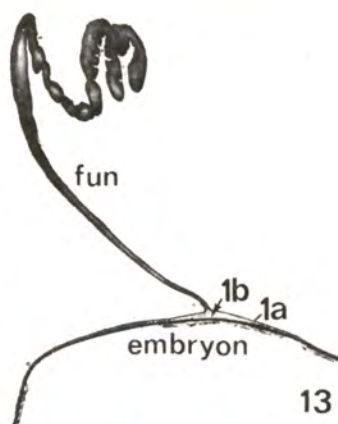
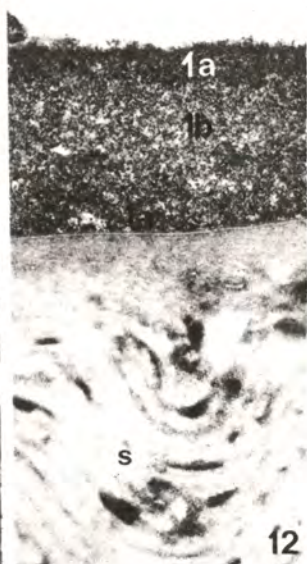
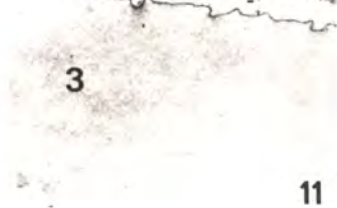
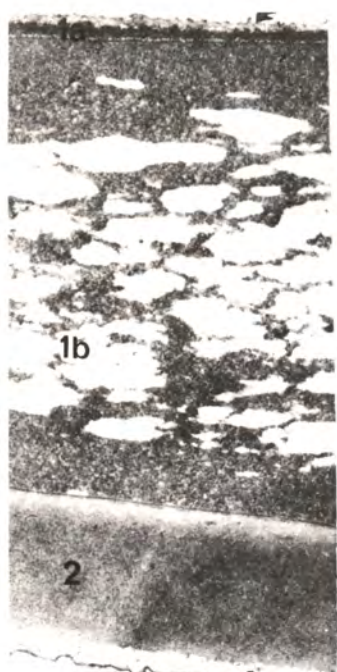


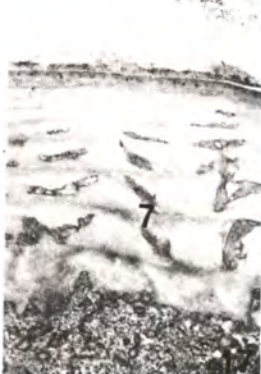
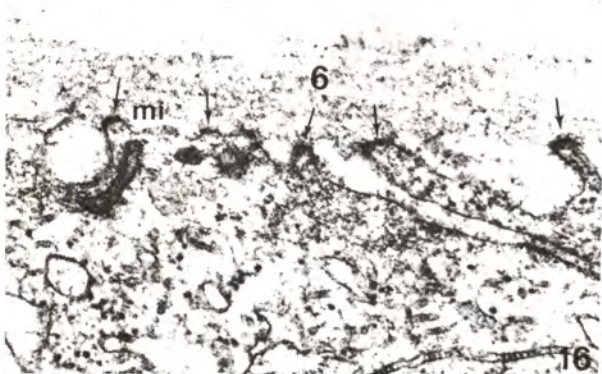
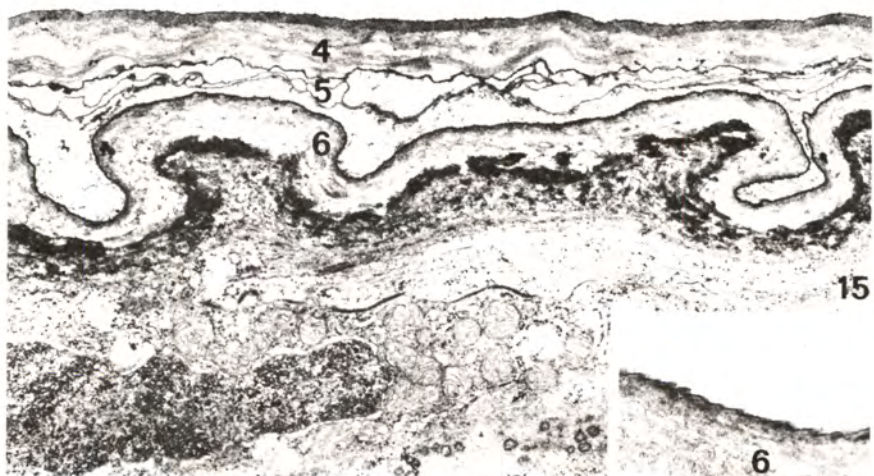
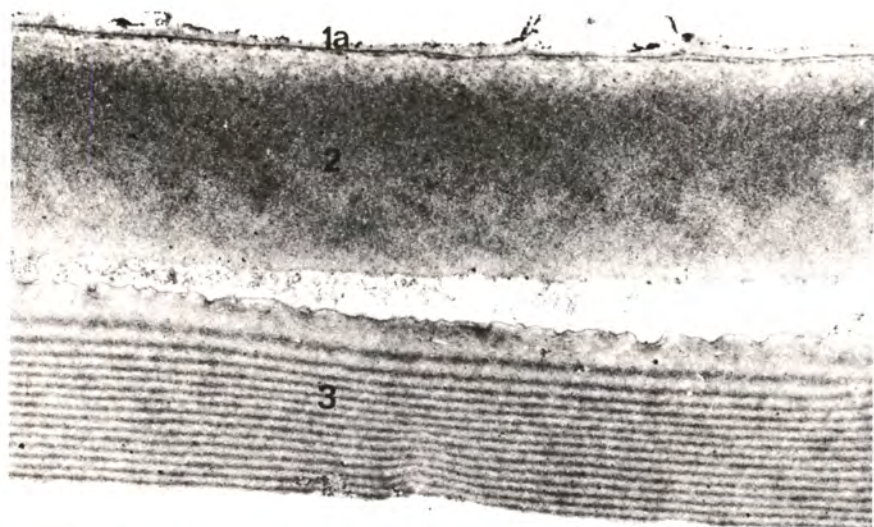








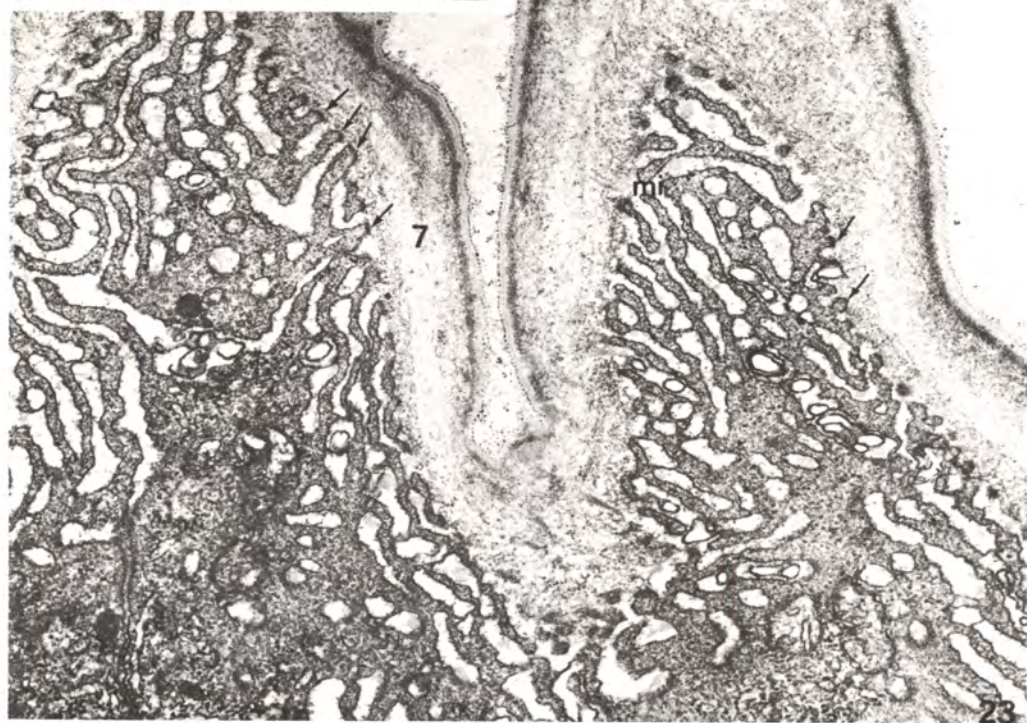
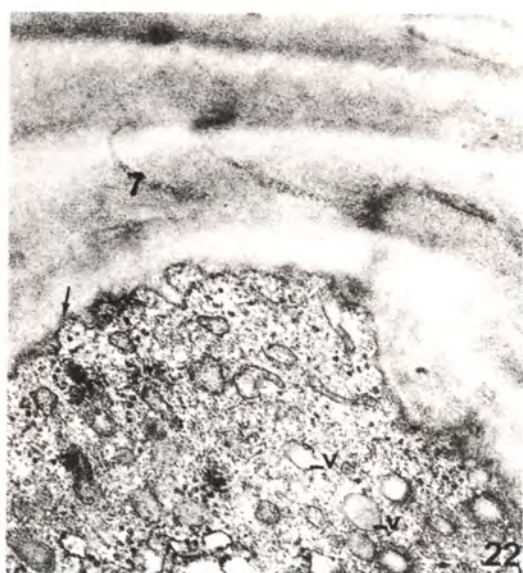














difficilement discernable au contact de la soie (Figs. 10 et 12). Il faut noter également la présence, décelée sur coupes ultrafines, d'un matériel additionnel appliqué à la surface de l'enveloppe 1a (Figs. 11 et 14).

### III- DESCRIPTION DES ENVELOPPES EMBRYONNAIRES DE HOMARUS GAMMARUS (L.).

L'observation de coupes ultrafines de la région superficielle d'embryons de *Homarus gammarus* à l'éclosion, indique indubitablement qu'il existe 7 enveloppes superposées. Le revêtement le plus externe est constitué de l'enveloppe vitelline 1a accolée à l'enveloppe 2 (issue de la réaction corticale), formant ainsi l'enveloppe de fécondation.

Sous-jacentes à ce revêtement, il existe cinq enveloppes superposées, dénommées respectivement enveloppes embryonnaires 3, 4, 5, 6 et 7 (Figs. 15, 17, 18 et 21). Ces enveloppes sont sécrétées par l'embryon. Certains aspects du mécanisme sécrétoire ont pu être mis en évidence pour les deux dernières enveloppes embryonnaires (6 et 7). Les précurseurs de l'enveloppe apparaissent accumulés à l'apex de microvillosités formées par la membrane plasmique apicale des cellules ectodermiques de l'embryon (Figs. 16, 21, 22 et 23). Il est à souligner que l'enveloppe 7 est répertoriée comme étant une enveloppe sécrétée au cours de la phase finale du développement embryonnaire et, de ce fait, peut être considérée comme une enveloppe embryonnaire, bien que fonctionnellement représentant la cuticule de la première mysis à l'éclosion. Il est à remarquer que, pour la même espèce, Cheung (1966) n'a décrit que deux enveloppes embryonnaires.

### DISCUSSION

De l'ensemble de nos résultats, plusieurs points originaux méritent d'être soulignés : i) la présence d'une hyperpolarisation membranaire de l'ovocyte prématuration sous l'effet de l'ionophore A 23 187;

ii) un mécanisme sophistiqué d'attache de l'"oeuf" pondu aux soies ovigères maternelles;

iii) la présence d'ecdystéroïdes dans les embryons qui, par ailleurs, présentent plusieurs enveloppes embryonnaires superposées.

#### L'hyperpolarisation membranaire de l'ovocyte sous l'effet de l'agent activant:

La fécondation chez la plupart des espèces animales étudiées se manifeste sur le plan électrophysiologique par une dépolarisation rapide et plus ou moins persistante de la membrane de l'oeuf. Cette variation de potentiel est définie comme étant le potentiel de fécondation (Hagiwara et Jaffe, 1979). Au potentiel de fécondation fait suite classiquement une repolarisation de la membrane due à une augmentation de la perméabilité de la membrane au potassium (Hagiwara et Jaffe, 1979). Le potentiel de fécondation est la conséquence d'une augmentation de la concentration intracytosolique en calcium de l'ovocyte (Ridgway et coll., 1977; Steinhardt et coll., 1977; Cuthbertson et coll., 1980) déclenchée par le contact entre les gamètes. L'ionophore calcium A 23 187 provoque, à la cinétique près, la même séquence d'événements électrophysiologiques que la fécondation (Steinhardt et Epel, 1974). Dans le cas des oeufs de Crustacés *Maia squinado* et *Carcinus maenas* nous avons récemment démontré (résultats actuellement soumis pour publication) que le potentiel de fécondation se manifeste par une hyperpolarisation permanente de la membrane due à une augmentation brutale de la perméabilité au potassium (Fig. 2b). Cette réponse présente une certaine analogie avec le potentiel de fécondation obtenu sur l'oeuf de Hamster qui est représenté par une série de phases d'hyperpolarisations récurrentes de la membrane (Miazaki et Igusa, 1980). Les hyperpolarisations ont été attribuées à des augmentations transitoires corrélatives de la concentration cytosolique en calcium (Igusa et Miazaki, 1983; Igusa et coll., 1983), provoquant une augmentation de la perméabilité au potassium (Meech, 1978). Il semble évident que les hyperpolarisations obtenues sur les ovocytes prématures de *Homarus gammarus* par

effet de l'ionophore A 23 187 relèvent du même mécanisme. L'hyperpolarisation de la membrane de l'ovocyte de Homard n'est persistante qu'en présence de l'ionophore. Ceci est probablement due au fait que l'activation de l'oeuf des Crustacés Décapodes reptantia peut nécessiter une augmentation importante du calcium intra-ovocytaire ( Jaffe, 1983) qui n'est assurée sur les ovocytes prématures de Homard qu'avec une augmentation conséquente de la perméabilité au calcium sous l'effet de l'ionophore. Une différence de sensibilité du système conditionnant la perméabilité au potassium sous l'influence du calcium n'est pas à exclure pour expliquer la différence de réversibilité de l'effet de l'ionophore sur les deux types d'ovocytes prématures expérimentés. L'absence d'effet de l'ionophore sur les ovocytes immatures n'est pas étonnante dans la mesure où on peut raisonnablement supposer que la perméabilité de la membrane au potassium est déjà maximale, pour ces ovocytes.

De plus, les résultats cytologiques négatifs quant à la réaction corticale, pour des ovocytes soumis à l'action activante de l'ionophore A 23 187, prouvent clairement que dans ce cas le phénomène n'est que membranaire sur un plan électrophysiologique. Le cortex de l'ovocyte prémature n'est donc pas encore préparé à l'enchaînement des événements propres à la fécondation et notamment à la réaction corticale.

#### Le mécanisme d'attache de l'"oeuf" pondu:

En ce qui concerne ce mécanisme d'attache, il est bon de souligner la présence d'une substance additionnelle, à la superficie de l'enveloppe 1a, qui de plus n'a pas été observée sur les "oeufs" pondus de Brachyours. Cette substance pourrait participer au mécanisme d'attache de l'extrémité du funicule à la soie ovigère, soit directement comme matériel adhésif comme cela a été envisagé pour de nombreuses espèces de Crustacés Reptantia ( voir revue dans : Goudeau et Lachaise, 1983), soit comme agent modifiant la structure de l'enveloppe vitelline 1a. Cette couche superficielle additionnelle pourrait être aussi interprétée comme résultant d'une modification biochimique de la partie la plus superficielle de l'enveloppe 1a. Ce phénomène probablement initié par l'environnement ionique de l'eau de mer lors de la ponte, est actuellement en cours d'étude.

D'autre part, il est à souligner qu'il existe une profonde modification structurale des enveloppes vitellines 1a et 1b entourant l'"oeuf" pondu et constituant le funicule, par rapport à l'aspect que fournissent ces enveloppes autour de l'ovocyte au niveau ovarien ( Talbot, 1981). Ces modifications pourraient être corrélatives d'un gain en élasticité permettant la formation du funicule. Si l'environnement ionique peut modifier l'enveloppe externe 1a, en revanche il est évident que l'agent modifiant la structure de l'enveloppe interne 1b doit vraisemblablement être originaire de l'ovocyte. Cette origine a été établie pour le modèle Brachyours dont l'agent modifiant la structure de l'enveloppe 1b est le premier matériel rejeté lors de la réaction corticale à la fécondation.

En conclusion, sur la base de ces observations anatomiques relatives au funicule d'un "oeuf" pondu de Macroure, qui complètent les résultats acquis précédemment à l'égard du funicule de l'"oeuf" d'un Brachyours ( Goudeau et Lachaise, 1983) on peut supposer qu'il s'agit d'un agencement structural généralisable à tous les "oeufs" pondus de Décapodes Reptantia.

#### Ecdystéroïdes et enveloppes embryonnaires chez l'embryon de Homarus gammarus

Au vue des résultats concernant les enveloppes embryonnaires de Homard, on est tenté d'établir une corrélation entre les phases sécrétoires de ces enveloppes et les différentes étapes de ce développement embryonnaire condensé (Fig.24). En effet ce développement comprend différentes phases décrites par Bumpus ( 1891) pour Homarus americanus, qualifiées de "nauplius", "metanauplius", "protozoé", "zoé", l'éclosion s'effectuant au stade de



la première mysis. Ces stades en effet, bien qu'embryonnaires, présentent néanmoins une analogie anatomique évidente avec ceux du développement post-embryonnaire des Décapodes Pénaeïdés (Held, 1938).

On serait également tenté, compte-tenu de la présence de ponastérone A dans les embryons, de penser que cet ecdystéroïde puisse intervenir dans le déclenchement de la sécrétion des enveloppes embryonnaires du Homard.

OVAIRE ↓	MER → oeufs attachés aux soies ovigères ♀					
	fécondation Réac. Corticale Ponte Attache des Oeufs		Stades du développement embryonnaire condensé = Phases intraovulaires			
Ovocyte mûré	Oeuf fécondé	"Nauplius"	"Metanauplius"	"Protozoé"	"Zoé"	Mysis
Enveloppe 1a+1b	Capsule Embryonnaire = Envelop. 2	Envelop. 3	Envelop. 4	Envelop. 5	Envelop. 6	Cuticule de la 1 <sup>ère</sup> mysis = Envelop. 7

24

Fig. 24 - Tableau récapitulatif relatif aux différents stades embryonnaires, et aux enveloppes embryonnaires sécrétées successivement par l'embryon de Homarus gammarus (L.).

- BROWN G.G., 1966- Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod Callinectes sapidus. J. Ultrastruct. Res., 14, p. 425-440.
- BUMPUS H.C., 1891- The embryology of the American lobster. J. Morph., 5, p. 215-262.
- CUTHBERTSON K.S., WHITTINGHAM D.G., COBBOLD P.H., 1981- Free  $Ca^{2+}$  Increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature (lond.) 294, p. 754-755.
- CHEUNG T.S., 1966- The development of egg-membranes and egg attachment in the shore crab Carcinus maenas, and some related Decapods. J. mar. biol. Ass. U.K., 46, p. 373-400.
- GOUDEAU M. et LACHAISE F., 1980a- Fine structure and secretion of the capsule enclosing the embryo in a crab (Carcinus maenas (L.)). Tissue & Cell 12, p. 287-308.
- GOUDEAU M. et LACHAISE F., 1980 b - 'Endogenous yolk' as the precursor of a possible fertilization envelope in a crab (Carcinus maenas) Tissue & Cell, 12, p. 503-512.
- GOUDEAU M., 1982a - Fertilization in a crab: I. Early events in the ovary and cytological aspects of the acrosome reaction and gamete contacts. Tissue & Cell, 14, p. 97-111.
- GOUDEAU M., 1982b - Cortical reaction and fertilization envelope setting in Carcinus maenas (L.), Crustacea Decapoda. XV th EDBO International embryological conference. Strasbourg (France).
- GOUDEAU M; et BECKER J., 1982- Fertilization in a crab. II. Cytological aspects of the cortical reaction and fertilization envelope elaboration. Tissue & Cell, 14, p. 273-282.
- GOUDEAU M. et LACHAISE F., 1983- Structure of the egg funiculus and deposition of embryonic envelopes in a crab. Tissue & Cell, 15, p. 47 - 62.
- HAGIWARA S. et JAFFE L.A., 1979- Electrical properties of egg cell membrane. Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 8, p. 335-416.
- HELD J.H., 1938- La reproduction chez les Crustacés Décapodes de la famille des Pénéides. Ann.Inst.Oceanogr., 18, p.31-206.
- HINSHAW G.W., 1971- Penetration of the oocyte envelope by spermatozoa in the spider crab. J.Ultrastruct.Res., 35, p.86-97.
- IGUSA Y. et MIAZAKI S.I., 1983- Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. J.Physiol., 340, p. 611-632.
- IGUSA Y., MIAZAKI S.I. et YAMASHITA n., 1983- Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. J. Physiol. 340, p. 633-647.
- JAFFE L.F., 1983- Source of calcium in egg activation. Dev. Biol. , 99, p. 265-276.
- MEECH R.W., 1978- Calcium-dependant potassium activation in nervous tissues. Ann.Rev. Biophys & Bioeng. , 7, p. 1-18.
- MYAZAKI S.I. et IGUSA Y. , 1980-The fertilization potential consists of recurring hyperpolarization in golden Hamster eggs. Nature (Lond)
- REYNOLDS E.S., 1963- The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. , 17, p. 208-211.
- RIDGWAY E.B., GILKEY J.C. et JAFFE L.F., 1977- Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. Proc. Natl. Acad. sci. USA , 74, p.623-627.
- STEINHARDT R.A. , ZUCKER R. et SCHATTEN G. , 1977- Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. Dev. Biol. , 58, p. 185-196.
- STEINHARDT R.A. et EPEL D., 1974- Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Nat. Acad. sci. USA, 71, p. 1915-1919.
- TALBOT P., 1981- The ovary of the Lobster, Homarus americanus II. Structure of the mature follicle and origin of the chorion. J. Ultrastruct. Res. 76, p. 249-262.

Une ECLOSERIE A HOMARD ET LE REPEUPLEMENT  
BILAN, POINTS DE BLOCAGE ET PERSPECTIVES

Joël LOREC

Association Pêche et Aquaculture du Sud Bretagne  
Viviers du Pérelle 56270 Ploemeur

A l'initiative des marins pêcheurs, les expériences de repeuplement homard ont commencées en France en 1972 ; ceux-ci prenant à contre-pied les organismes scientifiques. Trois écloséries ont alors été créées: Houat et Yeu en 1972, Sein en 1975.

La première étape du travail a été de maîtriser la production en éclosérie (élevage larvaire et post-larvaire); les problèmes rencontrés, tant techniques que biologiques, ont souvent été résolus de façon très pragmatique. Cependant dès le début de l'expérience il s'est posé la question du devenir et de l'estimation du taux de survie des animaux immergés afin d'essayer d'appréhender l'intérêt économique de l'opération; Mais imaginer un suivi des animaux immergés n'a pas été chose aisée (difficulté du marquage). Depuis 1977 on s'est orienté de l'immersion pure et simple des post-larves (stade V) vers la production de juvéniles de 1 an, ceux-ci donnant plus de possibilité de marquage et de suivi dans le milieu naturel.

En Juin 1983, après consultation des différents partenaires (scientifiques et professionnels), a été élaboré un programme national de recherche sur le homard soutenu par le secrétariat d'état à la mer; les écloséries étant considérées comme des outils de production au service de la recherche.

---

MOTS-CLES: Crustacés, Homard, Ecloséries, Aquaculture.

KEY WORDS: Crustacea, Lobster, Hatcheries, Aquaculture.



Dans toute opération de repeuplement, il faut bien distinguer deux phases:- La phase d'élevage intensif : c'est l'écloserie et la production des "alevins".

- La phase libre : c'est l'immersion dans le milieu naturel( élevage en extensif).

Nous allons aborder successivement les deux phases en essayant pour chacune d'elle d'analyser la démarche qui a été faite de dresser un bilan des acquis tout en essayant de mettre en évidence les points de blocage .

#### - 1- L'ELEVAGE INTENSIF : L'ECLOSERIE

A ce niveau il faut distinguer deux étapes bien distinctes:

- l'élevage larvaire qui se fait de façon communautaire
- l'élevage des juvéniles qui se fait en cases individuelles.

##### . 11 - L'élevage larvaire :

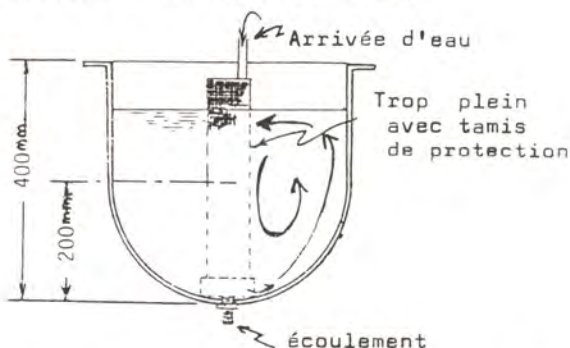
La larve de homard éclos au stade mysis; c'est le stade I, il y aura ensuite trois mues successives pour aboutir au stade IV ou post-larve.

##### . 111- Technique d'élevage :

Pour essayer de combiner les impératifs de l'élevage larvaire (lutte contre le cannibalisme, nourriture, ...etc..), différentes méthodes ont été testées .

La technique initiale était l'élevage en grand bassin de 50m<sup>3</sup>, directement inspirée des méthodes japonaises pour la crevette. Cette technique prévaut toujours à l'écloserie de l'île d'Yeu, tandis qu'à l'écloserie de Houat on s'est orienté vers les élevages larvaires en petits volumes:

- Bacs de 40 litres, mise au point par J. Hughes aux Etats Unis et fonctionnant en circuit fermé:

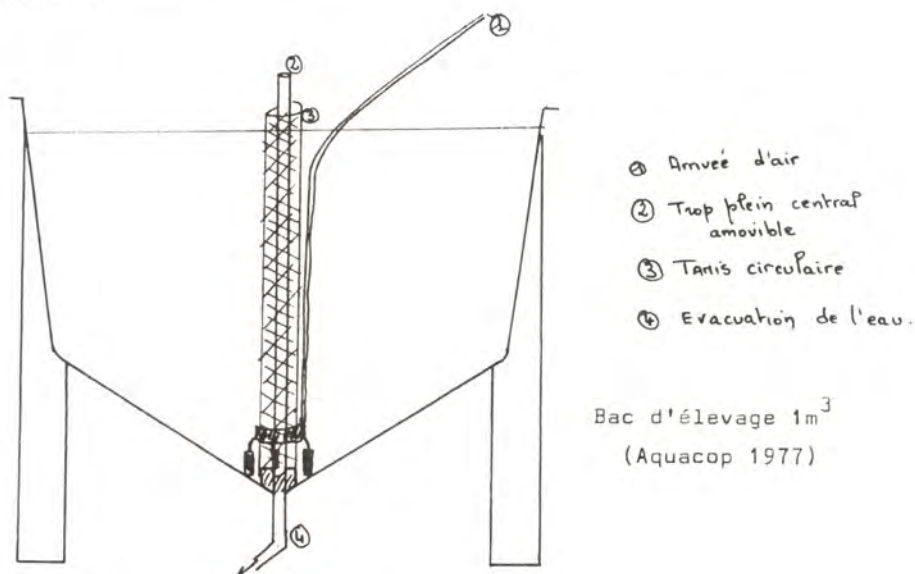


Bac d'élevage larvaire ( Hughes et al. 1974)

- Bacs de 800 litres à 1m<sup>3</sup>, cylindro-coniques, du même type que ceux utilisés par le Centre Océanologique du Pacifique pour l'élevage larvaire de la crevette Macrobrachium .

Cette dernière technique est celle qui est maintenant retenue à l'écloserie de Houat, car elle donne les taux de survie

les plus réguliers ( 40%) et des post-larves d'une très bonne vitalité.



Tout au long de l'élevage larvaire qui dure de 13 à 15 jours, la température est maintenue entre 20 et 22 C., la concentration d'oxygène voisine de la saturation, tandis que la qualité de l'eau est maintenue par un changement quotidien de 80% du volume.

. 112- Résultats obtenus :

Les taux de survie obtenus au niveau des élevages larvaires oscillent autour de 35%. La capacité actuelle de production de l'écloserie de Houat est de 100 à 150.000 post-larves stade IV par saison de production. La production moyenne annuelle depuis 1972 se situe à 90.000 post-larves; celle-ci oscillant de 30.000 une mauvaise année à 150.000 une bonne année.

. 113- Problèmes rencontrés :

Ils sont essentiellement de trois ordres :

. 1131- La quantité de larves disponibles :

Les femelles oeuvées nous sont apportées par les marins pêcheurs et il est très difficile d'étaler la période d'émission des larves (dégrainage); ceci pose souvent des problèmes pratiques de sur ou sous utilisation des bacs.

Il serait intéressant d'arriver à un étalement contrôlé du dégrainage, mais pour cela il faudrait maîtriser le cycle complet de la reproduction, ce qui pose encore de nombreux problèmes: maintien des oeufs sous l'abdomen de la femelle

. maintien d'un stock de géniteurs suffisamment important pour le fonctionnement de l'écloserie ( il faut 300 Kgs. de géniteurs pour une saison).

. 1132- La nourriture :

Les larves de homard sont carnivores, aussi l'Artemia salina constitue la base de l'alimentation durant les élevages larvaires.

La nourriture est distribuée sous deux formes :

. Nourriture vivante : ce sont des nauplii d'artémia pour les jeunes stades puis ceux ci sont remplacés, au fur et à mesure de la croissance des larves, par des artémias juvéniles puis adultes.

. nourriture morte : Artémia adultes congelés, chair de crabe broyée, krill....etc....

Il a cependant toujours été difficile de déterminer la dose exacte de nourriture nécessaire car, quelle que soit la technique d'élevage utilisée, il se produit toujours une perte importante.

Le problème de la nourriture est toujours un problème crucial au niveau des élevages ; pour une écloserie de homard, il nécessite de maîtriser parfaitement l'élevage d'Artemia salina jusqu'à la taille adulte.

. 1133 - Le cannibalisme :

Les larves de homard sont très voraces et elles se blessent souvent entre elles. Il faut donc maintenir une agitation permanente et homogène du volume d'élevage pour éviter toute possibilité d'agglutination des larves. Celle-ci est obtenue soit par une circulation d'eau continue (bacs de Hughes) soit à l'aide de l'aération (Bacs cylindro-coniques).

Mise à part les problèmes pathologiques, où il subsiste de nombreuses inconnues, il ne semble pas qu'il y ait de réels points de blocage au niveau des élevages larvaires; la principale difficulté étant la dépendance pour l'obtention de bons rendements, de la disponibilité d'Artemia salina vivants de différentes tailles (Nauplii, juvéniles, adultes).

. 12 - L'élevage des juvéniles :

En 1977 il sembla nécessaire pour progresser dans l'expérience du repeuplement d'immerger des animaux de taille supérieure; ceux-ci permettant un meilleur suivi en mer et d'affiner les techniques d'immersion dans le milieu naturel. On a donc commencé l'élevage du homard jusqu'à l'âge de 1 an.

. 121 - L'élevage individuel:

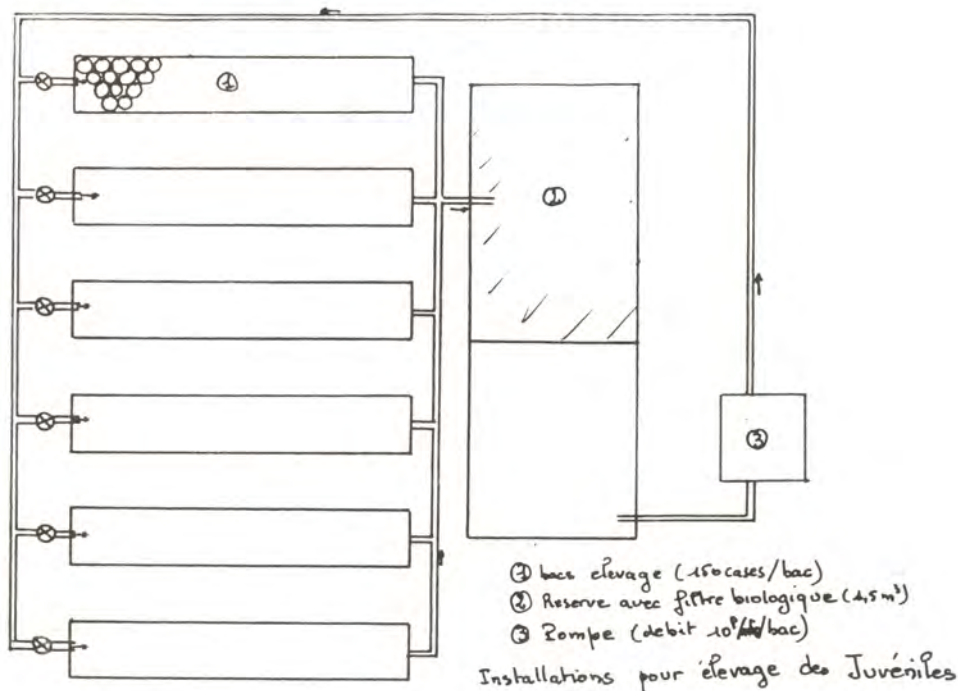
. 1211 - Technique d'élevage :

L'élevage un par un est la technique adoptée actuellement par les trois écloseries françaises. Chaque homard est isolé dès le stade IV dans une case individuelle (à l'écloserie de Houat celles-ci sont circulaires et ont un diamètre de 8 cm.). Ces cases sont disposées dans des bacs rectangulaires fonctionnant en circuit fermé ; la température étant maintenue à 18°C.

La nourriture, distribuée tous les seconds jours, est constituée dans les premiers stades d'Artémia congelé et cette nourriture est souvent maintenue jusqu'à l'âge de 1 an pour des raisons de commodité et de disponibilité. La ration alimentaire est de l'ordre de 3% du poids frais de l'animal.

Des essais ont été effectués avec des mollusques et de la nourriture vivante (Talitres, gammares....), mais cela pose des problèmes de maintenance des installations (déchets).





La mise au point d'un aliment artificiel présente un intérêt certain, surtout dans le but de diminuer les coûts de nourriture et d'automatiser sa distribution. Une expérience a été menée à l'écloserie de Houat deux années de suite, avec le suivi du laboratoire du Professeur Ceccaldi; elle a abouti à la mise au point d'un granulé qui donne un taux de survie et une courbe de croissance identique à l'Artémia congelé utilisé comme aliment de référence. On assiste cependant à une dépigmentation de l'animal.

• 1212 - Résultats :

La capacité de production actuelle de l'écloserie de Houat est de 15.000 juvéniles de 1 an; la production ayant été en progression constante depuis 1977 (1977 : 1.250 juv., 1983: 10.000)

Le taux de survie au bout d'un an d'élevage se situe à 75%, les animaux étant au stade XII ou XIII ( 8 mues) et mesurant 17 mm. de longueur céphalothoracique.

• 1213 - Problèmes rencontrés:

• 12131 - Pathologie :

Ce problème a déjà été abordé pour les élevages larvaires, et l'on est toujours assez dépourvus devant les phénomènes épidémiques entraînant de fortes mortalités ( mise à part la Gaffkémie)

Une collaboration avec le laboratoire de pathologie des invertébrés de Montpellier devrait nous permettre d'avancer dans ce domaine.

. 12132- La croissance :

Celle-ci dépend de très nombreux facteurs: température, nourriture, physiologie, environnement-comportement...etc. Si la température et la nutrition sont bien maîtrisées, on connaît mal la physiologie et les relations avec l'environnement (dimension des cases, abris...).

. 12133- La morphologie :

les homards élevés à la nourriture morte (artémias congelés, granulés) ne présentent pas de différenciation des pinces entre elles : celles-ci restent toutes les deux "coupantes". La différenciation peut être obtenue en donnant de la nourriture vivante( celle-ci s'obtient en 2 ou 3 mues).

. 122 - L'élevage communautaire :

Plusieurs essais ont été tentés et les résultats sont très encourageants quant à la croissance, les coûts de revient et le comportement des animaux liés aux problèmes d'adaptation à la vie en milieu ouvert. Cependant les taux de survie obtenus après 1 an d'élevage sont encore assez médiocres ( 20%).

Il semble très intéressant d'approfondir cette technique d'élevage et de gros progrès pourraient être obtenus à partir des études sur l'éthologie des jeunes homards ( relations inter-individuelles) et sur leurs habitats.

-2- La PHASE LIBRE : IMMERSION DANS LE MILIEU NATUREL

Les immersions se sont faites souvent au hasard des demandes politiques et professionnelles sans qu'aucun véritable programme ne soit établi. Ceci a pour conséquence la faiblesse des progrès réalisés à ce niveau durant ces dix dernières années.

Malgré plusieurs tentatives, aucune mise en évidence de l'impact des immersions de homards dans le milieu naturel n'a pu être faite.

. 21 - Immersion de post-larves .

Les immersions de stades IV et V furent les seules pratiquées jusqu'en 1977.

Un essai de détermination de l'impact de ces immersions sur le recrutement a été tenté par le biais des fiches de pêche. Celles-ci sont remplies régulièrement par les marins pêcheurs de Houat depuis 1973. Il n'a pas été possible de mettre en évidence l'impact de l'écloserie, celui ci étant masqué par les fluctuations du recrutement naturel.

. 22 - Immersion de juvéniles :

C'est en voyant cette impossibilité d'analyse par les fiches de pêche que l'on a commencé à Houat l'élevage des juvéniles, seuls animaux susceptibles d'être marqués.

Cependant l'immersion d'animaux plus âgés nous a amené à nous interroger sur les problèmes d'éco-éthologie des jeunes homards et leur abri; ceci afin d'essayer de leur donner les meilleures chances de survie dans le milieu naturel.

Ces études actuellement en cours et devant être poursuivies durant les cinq années à venir sont menées en liaison avec le laboratoire d'éthologie de l'université de Rennes ( Professeur J.Y.Gautier.).

Actuellement ces immersions s'effectuent en plongée, chaque animal étant disposé dans un abri individuel.

Différents essais de marquage ont été effectués et la méthode maintenant retenue est un marquage magnétique interne.

Cependant ce procédé de marquage exigeant un contrôle très strict de la pêche pour la récupération des marques, il n'était pas possible de commencer l'opération avant que ne soit mis en place un véritable programme de recherche sur le homard.

### - 3- LE BILAN, LES POINTS DE BLOCAGE ET LES PERSPECTIVES.

#### PROGRAMME PLURI-ANNUEL DE RECHERCHE SUR LE HOMARD

Jusqu'ici les trois écloseries travaillaient en ordre dispersé, ce qui a été néfaste pour leur efficacité.

C'est pourquoi en 1982 et 1983 il y a eu une concertation des différents partenaires, soutenue par le secrétariat d'état à la mer et coordonnée par le G.S.G. ( Groupe de support à la gestion des stocks). Un premier bilan des points de blocage fut dressé:

Points de Blocage	Opérations et études nécessaires
MECONNAISSANCE DU STOCK	Dynamique de population : statistiques, échantillonnages...etc..
ESTIMATION DU TAUX DE SURVIE DES ANIMAUX IMMERGÉS	- Augmentation massive d'une classe d'âge - Marquage phénotypique - Marquage magnétique
ECO-ETHOLOGIE du Jeune Homard	- Ecologie des larves et juvéniles .localisation des prérecrues .Sites d'immersion - Ethologie : -taille et densité d'immersion - Phase d'élevage transitoire -Abris artificiels.....etc..
COUT DE PRODUCTION	- Alimentation artificielle - Eau thermorégulée - Structures d'élevage( individuel-communautaire) - Pathologie, Physiologie....etc...



- La méconnaissance du stock :

Il n'existe que très peu de données sur les pêches de homards (difficulté des statistiques liée au mode de commercialisation). De nombreuses questions restent encore posées : Y-a-t-il vraiment une surexploitation ? Existe t'il un ou plusieurs stocks de homards ( Atlantique, Manche)? Comment s'effectue le recrutement sur les pêcheries?.

- Estimation des taux de survie :

Pour les opérations de repeuplement Homard, il a été impossible de déterminer la part prise par les animaux provenant des écloseries dans les captures commerciales; Or cette estimation est primordiale. Pour obtenir celle-ci, une seule méthode possible : le marquage, phénotypique (difficile) ou magnétique. Celui-ci devrait permettre une estimation du taux de survie des animaux immergés, tout en fournissant de précieux renseignements sur la croissance, migration..etc...

- Eco-éthologie des jeunes homards :

Si l'on sait actuellement où se situent les homards de taille commerciale, on ignore quasiment tout des exigences écologiques des jeunes homards. Des études sur celles-ci sont donc primordiales, à la fois pour la gestion des stocks ( prérecrues, nurseries...) et pour les opérations de repeuplement.

De même des études sur l'éthologie des jeunes homards devraient nous permettre de déterminer quelles sont les conditions optimales pour réaliser ces opérations ( taille, abri, rusticité des animaux...etc...) afin d'obtenir le meilleur taux de survie possible.

- Coût de production:

Celui-ci intervient dans la rentabilité économique des opérations de repeuplement, d'une part, et de l'élevage intensif jusqu'à la taille marchande d'autre part.

Actuellement celui-ci se situe à 243 francs la post-larve et 10-12 francs le juvénile de 1 an, mais moyennant des études approfondies sur la technologie d'élevage, la pathologie, la nutrition...etc..., on peut arriver à réduire considérablement ces coûts.

A partir de ces constatations et de la volonté des marins-pêcheurs pour une poursuite des opérations de repeuplement en réorientant les recherches vers la démonstration de son efficacité, un programme national pluri-annuel de recherches sur le homard a été établi.

Celui-ci comprend une douzaine d'opérations, mais il s'agit bien d'un programme de recherche et non plus de prédéveloppement.

Quatre opérations prioritaires ont été retenues et feront l'objet d'un financement conjoint Etat-Région ; ce sont:

- . Gestion des Stocks ( IFREMER)
- . Bilan des dix dernières années d'élevage
- . Marquage et suivi des juvéniles dans le milieu naturel
- . Etudes sur l'écologie et l'éthologie des jeunes homards.

L'effort de recherche devant se porter dans les prochaines années, plus sur l'aquaculture extensive qu'intensive; La production des homards en écloserie étant considéré comme le soutien, nécessaire à ces recherches.

CONSOMMATION D'OXYGENE DE LA CREVETTE JAPONAISE, Penaeus japonicus,  
EN FONCTION DE L'OXYGENATION DU MILIEU : EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE  
L'ACCLIMATATION A DES CONDITIONS AMBIANTES HYPOXIQUES.

J.-P. TRUCHOT et A. JOUVE-DUHAMEL  
(1) Laboratoire de Physiologie des Etres marins, Institut  
Océanographique, 195 rue Saint Jacques, 75005 Paris, France.

R E S U M E

La consommation d'oxygène de crevettes juvéniles, Penaeus japonicus, a été mesurée en phase diurne à 4 températures (23, 26, 30 et 33 °C) et à différents niveaux d'oxygénation de l'eau. Pour des animaux enfouis dans le sable et pratiquement inactifs, l'intensité du métabolisme respiratoire est maintenue approximativement constante en hypoxie, au-dessus d'une pression critique d'oxygène d'environ 30-40 Torr. L'analyse des données selon un modèle hyperbolique indique que ce pouvoir de régulation métabolique présente un optimum thermique aux environs de 26-30 °C. Les animaux acclimatés à 20 °C pendant 1-2 semaines à des conditions modérément hypoxiques (P<sub>O<sub>2</sub></sub> 50-55 Torr) montrent un renforcement de cette capacité de régulation de la consommation d'oxygène.

A B S T R A C T

Oxygen consumption of juvenile prawns, Penaeus japonicus, was measured during the day at 4 temperatures (23, 26, 30 and 33 °C) and at various oxygenation levels. For inactive prawns burrowed into sand, respiratory metabolism was maintained almost constant in hypoxia above a critical oxygen pressure of about 30-40 Torr. Data analysis according to an hyperbolic model indicates that the capacity for metabolic regulation was optimal between 26 and 30 °C. Prawns acclimated 1-2 weeks at 20 °C in moderate hypoxia (P<sub>O<sub>2</sub></sub> around 50-55 Torr) showed a reinforced regulation of oxygen consumption when compared to normoxic controls.

M O T S - C L E S : Métabolisme respiratoire, Hypoxie, Température, Crevettes Pénéaeides.

K E Y W O R D S : Respiratory metabolism, Hypoxia, Temperature, Penaeid Prawns.

(1) E.R.A. CNRS n° 947 : "Fonction respiratoire chez les animaux aquatiques"



## INTRODUCTION

L'étude du métabolisme respiratoire et des adaptations de cette fonction aux conditions du milieu présente des intérêts multiples en ce qui concerne les espèces susceptibles de faire l'objet d'une exploitation en aquaculture marine. D'une part, la mesure de la consommation d'oxygène apporte une estimation indirecte mais précise et commode de la dépense énergétique de maintenance et elle constitue donc un paramètre indispensable à l'établissement d'un bilan énergétique. En particulier, la connaissance des variations de la part d'énergie dissipée par la respiration en fonction de divers facteurs internes et externes est essentielle pour évaluer les conditions d'exploitation dans lesquelles le rendement optimum de l'élevage pourra être atteint. D'autre part, le niveau ambiant d'oxygène disponible peut souvent devenir un facteur limitant du métabolisme en milieu aquatique, du fait de la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau. Dans les enceintes d'élevage intensif, une charge élevée d'animaux ainsi que des processus actifs de nitrification des déchets azotés ou des restes d'aliments peuvent aisément provoquer une déplétion de l'oxygène ambiant. Dans de nombreux sites potentiellement utilisables pour des exploitations extensives, une productivité biologique élevée est la cause de fluctuations nyctémérales et saisonnières considérables de l'oxygénation des eaux.

De ce fait, la tolérance à l'hypoxie et les réponses physiologiques adaptatives des espèces exploitables sont importantes à connaître pour évaluer au mieux les conditions (charges en animaux, qualité des eaux, etc..) dans lesquelles l'élevage pourra être conduit de façon satisfaisante. Ces informations sont de toute évidence particulièrement cruciales pour des espèces dont la croissance requiert des températures élevées. En effet, la solubilité des gaz dans l'eau étant une fonction inverse de la température, la disponibilité de l'oxygène diminue aux températures élevées alors même que le métabolisme énergétique et donc la demande en oxygène sont augmentés. Dans ces conditions de plus, les risques d'eutrophisation et donc de stress hypoxiques sont particulièrement élevés.

La Crevette japonaise, Penaeus japonicus, est une espèce d'eaux chaudes à croissance rapide, ce qui en fait un sujet d'élevage intéressant. Alors que de nombreux travaux ont été consacrés à la nutrition et à la reproduction de cette espèce, nos connaissances sont extrêmement limitées en ce qui concerne son métabolisme respiratoire (Egusa, 1961 ; Kulkarni et Joshi, 1980) ainsi que les variations de celui-ci en fonction des facteurs ambiants. Les résultats de Kulkarni et Joshi (1980) suggèrent en particulier que la consommation d'oxygène de P. japonicus s'abaisse proportionnellement à la diminution de l'oxygène ambiant. S'il en est ainsi, la tolérance à l'hypoxie de cette espèce pourrait être très limitée, en particulier aux températures élevées favorables à la croissance.

Dans ce travail, nous avons étudié, à 4 températures différentes, la relation existant entre la consommation d'oxygène de P. japonicus et la concentration d'oxygène dissous dans l'eau. Par ailleurs, nous avons aussi testé la tolérance de cette espèce à l'hypoxie ambiante lors d'acclimations à long terme.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Crevettes utilisées sont des juvéniles, de poids frais 1 à 6 g, provenant des élevages du Centre Océanologique de Bretagne. Elles ont été maintenues au laboratoire en eau de mer naturelle (salinité 35 ‰) à 22-23 °C dans un système d'élevage en circuit fermé. Les bacs utilisés comportent un



fond de sable sur lequel l'eau est recirculée à l'aide d'une pompe qui la ramène à une colonne centrale où elle est équilibrée au mélange gazeux voulu, en général de l'air ambiant. Les Crevettes, introduites à raison de 30-60 individus par m<sup>2</sup> de surface de sable, ont été nourries de moules en général une fois par jour.

La plupart des mesures ont été réalisées en conditions d'oxygénation pratiquement constantes à l'aide d'un dispositif fonctionnant en circuit ouvert (fig. 1). L'animal est enfermé dans un respiromètre muni d'un fond de sable où l'eau est brassée en permanence par agitation magnétique. Une électrode à oxygène (YSI 5739 ou 5750) commande, par l'intermédiaire d'un système à point de consigne réglable et d'une électrovanne, l'admission discontinue dans le respiromètre d'une eau équilibrée dans une colonne thermostatée à une valeur de P<sub>O<sub>2</sub></sub> supérieure au point de consigne. Cette admission d'eau est automatiquement stoppée dès que la valeur consigne est à nouveau atteinte. Des réglages appropriés du débit d'entrée et de la différence de P<sub>O<sub>2</sub></sub> entre la colonne et le point de consigne permettent de limiter les oscillations de P<sub>O<sub>2</sub></sub> mesurées par l'électrode à un intervalle en général inférieur à 1 Torr, de sorte que les mesures se déroulent à P<sub>O<sub>2</sub></sub> pratiquement constante sur des durées d'environ 0,5 h.

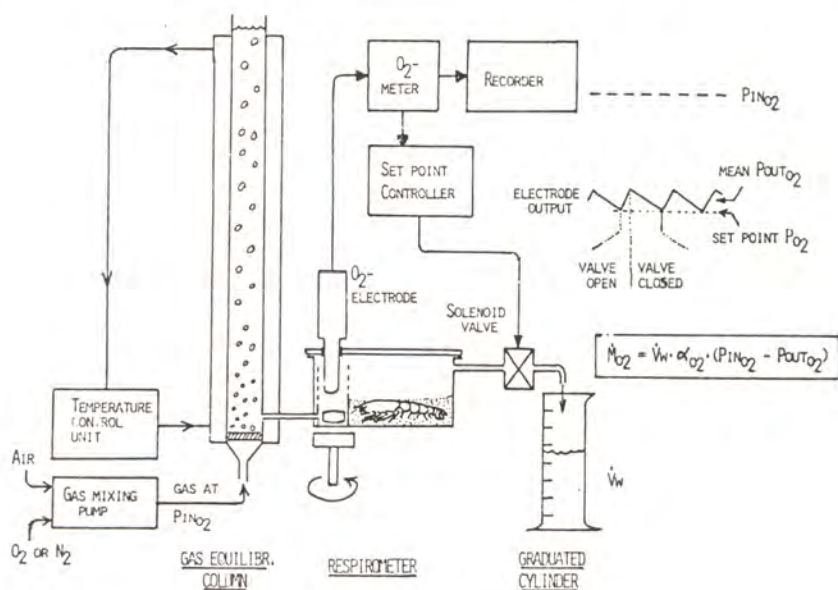


Figure 1.- Schéma du dispositif en circuit ouvert utilisé pour la mesure de la consommation d'oxygène dans différentes conditions d'oxygénation ambiante. L'abaissement de P<sub>O<sub>2</sub></sub> produit dans le respiromètre par la consommation d'oxygène de l'animal est automatiquement compensé par l'admission d'eau à P<sub>O<sub>2</sub></sub>, P<sub>inO<sub>2</sub></sub>, supérieure à une valeur de consigne réglable, grâce à une électrovanne pilotée par le signal de l'électrode à oxygène. Les fluctuations de P<sub>O<sub>2</sub></sub> dans le respiromètre sont en général inférieures à 1 Torr. La consommation d'oxygène, M<sub>O<sub>2</sub></sub>, mesurée à P<sub>O<sub>2</sub></sub> pratiquement constante, est obtenue à partir du débit d'eau,  $\dot{V}_w$  et des pressions partielles d'oxygène à l'entrée (P<sub>inO<sub>2</sub></sub>) et à la sortie (P<sub>outO<sub>2</sub></sub> très voisin du point de consigne).

La consommation d'oxygène, M<sub>O<sub>2</sub></sub>, est calculée en faisant le produit du débit d'eau admis dans le respiromètre par la différence de concentration d'oxygène

entre l'eau de la colonne et l'eau sortant du respiromètre, cette dernière étant pratiquement égale au point de consigne choisi. Pour obtenir la consommation propre de l'animal, il faut théoriquement déduire celle résultant du montage lui-même. Des tests répétés ont montré que cette dernière était négligeable dans les conditions utilisées. L'étalonnage de l'électrode à oxygène est simplement réalisé à la valeur de  $P_{O_2}$  de la colonne en conditions de débit élevé et continu. Ces conditions sont également employées durant la période d'adaptation préalable de l'animal au dispositif expérimental.

Les mesures ont été faites pendant la journée sur des animaux enfouis au moins partiellement dans le sable et n'ayant qu'une activité faible ou nulle. Des tests préliminaires ont montré que certaines précautions devaient être prises pour obtenir des valeurs représentatives du métabolisme normal de l'animal. En plus du substrat sableux mis à leur disposition, les crevettes étaient soustraites aux stimuli visuels ambiants et acclimatées en général une dizaine d'heures au dispositif expérimental avant toute mesure. De la sorte, on peut considérer que les valeurs obtenues se rapportent à un métabolisme de routine, après dissipation du stress expérimental, correspondant à celui prévalant en photophase du cycle nyctéméral.

## R E S U L T A T S

La consommation d'oxygène a été mesurée sur 4 lots de 8-11 crevettes respectivement à 23, 26, 30 et 33 °C, et, pour chaque animal, à 7 niveaux ambiants de  $P_{O_2}$  compris entre 155 et 10 Torr (soit respectivement 90-100 % et 6-7 % de la saturation atmosphérique). Les valeurs maximum mesurées en conditions normoxiques et corrigées de l'influence du poids (inégal dans les 4 lots) sont rapportées dans le Tableau I.

TABLEAU I.- Consommations d'oxygène,  $\dot{M}_{O_2}$ , mesurées en conditions normoxiques (valeurs moyennes et erreurs standard pour  $P_{O_2}$  supérieur à 80 Torr). Les valeurs rapportées dans la dernière ligne sont corrigées de l'influence du poids en admettant une relation allométrique où l'exposant du poids est de 0,75. Elles correspondent donc aux valeurs pour un animal fictif pesant 1 g.

Température (°C)	23	26	30	33
N	11	11	8	11
Poids frais (g)	1,84 ± 0,14	2,42 ± 0,30	4,30 ± 0,42	4,92 ± 0,34
$\dot{M}_{O_2}$ (μmol/h.g)	12,96 ± 0,94	10,20 ± 0,72	10,52 ± 0,67	12,53 ± 0,58
$\dot{M}_{O_2}/P^{-0,25}$	14,97 ± 1,03	12,51 ± 0,86	14,99 ± 0,89	18,55 ± 0,90

Ces valeurs montrent une influence relativement faible de la température sur le métabolisme dans l'intervalle considéré ( $Q_{10} = 1,24$  entre 23 et 33 °C ;  $Q_{10} = 1,76$  entre 26 et 33 °C).

La relation existant entre la consommation d'oxygène,  $\dot{M}_{O_2}$ , et la pression partielle d'oxygène ambiante,  $P_{O_2}$ , est représentée pour les 4 températures dans la figure 2. Les courbes  $\dot{M}_{O_2}/P_{O_2}$  ont sensiblement la même forme,  $\dot{M}_{O_2}$  étant relativement constant ou décroissant très peu entre  $P_{O_2} = 130-150$  Torr et une valeur critique  $P_C$  en dessous de laquelle  $\dot{M}_{O_2}$  diminue rapidement avec l'abaissement de  $P_{O_2}$ . Ceci témoigne d'un comportement "oxyrégulateur", divers mécanismes physiologiques permettant le maintien d'un métabolisme aérobie en hypoxie modérée.



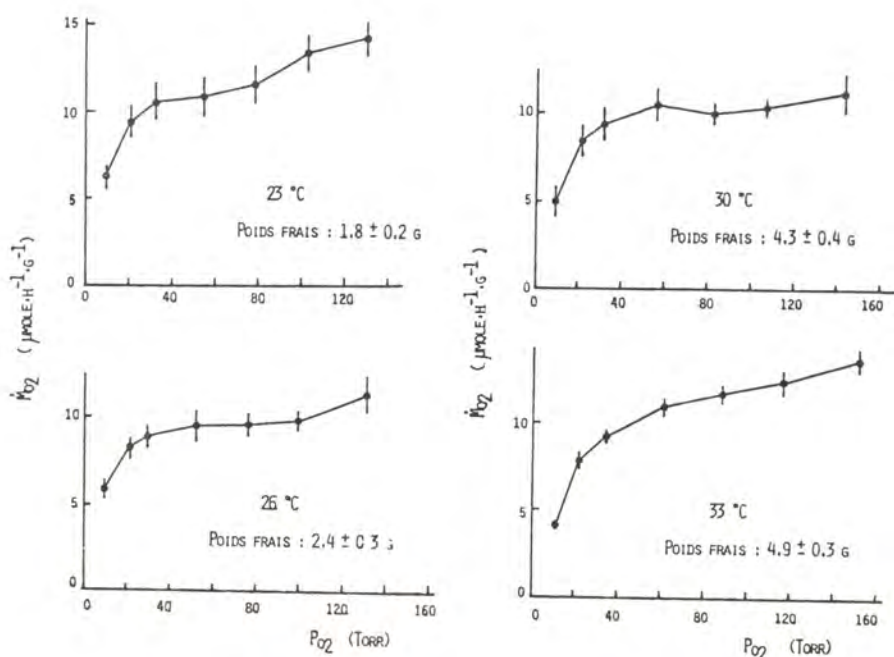


Figure 2.- Relation entre la consommation d'oxygène  $\dot{M}_{O_2}$  et la pression partielle d'oxygène  $P_{O_2}$  de l'eau ambiante à 4 températures chez la crevette *P. japonicus*. Chaque point correspond à la moyenne ( $\pm$  erreur standard) de mesures effectuées sur 8 à 11 animaux.

La valeur de  $P_C$ , difficile à définir avec précision, se situe au voisinage de 30-40 Torr.

L'évaluation de l'influence de la température sur ce "pouvoir de régulation métabolique" doit tenir compte de deux facteurs. D'une part, la demande métabolique d'oxygène des tissus dépend elle-même de la température et elle peut être assimilée à la valeur de  $\dot{M}_{O_2}$  maximale mesurée en normoxie,  $\dot{M}_{O_2}(\text{max})$ , correspondant à des conditions dans lesquelles l'oxygène disponible dans le milieu n'est pas limitant. L'influence de ce facteur peut être aisément prise en compte en exprimant les valeurs de  $\dot{M}_{O_2}$  en % du  $\dot{M}_{O_2}(\text{max})$ . D'autre part, le coefficient de solubilité de l'oxygène diminuant lorsque la température augmente, à une même valeur de  $P_{O_2}$  (ou de saturation en  $O_2$ ) correspondent des concentrations effectives d'oxygène disponibles dans l'eau différentes selon la température. En toute rigueur, le "pouvoir de régulation métabolique" doit donc être évalué en tenant compte des concentrations d' $O_2$ , et non des pressions partielles  $P_{O_2}$  ou des pourcentages de saturation de l'oxygène dans l'eau.

La figure 3 représente les relations entre  $\dot{M}_{O_2}$  (en % du max) et, d'une part, la concentration d' $O_2$  dissous,  $C_{O_2}$ , et, d'autre part, le pourcentage de saturation de l'eau en oxygène. Il apparaît nettement que, aux faibles concentrations d' $O_2$  ( $C_{O_2}$  inférieur à  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ou saturation inférieure à 30%), la consommation d' $O_2$  est maintenue à des valeurs plus élevées pour les températures de 26 et 30 °C que pour celles de 23 et 33 °C. Pour obtenir une évaluation plus précise de l'influence de la température, les données ont été ajustées à un modèle hyperbolique (Tang, 1933 ; Bayne, 1971 ; Taylor et Brand, 1975 ; Van Winkle et



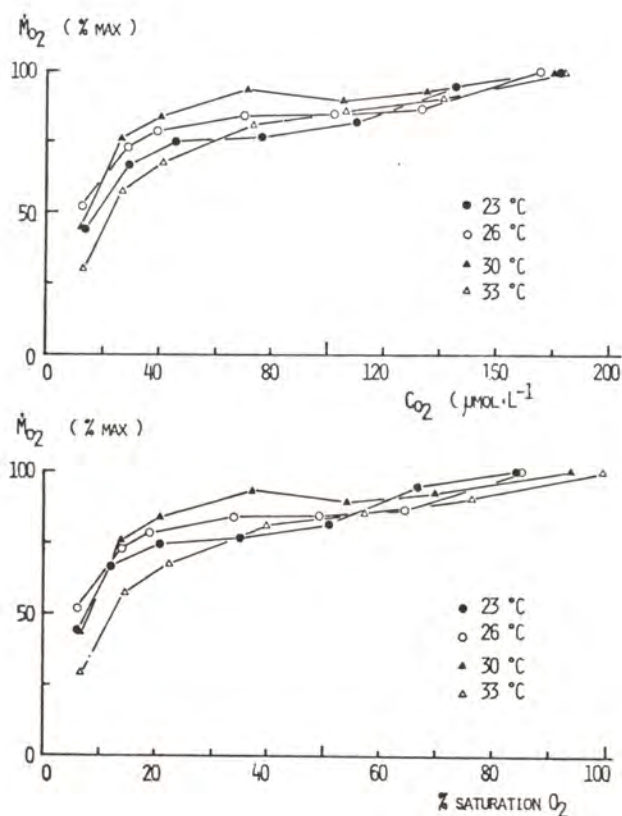


Figure 3.- Relation entre la consommation d'oxygène  $\dot{M}_{O_2}$  et, d'une part, la concentration d'oxygène  $C_{O_2}$ , d'autre part, le pourcentage de saturation d' $O_2$  dans l'eau, à 4 températures différentes chez la crevette *P. japonicus*. Les valeurs de  $\dot{M}_{O_2}$  ont été exprimées en % du maximum mesuré en normoxie. Seules les valeurs moyennes sont figurées.

Mangum, 1975 ; Bridges et Brand, 1980). Dans ce modèle, on considère que la consommation d'oxygène varie selon une cinétique michaélienne en fonction de la concentration ambiante d'oxygène assimilée à celle d'un substrat :

$$\dot{M}_{O_2} = \frac{\dot{M}_{O_2}(\max) \cdot C_{O_2}}{C_{O_2} + K_M}$$

où  $\dot{M}_{O_2}(\max)$  est la valeur de  $\dot{M}_{O_2}$  à concentration saturante d' $O_2$ , qui peut être assimilée à celle mesurée en conditions normoxiques ( $P_{O_2} = 150-155$  Torr ou 100% de saturation), et  $K_M$  représente la valeur de  $C_{O_2}$  pour laquelle  $\dot{M}_{O_2} = \dot{M}_{O_2}(\max)/2$ . La valeur de  $K_M$  est ainsi un index du pouvoir de régulation métabolique : plus  $K_M$  est faible, plus ce pouvoir de régulation est important.

L'expression ci-dessus peut être linéarisée sous la forme :

$$C_{O_2}/\dot{M}_{O_2} = K_2 \cdot C_{O_2} + K_1 \quad \text{avec } K_1 = K_M/\dot{M}_{O_2}(\max) \quad \text{et } K_2 = 1/\dot{M}_{O_2}(\max)$$

le rapport  $K_1/K_2$  étant égal à  $K_M$ .

L'ajustement des données à cette expression est acceptable, les coefficients de corrélation linéaire étant supérieurs à 0,99. Le Tableau II montre que les valeurs de  $K_M = K_1/K_2$  sont les plus faibles à 26 et 30 °C, ceci indiquant que le pouvoir de régulation métabolique est plus marqué à ces températures. Il est plus faible par contre aussi bien à 23 qu'à 33 °C.

TABLEAU II.- Ajustement des données de la figure 3 à une droite de la forme  $y = ax + b$ , où  $y = \dot{C}_{O_2}/\dot{M}_{O_2}$  et  $x = C_{O_2}$  ( $\dot{M}_{O_2}$  en % du max et  $C_{O_2}$  en  $\mu\text{mol/L}$ ) par régression linéaire. Les valeurs de  $b/a = K_1/K_2 = K_M$  ont été recalculées également en Torr et % saturation d'oxygène. Les résultats obtenus à 20 °C par une méthode de confinement ont été ajoutés à ce tableau à titre de comparaison. (1) Animaux acclimatés en normoxie ; (2) Animaux acclimatés 1-2 sem. en hypoxie.

t (°C)	y = $K_2x + K_1$	Coeff. de corrélation r	$K_1/K_2 = K_M$		
			$\mu\text{mol/L}$	Torr	% sat $O_2$
23	y = 0,00922x + 0,216	0,993	23,48	16,7	10,8
26	y = 0,00980x + 0,138	0,994	14,04	10,4	6,8
30	y = 0,00953x + 0,125	0,997	13,07	10,3	6,8
33	y = 0,00872x + 0,277	0,997	31,81	25,9	17,1
20 (1)	y = 0,00645x + 0,431	0,993	66,79	45,0	28,9
20 (2)	y = 0,00692x + 0,311	0,996	44,99	30,3	19,5

Les résultats qui viennent d'être exposés ont été obtenus au cours de traitements de courte durée (une heure au plus) en eau hypoxique. La régulation de la consommation d'oxygène pouvant être due à la mise en place de mécanismes physiologiques complexes, nous avons testé l'influence d'une acclimatation prolongée à une eau équilibrée à  $P_{O_2}$  d'environ 50-55 Torr, soit 35 % de la saturation atmosphérique, à la température de 20 °C. Un lot de Crevettes témoins était maintenu dans les mêmes conditions, mais en normoxie à  $P_{O_2}$  voisin de 150 Torr. Pendant 1 à 2 semaines, les Crevettes hypoxiques ont conservé un comportement normal, continuant à s'alimenter et à muer. La figure 4 compare les relations entre  $\dot{M}_{O_2}$  et  $P_{O_2}$  pour les animaux hypoxiques et les témoins normoxiques.

Mesurée en conditions normoxiques, la consommation d'oxygène des deux lots n'est pas significativement différente. L'acclimatation à une hypoxie modérée diminue sensiblement la valeur de la pression d'oxygène critique et, en dessous de celle-ci, la consommation d'oxygène des crevettes hypoxiques est significativement augmentée par rapport à celle des témoins. Ce renforcement du pouvoir de régulation métabolique après acclimatation hypoxique est confirmé par le calcul de l'index  $K_M = K_1/K_2$  qui montre des valeurs plus faibles pour le lot de crevettes hypoxiques (Tableau II).

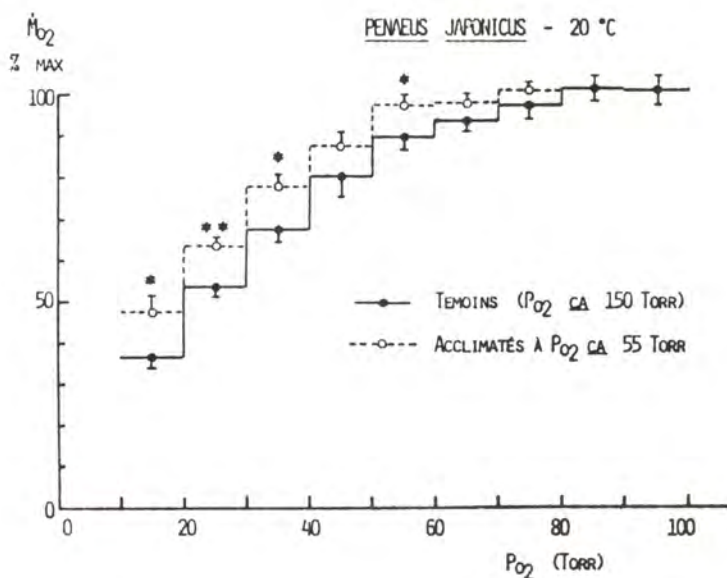


Figure 4.- Consommation d'oxygène  $\dot{M}_{O_2}$  en fonction de la pression partielle d'oxygène de l'eau ambiante  $P_{O_2}$  chez des crevettes *P. japonicus* élevées en eau normalement oxygénée (témoins) et après acclimatation pendant 1 à 2 semaines en eau modérément hypoxique. Méthode de confinement. Les valeurs moyennes ont été calculées par intervalles de 10 Torr et exprimées en % de la consommation maximale mesurée au dessus de la pression critique. Les astérisques indiquent des différences significatives entre lots témoins et acclimatés.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats exposés dans ce travail apportent des informations quant aux capacités de régulation métabolique des individus juvéniles de la Crevette *Penaeus japonicus* face à un abaissement de l'oxygénation ambiante, à des températures comprises entre 20 et 33 °C. Ces résultats s'appliquent à des animaux placés dans des conditions permettant de reproduire au mieux le comportement naturel durant la photophase du cycle nyctéméral : animaux au repos, enfouis dans le sable et après dissipation du stress induit par l'environnement expérimental.

Contrairement aux données publiées par Kulkarni et Joshi (1980), nos mesures démontrent que *P. japonicus* se comporte comme un organisme "oxyrégulateur", présentant une zone d'indépendance respiratoire au-dessus d'une  $P_{O_2}$  critique de l'ordre de 30-50 Torr selon la température, et une zone de dépendance en-dessous de ces valeurs, où le métabolisme aérobie ne peut plus être maintenu. La discordance entre les deux séries de résultats peut très vraisemblablement être attribuée à des méthodologies et surtout à des conditions expérimentales très différentes. Les valeurs de consommation d'oxygène rapportées par Kulkarni et Joshi (1980) sont dans l'ensemble beaucoup plus élevées que celles que nous avons trouvées et il est probable que, faute d'un substrat sableux et d'une durée d'acclimatation expérimentale assez longue, leurs animaux étaient en état de stress important pendant les mesures. D'une façon analogue, Thomas (1954) avait conclu à un comportement "oxyconforme" chez le Homard à partir de données obtenues sur des animaux



attachés et stressés, alors que Spoek (1974), travaillant sur des Homards longuement acclimatés à l'ambiance expérimentale démontrait sans ambiguïté un comportement normal "oxyrégulateur".

L'un des points originaux de ce travail concerne l'influence de la température sur le comportement oxyrégulateur chez P. japonicus. Chez diverses espèces animales, il a été généralement trouvé que le pouvoir de régulation métabolique tendait à diminuer avec l'élévation de la température ambiante, peut-être en relation avec l'augmentation du métabolisme et les limitations dues à l'adaptabilité des systèmes de transport de l'oxygène depuis le milieu ambiant jusqu'aux cellules (Fry, 1957 ; Butler et Taylor, 1975 ; Taylor et al., 1977 ; Bridges et Brand, 1980). Chez P. japonicus, le pouvoir de régulation augmente au contraire jusqu'à des températures de l'ordre de 26-30 °C pour diminuer au-dessus, cette diminution correspondant d'ailleurs sans doute à l'approche de la température létale. Il existe donc un optimum de régulation métabolique dans une zone thermique relativement élevée et il serait intéressant d'étudier la nature des réponses physiologiques associées. Ces réponses comportent sans doute d'abord une augmentation du débit d'eau ventilatoire branchial, réponse à l'hypoxie commune à toute les espèces à respiration aquatique, mais aussi probablement une amélioration des performances du système de transport de l'oxygène par le sang aux tissus. Chez certains Crustacés, la liaison de l'oxygène à l'hémocyanine peut en effet être renforcée sous l'influence d'effecteurs allostériques (lactate et autres substances, Truchot, 1980) dont l'apparition ne saurait être immédiate. Nos résultats montrant que le pouvoir de régulation métabolique apparaît renforcé par une acclimatation prolongée à l'hypoxie chez P. japonicus suggèrent que des mécanismes de cet ordre pourraient intervenir. Ces mécanismes d'adaptation à plus ou moins long terme ont d'ailleurs été largement étudiés chez les Poissons (voir Truchot, 1982).

Quoiqu'il en soit, il doit cependant être noté que nos conclusions doivent être limitées aux conditions d'inactivité des animaux, dans lesquelles nos données ont été acquises. Il est bien connu que le pouvoir de régulation métabolique des Crustacés s'affaiblit aux niveaux métaboliques élevés induits par l'activité locomotrice (Taylor, 1976 ; Bridges et Brand, 1980). Il est possible qu'il en soit aussi ainsi chez P. japonicus durant la phase nocturne du cycle nyctéméral pendant laquelle les crevettes sont actives. On doit aussi réaliser que nos résultats ne sont strictement valides que pour les juvéniles, encore qu'en général on s'accorde à penser que le pouvoir de régulation métabolique est augmenté avec l'accroissement de la taille (voir Bridges et Brand, 1980).

Au total, les juvéniles de la Crevette japonaise, Penaeus japonicus, présentent une bonne tolérance à l'hypoxie ambiante, que celle-ci résulte d'une exposition accidentelle de courte durée, ou bien d'un traitement de longue durée qui semble d'ailleurs la renforcer. Cette tolérance, qui se manifeste par des capacités notoires de régulation métabolique, apparaît de plus particulièrement bien développée dans la gamme des températures élevées.

---

Bayne B.L., 1971 - Oxygen consumption by three species of lamellibranch mollusc in declining oxygen tension. Comp. Biochem. Physiol., 40A, p. 955-970.

Bridges C.R. et Brand A.R., 1980 - Oxygen consumption and oxygen-independence in marine crustaceans. Mar. Ecol. Progr. Ser., 2, p. 133-141.

Butler P.J. et Taylor E.W., 1975 - The effect of progressive hypoxia on respiration in the dogfish (Scyliorhinus canicula) at different seasonal temperatures. J. exp. Biol., 63, p. 117-130.

- Egusa S., 1961 - Studies on the respiration of the "Kuruma" prawn, Penaeus japonicus Bate. II. Preliminary experiments on its oxygen consumption. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 27, p. 650-659.
- Fry F.E.J., 1957 - The aquatic respiration of fish. In : Brown M.E. (ed.), The physiology of fishes, vol. 1. Academic Press, New York, p. 1-63.
- Kulkarni G.K. et Joshi P.K., 1980 - Some aspects of respiratory metabolism of a penaeid prawn, Penaeus japonicus (Bate) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Hydrobiologia, 75, p. 27-32.
- Spoeck G.L., 1974 - The relationship between blood haemocyanin level, oxygen uptake, and the heart-beat and scaphognathite-beat frequencies in the lobster Hommarus gammarus. Neth. J. Sea Res., 8, p. 1-26.
- Tang P.S., 1933 - Oxygen consumption as a function of oxygen pressure. Quart. Rev. Biol., 8, p. 260-274.
- Taylor A.C., 1976 - The respiratory responses of Carcinus maenas to declining oxygen tension. J. exp. Biol., 65, p. 309-322.
- Taylor A.C. et Brand A.R., 1975 - Effect of hypoxia and body size on the oxygen consumption of the bivalve Arctica islandica L. J. exp. mar. Biol. Ecol., 19, p. 187-196.
- Taylor E.W., Butler P.J. et Al-Wassia A., 1977 - Some responses of the shore crab Carcinus maenas (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities. J. comp. Physiol., 122, p. 391-402.
- Thomas H.J., 1954 - The oxygen uptake of the lobster Homarus vulgaris Edw. J. exp. Biol., 31, p. 228-251.
- Truchot J.P., 1980 - Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. J. exp. Zool., 214, p. 205-208.
- Truchot J.P., 1982 - Action de l'oxygène et du dioxyde de carbone ambiants sur le transport des gaz respiratoires par le sang chez les animaux aquatiques (essentiellement marins). Oceanis, 8, p. 1-13.
- Van Winkle W. et Mangum C., 1975 - Oxyconformers and oxyregulators : a quantitative index. J. exp. mar. Biol. Ecol., 17, p. 103-110.



HISTOGENESE DE L'ORGANE Y (GLANDE DE MUE) CHEZ L'EMBRYON DE LA CREVETTE  
PALAEON SERRATUS (PENNANT) (CRUSTACE DECAPODE NATANTIA).

Auguste LE ROUX

Université de RENNES 1

Station de Biologie Marine de BAILLERON, 56860 SENE.

RESUME

L'organe Y apparaît à un stade embryonnaire voisin du stade C, selon Richard (1974), c'est-à-dire 3 semaines environ avant l'éclosion, à une température de 20°C. Sa différenciation se déroule sur 48 heures et elle est marquée par des modifications histologiques et une petite crise mitotique au sein du tissu épidermique d'origine. Sa situation métamérique est essentiellement maxillaire.

ABSTRACT

The Y organ appears during the embryonic development of the prawn at a stage approximately C, according to Richard's definition (1974). 3 weeks separate this stage from hatching at a temperature of 20°C. The organ formation is realized over 48 hours and is marked by an histological modification and a small mitotic crisis in the epidermal tissue from which it differentiates. Its metameric localization is mainly maxillular.

MOTS CLES : crevette - histogenèse - organe Y

KEY-WORDS : prawn - histogenesis - Y-organ

Les travaux de Chaix et de Reggi (1982) sur Acanthonyx lunulatus et de Lachaise et Hoffmann (1982) sur Carcinus maenas ont clairement montré que dans ces deux espèces, les oeufs contenaient des ecdystéroïdes divers dont les taux varient au cours du développement embryonnaire.

Bien que les substances identifiées ne soient pas les mêmes dans les deux cas, (la ponastérone A, non observée dans Acanthonyx, est de loin l'ecdystéroïde majeur chez Carcinus) les auteurs s'accordent pour considérer qu'elles jouent un rôle important dans l'embryogenèse et, en particulier, dans les phénomènes de cuticulogenèse probablement.

De nombreuses questions se posent encore à propos de ces substances et, notamment, celle de leur origine : celle-ci pourrait être double, maternelle au départ, intrinsèque ensuite.



L'organe Y est un site important de production d'ecdystéroïdes chez les Décapodes (Bollenbacher et O'connor, 1973; Chang et O'connor, 1977), mais non la seule (Chaix et De Reggi, 1982). Il est évidemment important de situer le moment de sa différenciation dans l'embryon et de rechercher ensuite les modifications histologiques dont il peut être le siège afin de détecter le moment de son entrée en activité et les variations ultérieures de cette dernière.

L'organe Y de Palaemon serratus adulte et des larves a été décrit par Le Roux (1977).

#### MATERIEL ET TECHNIQUE

Les femelles ovigères de Palaemon serratus ont été achetées auprès des pêcheurs locaux (Presqu'île de Rhuys, Bretagne-Sud) et mises en élevage en chambre climatisée à la température de 20°C sous un éclairage de type lumière du jour avec une photophase de 12 heures.

Les oeufs en début d'embryogenèse (le moment précis de la ponte n'est pas connu) et présentant une tache germinative de 0,25-0,30 mm de long mettent sous ces conditions environ 5 semaines pour aboutir à l'éclosion.

Les oeufs, prélevés sur des femelles marquées ont été fixés chaque semaine au départ, puis tous les deux jours pour mieux cerner le moment de l'émergence de l'organe Y. L'état d'avancement de l'embryogenèse a été précisé chaque fois grâce à un dessin réalisé à la chambre claire et à cette occasion une recherche microscopique de l'organe Y in vivo a été effectuée.

Les coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées après inclusion à la gélose-paraffine et colorées selon la technique de Huber (réaction nucléaire de Feulgen + bleu de Heidenhain).

#### RESULTATS

##### - Moment de la différenciation

Les observations effectuées tant par voie histologique que sur les embryons in vivo ne permettent pas de détecter l'organe Y avant que l'embryon ait atteint l'état d'ontogenèse représenté figure 1, état voisin du stade prézoéen de Sollaud (1924) et légèrement postérieur à l'étape D de Richard (1974).

Les appendices céphaliques et les premiers appendices thoraciques de l'embryon sont alors différenciés, l'abdomen, présentant des traces de métamérisation, est replié sous le thorax, le telson se situe face au labre, au niveau des mandibules. L'embryon se trouve alors à environ trois semaines de l'éclosion.

##### - Site de différenciation

Les cellules initiales de la glande de mue sont des cellules épidermiques qui se distinguent des éléments voisins par l'existence d'une couche de cytoplasme dense, épaisse de 2-3 µm, située du côté cuticulaire et qui rejette le noyau vers le côté interne de la cellule (pl. 1, photo 1).

Au départ, cette ébauche est plane, elle se situe en majeure partie entre le bord externe de la maxillule et la membrane de l'oeuf, au contact de laquelle un massif de quelques cellules représente l'amorce du branchiostégite. Ces cellules, au nombre de 3 à 6 en largeur, constituent à ce niveau le plancher ventro-latéral du corps.

Antéropostérieurement, la zone différenciée s'étend de la moitié antérieure de la maxillule à la région antérieure de la maxille (Fig. 2). Sur le plan strictement morphologique, la majeure partie de l'ébauche se situe au niveau maxillaire, nettement en avant du rein maxillaire avec lequel elle ne présente aucun rapport anatomique (Pl. 1, photo 7).

Lors de sa différenciation histologique, les contours de l'organe Y ne sont pas discernables sur le vivant, c'est seulement 24 à 48 heures plus tard que la structure se distingue des tissus voisins (pl. 1, photo 4), du fait de sa position très périphérique. Cette visualisation traduit parfaitement la surélévation du tissu glandulaire par rapport à l'épiderme banal voisin.

Les dimensions de l'ébauche ainsi observée sont indiquées au tableau 1.

#### - Modification anatomiques et histologiques jusqu'à l'éclosion

Dès les premières heures où les cellules de l'ébauche glandulaire se différencient des cellules épidermiques banales par l'acquisition de leur épaisse couche de cytoplasme externe, deux événements très caractéristiques et pratiquement concomitants se manifestent, d'une part, la vacuolisation basale (côté interne des cellules), d'autre part, des divisions cellulaires.

Les mitoses se manifestent parmi un petit nombre de cellules contenues dans un espace limité; une ou deux divisions ont de ce fait un impact immédiat qui se traduit par un bombement de l'ébauche, celle-ci prend alors une forme d'arceau en coupe transversale (pl. 1, photo 2).

C'est la conjonction des trois phénomènes (augmentation de la hauteur du cytoplasme, vacuolisation et mitoses) qui rend l'organe distinct des tissus voisins sur le vivant.

En fait l'édification de la glande de mue ne se fait pas à partir de l'ensemble des cellules "initiales" : l'ébauche évolue dissymétriquement, le développement des cellules et les mitoses s'accroissent du côté externe (pl. 1, photo 3).

Ces premières manifestations de l'émergence de l'organe Y se déroulent dans un laps de temps de 48 heures environ. Par la suite, les mitoses se poursuivent et la glande perd rapidement son aspect unistratifié. Une très forte vacuolisation affecte les cellules vers le quatrième jour (pl. 1, photo 5).

Au cours des semaines suivantes, la glande de mue prend un aspect massif (pl. 1, photos 6 et 7), le volume des noyaux diminue significativement (tableau 1), la chromatine s'organise en mottes distinctes et denses.

L'indice de volume (produit des 3 dimensions de l'organe, exprimées en micromètres, divisé par 1 000) double approximativement entre la deuxième et la quatrième semaine (tableau 1) ceci traduit une croissance significative que l'on constate sur les photos de la planche 1.



Malgré la superposition des noyaux sur 5 niveaux et plus, il semble bien que toutes les cellules conservent, au cours du développement embryonnaire, une insertion directe sur la cuticule. Cela est révélé par l'existence d'étroits couloirs cytoplasmiques, bordés par les membranes cellulaires, dans la partie médiane de la glande (cf pl. 1, photo 6).

Chez les embryons avancés, l'organe Y est situé exactement au point où la cloison interne de la carapace s'articule sur le corps. La partie médiane de la glande constitue le pli de la cuticule à ce niveau (pl. 1, photo 6).

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

La présente étude a permis de situer très précisément le moment de la différenciation de l'organe Y, en fonction de critères morphologiques et chronologiques.

Les modifications cytologiques et histologiques les plus apparentes s'observent au cours de la première semaine qui suit l'émergence de l'organe. Elles conduisent à la formation d'une glande massive dont les cellules réduisent très fortement leur surface de contact avec la cuticule.

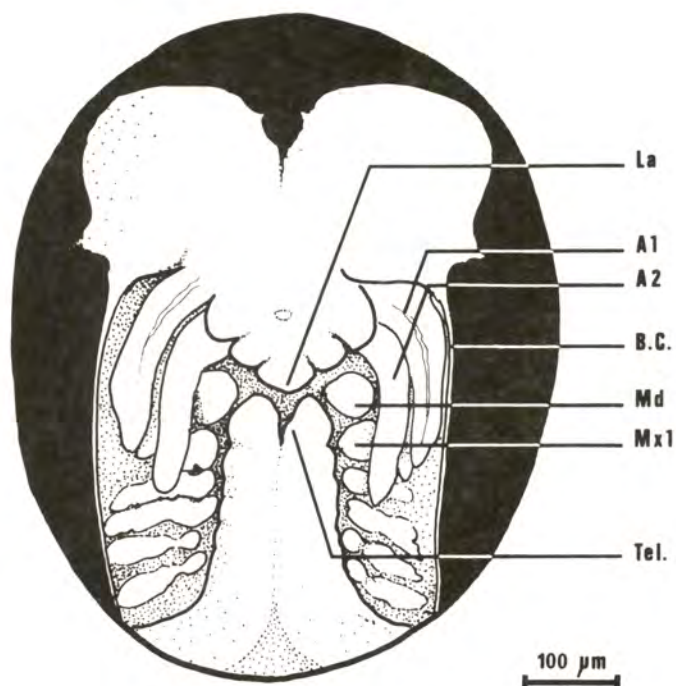
Les observations ultérieures ne sont pas suffisamment rapprochées pour permettre la mise en évidence d'éventuels indices d'un cycle d'activité. Il sera évidemment intéressant de suivre l'évolution histologique de la glande en fonction de l'ontogenèse et en particulier de la cuticulogenèse (c'est-à-dire d'une part des mues embryonnaires et d'autre part des phases de la séto-genèse définitive. Cette dernière commence sur l'exopodite de l'antenne et sur le telson dans les heures qui suivent le début de la différenciation de la glande de mue.)

Le fait que l'organe Y est visible par transparence sur l'embryon permet d'espérer des observations directes et éventuellement des interventions de microchirurgie à son niveau, ceci permettra de mieux évaluer le rôle qu'il joue dans l'embryogenèse.

Cette connaissance de l'endocrinologie embryonnaire, puis larvaire, n'est pas sans intérêt sur le plan appliqué, car au cours de ces périodes du développement, des phases critiques peuvent être conditionnées par des phénomènes hormonaux. Il conviendra, le cas échéant, d'en tenir compte dans les manipulations des géniteurs et des larves.

- Bollenbacher, W.E. et O'Connor, J.D. (1973). - Production of ecdysone by crustacean Y-organ in vitro. *Amer. Zool.*, 13, 1274.
- Chaix, J.C. et De Reggi, M. (1982). - Ecdysteroid levels during ovarian development and embryogenesis in the spider crab Acanthonyx lunulatus. *Gen. Comp. Endocr.*, 47, 7-14.
- Chang, E.S. et O'Connor, J.D. (1977). - Secretion of ecdysone by crab Y-organ in vitro. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 615-618.
- Lachaise, F. et Hoffmann, J. (1982). - Ecdysteroids and embryonic development in the shore crab, Carcinus maenas. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 363, 1059-1067.
- Le Roux, A. (1977). - L'organe Y de Palaemon serratus (Pennant) (Décapode Natantia) : localisation et aspects histologiques. *Cah. Bio. mar.* 18, 413-425.
- Richard, P. (1974). - Contribution à l'étude du développement larvaire et de l'organogenèse chez Palaemon serratus et du métabolisme des acides aminés libres chez cette espèce. Thèse doctorat 3ème cycle, Aix-Marseille II.
- Sollaud, E. (1924). - Recherches sur l'embryogénie des crustacés décapodes de la sous-famille des "Palaemoninae". *Suppl. Bull. biol. France et de Belgique*, 234 p..





**Figure 1 :** Aspect de l'embryon lors de la différenciation de la glande de mue (cf pl. 1, photo N° 1).

A1, Antennule; A2, antenne; B.C., bord de la carapace; La, labre; Md, mandibule; Mx1, maxillule; Tel., telson.



**Figure 2 :** Position et extension de l'ébauche de la glande de mue par rapport aux appendices céphaliques.

Md, mandibule; Mx1, maxillule; Mx2, maxille; Rein max., rein maxillaire.

- PLANCHE 1 -

Grandes lignes de l'évolution de l'organe Y depuis son émergence jusqu'à l'éclosion des larves.

Photo 1 : Aspect et position des cellules épidermiques au tout début de leur différenciation glandulaire (cf fig. 1).

Photo 2 : Organe Y, entre 24 et 48 heures après le début de sa différenciation. Evolution asymétrique des cellules épidermiques, augmentation de la hauteur du cytoplasme côté cuticule et vacuolisation basale des cellules glandulaires. L'ébauche est encore unistratifiée. La sétogénèse définitive commence sur les exopodites des antennes et sur le telson.

Photo 3 : Embryon légèrement plus évolué que pour la photo N° 2. Vacuolisation basale des cellules glandulaires et présence de deux mitoses simultanées à la base de l'organe. L'ébauche présente deux couches de noyaux. Sétogénèse en cours sur exopodites des antennes et sur le telson.

Photo 4 : Vue de l'organe Y in vivo (flèche), au niveau du pli de l'antennule. L'embryon est de 48 heures plus âgé que celui de la photo N° 1 et correspond approximativement à l'état de ceux des photos N° 2 et N° 3.

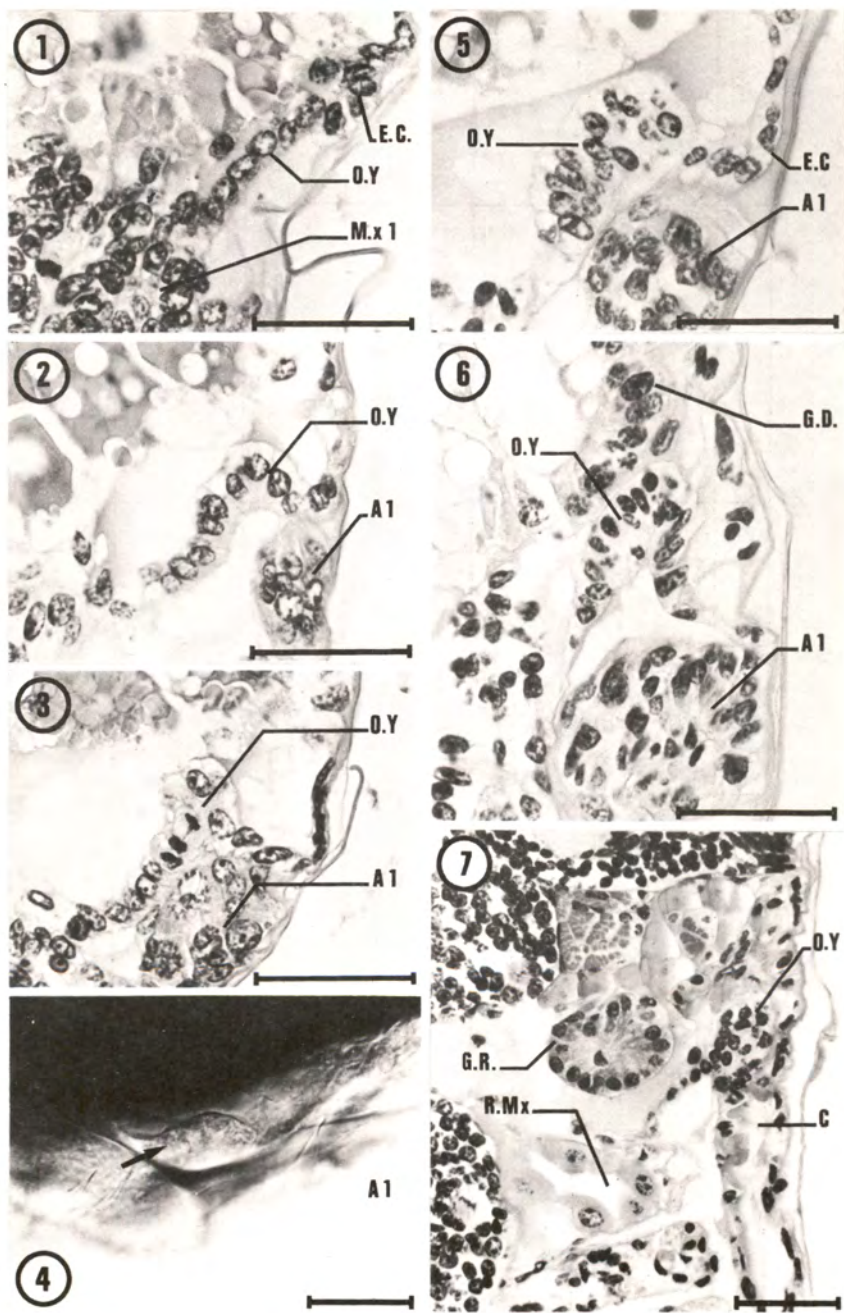
Photo 5 : Etat de la glande 4 jours après photo N° 2. Trois couches de noyaux sont présentes, le cytoplasme est très fortement vacuolisé.

Photo 6 : Embryon de 8 jours plus âgé que photo N° 3. Position de l'organe Y au pli de la carapace.

Photo 7 : Embryon sur le point d'éclore, âgé de 8 jours de plus que celui de la photo N° 6. On notera que l'articulation de la cuticule interne de la carapace s'effectue en avant de la maxille, au niveau de la maxillule.

Al, antennule; C., carapce; E.C., ébauche de la carapace; G.D., glande digestive; G.R., glande en rosette; Mxl, maxillule; O.Y., organe Y; R.Mx., rein maxillaire.

Toutes les coupes sont faites dans le plan frontal, sauf la N° 7 qui est longitudinale horizontale. L'échelle représente 50  $\mu$ m.





Date	02/02	08/02	15/02	22/02
Dimensions oeufs en mm	n = 10 L = 0,76 ± 0,02 l = 0,62 ± 0,02	n = 10 L = 0,82 ± 0,02 l = 0,64 ± 0,01	n = 10 L = 0,93 ± 0,01 l = 0,70 ± 0,01	n = 1 L = 0,94 l = 0,69
Dimensions organe Y in vivo	non décelé	L = 74 µm l = 25 µm	L = 93 µm l = 30 µm	L = 100 µm l = 36 µm
Dimensions organe Y d'après coupes	L = 30 - 50 µm l = 30 - 40 µm H = 20 - 40 µm	L = 35 - 50 µm l = 20 - 35 µm H = 30 - 50 µm	L = 35 - 60 µm l = 30 - 45 µm H = 25 - 40 µm	L = 45 - 60 µm l = 30 - 50 µm H = 40 - 60 µm
Indice de Volume	n = 12 m = 44 ± 6	n = 8 m = 45 ± 19	n = 10 m = 66 ± 13	n = 13 m = 85 ± 9
Volume des noyaux	maxi = 306 moy. = 229 µm <sup>3</sup> mini = 186	maxi = 106 moy. = 97 µm <sup>3</sup> mini = 82	maxi = 142 moy. = 116 µm <sup>3</sup> mini = 82	maxi = 145 moy. = 122 µm <sup>3</sup> mini = 84

Tableau 1 : Evolution de quelques caractéristiques de l'organe Y en fonction du développement des oeufs à 20° C.

L'AQUACULTURE DU MACROBRACHIUM ROSENBERGII  
AUX ANTILLES FRANÇAISES

-----  
Denis LACROIX (1) - S.I.C.A. (2)

RESUME

L'aquaculture du Macrobrachium rosenbergii débute en Martinique en 1976 à l'initiative du Conseil Régional. Une première éclosérie type "eau verte" est construite et ensemence les premiers bassins. En 1978, le CNEXO est sollicité pour apporter son concours scientifique qui se traduit par la construction d'une seconde éclosérie type COP "eau claire", opérationnelle en 1980. Le développement des bassins (20 ha) entraîne celui des écloséries, unifiées en 1983 par une méthode unique enrichie d'un prégrossissement larvaire permettant une capacité de 7 à 8 millions de PL.

En Guadeloupe, le développement des premiers bassins date de 1978. Les deux coopératives actuelles et les 11 ha de bassins ont entraîné l'apparition de 2 écloséries privées et, après accord de toutes les parties, l'intervention du CNEXO pour la construction d'une éclosérie à vocation régionale précédée d'une petite éclosérie provisoire en fonctionnement depuis juillet 1983.

ABSTRACT

The aquaculture of Macrobrachium rosenbergii is launched in Martinica by the regional council in 1976. A first "green water" type hatchery is built and provides juveniles to the first ponds. In 1978, CNEXO is asked to cooperate in scientific assistance. A new hatchery is built with COP "clear water" system and produces in 1980. The development of ponds (20 ha) needs the increase of the hatcheries capacity, which is now done with one single method and intensive larval first stage (7 - 8 millions PL. cap).

In Guadeloupe, the first ponds started in 1978. Two cooperatives and 11 ha of ponds at this time have determine the construction of CNEXO in the construction of a regional hatchery. A small light one is already under production since July 83.

MOTS CLÉS : Macrobrachium, éclosérie, grossissement, production  
Martinique, Guadeloupe

KEY WORDS : Macrobrachium, hatchery, grow-out, production,  
French Antillas

(1) CNEXO - Centre de recherches ISTPM/CNEXO  
Pointe-Fort - 97231 Le Robert - Martinique - FWI

(2) SOCIETE D'INTERET COLLECTIF AGRICOLE "Ecrevisses"  
B.P. n° 5 - 97200 Fort de France - CEDEX - MARTINIQUE - FWI



## PRODUCTION HISTORIQUE

En 1976, Jean BALLY, vice-Président du Conseil régional de la Martinique découvre lors d'une visite à l'île Maurice la possibilité de l'élevage de l'"écrevisse" tropicale (ou "camaron", ou "chevrette") *Macrobrachium rosenbergii*. A son retour, il obtient le financement pour l'expérimentation de cet élevage ainsi que le concours de l'expert anglais Roy JENSON formé à HAWAII par le Professeur FUJIMURA. Ce dernier est l'inventeur (dans les années 70) de la méthode d'élevage larvaire américaine dite en "eau verte".

De 1976 à 1978, R. JENSON construit une éclosérie de ce type (Saint-Pierre) et commence à former une petite équipe martiniquaise dirigée par la SAFEM (Société d'études et de formation locale) aux techniques d'éclosérie. Parallèlement, des privés réalisent une vingtaine de bassins répartis en divers sites dans l'île.

En 1978, au départ de R. JENSON et sur son conseil, les Martiniquais se tournent vers le CNEXO pour le relais de l'assistance scientifique. Le CNEXO ayant mis au point à Tahiti une autre méthode d'élevage larvaire dite en "eau claire", il est décidé un test de comparaison entre les deux méthodes.

En 1979 débute la construction d'une seconde éclosérie sur le site de la première. Le premier cycle en "eau claire" (juillet 1980) démontre la fiabilité de cette méthode en produisant d'emblée 265 000 PL.

Pendant deux ans, les deux écloséries vont fonctionner en parallèle en permettant régulièrement les techniciens afin de les former aux deux méthodes.

En septembre 1981, une étude comparative chiffrée est publiée à la "poster session" de la conférence sur l'aquaculture organisée par la WMS (1) et l'EMS (2) à Venise. L'étude conclut à un léger surcoût de la post-larve "d'eau claire" (produite par un petit module d'éclosérie) par rapport à la post-larve "d'eau verte" (0,22 contre 0,19 F). Par contre, la méthode "eau claire" présente une fiabilité de production supérieure à celle de la méthode "eau verte".

En 1982, en raison de l'augmentation significative des surfaces en grossissement à la Martinique (X3) et de l'apparition d'une demande croissante en juvéniles de la part des aquaculteurs Guadeloupéens, la SICA, qui a désormais la responsabilité directe de son développement, décide d'agrandir l'éclosérie "eau claire". Après divers essais, les 5 bacs de 1 m<sup>3</sup> sont remplacés par 3 grands bacs cylindro-coniques de 7 m<sup>3</sup>. La méthode "eau claire" est alors étendue aux 2 écloséries en combinant un "prégrossissement" larvaire dans l'une (15-20 j) et la métamorphose dans l'autre (15-20 j) ce qui permet d'augmenter le nombre de cycles annuels.

En Guadeloupe, la construction des premiers bassins date de 1978. Mais très rapidement, la difficulté de s'approvisionner en juvéniles à l'extérieur se révèle l'obstacle majeur au développement. Des divergences d'appréciation par rapport à ce problème entraîne en 1981 l'éclatement des aquaculteurs en deux coopératives.

En 1982, le Conseil régional décide d'affecter 400 000 F à la construction d'une éclosérie régionale dont la responsabilité est confiée à une SICA. Celle-ci, rapidement créée, demande au CNEXO d'en assurer la construction et le fonctionnement initial.

Afin de gagner du temps le CNEXO propose d'installer une éclosérie légère provisoire en attendant l'éclosérie définitive. L'accord de tous les aquaculteurs en décembre 1982 permet de lancer l'opération. Avec l'aide de la Direction départementale de l'Agriculture, l'éclosérie provisoire est rapidement installée sur le site définitif et produit en juillet 1983 ses premières post-larves. La construction de l'éclosérie définitive est prévue pour début 1984.

---

(1) WORLD MARICULTURE SOCIETY  
(2) EUROPEAN MARICULTURE SOCIETY



Le rappel de l'évolution de ce développement permettra de mieux comprendre les caractéristiques et les particularités de chaque île que nous allons présenter en suivant l'évolution chronologique. Nous terminerons par l'examen des principaux points de blocage intéressant la recherche au niveau de l'écloserie et du grossissement.

## I - MARTINIQUE

-----

### I-1. L'écloserie "eau verte"

La plus ancienne des écloseries (1977-1978) est constituée de deux bâtiments type "hangar à tabac" abritant les bacs d'élevage et des bacs à l'air libre destinés à la préparation de l'eau verte (voir photo n° 1 - premier plan).

La méthode "eau verte" est l'application directe des procédures mises au point par Fujimura à HAWAII (Fujimura 1966-1970) c'est-à-dire principalement :

- bac type raceway en béton,
- eau d'élevage enrichie en phytoplancton (renouvelée toutes les 24 ou 48 h),
- faible densité : 20 à 40 larves/litre,
- pas de chauffage artificiel.

L'évolution des productions est rassemblée dans le tableau général en annexe.

- Quatre personnes peuvent en assurer le fonctionnement courant.

### II-2. L'écloserie "eau claire"

Construite en 1979-1980, elle rassemble dans un seul bâtiment en béton (70m<sup>2</sup>) les équipements suivants :

- . 5 bacs cylindro-coniques d'élevage en résine polyester de 1 m<sup>3</sup>,
- . 1 cuve de chauffage en eau douce (6 m<sup>3</sup>),
- . 1 cuve de mélange en eau saumâtre (9 m<sup>3</sup>),
- . 1 centrale d'air (2 surpresseurs automatiques),
- . 1 dispositif de traitement et de transfert d'eau (filtre à sable et pompe),
- . 1 petit laboratoire d'observation.

La fourniture d'eau douce, d'eau de mer et d'énergie de secours est assurée par les équipements de la première écloserie.

Cette écloserie a été la première à diffuser la technique "eau claire" mise au point à l'écloserie-mère du Centre océanologique du Pacifique (CNEXO) à TAHITI (AQUACOP, 1977). Rappelons les principales caractéristiques de cette méthode :

- bac cylindro-conique (répartition homogène des larves),
- eau d'élevage filtrée (donc sans algue) et chauffée à l'optimum thermique (32°C),
- forte densité (80 à 100 larves/litre).

Les résultats des 10 cycles figurent dans le tableau général en annexe. Après le premier cycle, effectué par le seul biologiste CNEXO, la formation du personnel local à cette nouvelle technique a été entreprise jusqu'à la maîtrise complète de toutes les étapes du cycle. Comme dans l'écloserie voisine, une équipe de 4 personnes suffit au fonctionnement régulier des installations.

Les équipements complémentaires comprennent :

- . 1 pompe d'eau de mer branchée sur une crépine verticale au "large" (20 m),
- . 2 pompes d'eau douce branchées sur un puits,
- . 2 surpresseurs,
- . 1 groupe électrogène diesel automatique de secours (52 KVA).

Ces équipements (sauf les surpresseurs) desservent simultanément ou séparément les deux écloseries.

Les enceintes d'élevage construites en béton sont réparties en deux modules :

- . 6 raceways de 3 m<sup>3</sup> (dont 1 ou 2 servent de stockage de géniteurs ou de post-larves),
- . 3 raceways de 13 m<sup>3</sup> (voir photo n° 2).

### II-3. Agrandissement et complémentarité

Dès 1982, la SICA souhaite augmenter la capacité de production en juvéniles pour faire face d'abord à son propre développement et, dans la mesure du possible, aux demandes de la Guadeloupe. L'agrandissement de l'écloserie "eau claire", dont le choix est justifié surtout par la grande régularité de production, pose le problème de la capacité du nouveau bac. Deux essais successifs (3 puis 5 m<sup>3</sup>) réalisés avec l'aide d'un fabricant local permettent de préciser le bac définitif de 7 m<sup>3</sup> dont la forme cylindro-conique se révèle indispensable pour la répartition homogène des larves et la survie des post-larves après la métamorphose (elles deviennent benthiques).

Trois de ces bacs remplacent les 5 bacs initiaux de 1 m<sup>3</sup>, (voir photo n° 3).

Ce système a démontré son efficacité (cycle de 667 000 PL), mais la mise au point semble plus longue que prévue. Cette complémentarité des 2 bâtiments permet d'effectuer un plus grand nombre de cycles dans l'année et donc de produire des post-larves plus régulièrement.

Enfin, cette disposition consacre l'unification des écloséries et des équipes sur une même méthode facteur essentiel de simplification du travail.

La production de 1983 devrait dépasser 3,5 millions de PL ce qui correspond à l'ensemencement d'environ une vingtaine d'hectares de bassins - (180 000 PL/ha/an) -

En marche normale, l'écloserie dispose maintenant d'une capacité nominale de 7 à 8 millions de PL.

### II-4. Les bassins

Les premiers sont construits en 1977, en parallèle de l'écloserie "eau verte". Bien que réalisés de manière artisanale sur des sites parfois difficiles. (voir photo n° 4) Ces bassins permettent de constituer un stock suffisant de géniteurs et de démontrer la faisabilité biologique et technique de cet élevage.

Cependant, plusieurs problèmes apparaissent rapidement :

- difficulté du réglage de la qualité et/ou de la quantité d'eau de renouvellement,
- inadaptation de l'aliment (granulé poulet),
- irrégularité et imprécision des restockages en juvéniles et des productions ultérieures.

Une approche sommaire des caractéristiques physico-chimiques des bassins (pH, débit, température) et le concours d'aides extérieures (liaison scientifique avec le COP, coopération avec un provendier local pour des essais de granulé, mission de 5 mois d'un hydrogéologue) permettent de résoudre les plus gros problèmes notamment :

- réévaluation du minimum de renouvellement d'eau de 5 à 10% par jour, soit environ 10 litres/seconde/ha,
- mise au point par un fabricant local à partir de spécifications précises, d'un granulé mieux adapté aux besoins de l'écrevisse : 33% de protéines, 5% de lipides pour 3 F du kilo,
- calcul de plusieurs grilles alimentaires "à la carte" selon les normes de production des sites donnant des taux de conversion variant de 3 à 5,
- amélioration de la régularité des fournisseurs de post-larves grâce à l'entrée en production de la seconde écloserie,
- correction du "creux" habituel de production entre le 14e et le 18e mois par un premier restockage plus précoce (4e-5e mois),



- première estimation d'un optimum de restockage annuel en continu : 180 000 PL/ha/an.

Ces progrès ont contribué au redémarrage du développement des bassins en 1982, avec entre autres, l'apparition de "fermes" groupant plusieurs bassins sur des sites bien adaptés, la plus grande atteignant 4 ha (voir photo n° 5). L'ensemble des bassins totalise aujourd'hui une vingtaine d'hectares.

Ce développement entraîne la nécessité d'une connaissance plus fine des problèmes technico-économiques de cet élevage.

En effet, si la production totale est passée de 2 tonnes en 1979 à une dizaine de tonnes de 1983, les rendements restent très dispersés : de 1 à 3,5 T/ha/an avec une moyenne générale oscillant entre 1,5 et 1,9 T/ha/an, fourchette qui est précisément celle du seuil de rentabilité économique, malgré un prix de vente provisoirement élevé : 110 F/kg.

## II - GUADELOUPE

-----

### II-1. Les bassins

La particularité de la Guadeloupe est d'avoir commencé à construire des bassins dès 1978 sans garantie contractuelle de fourniture de post-larves ce qui montre une foi certaine dans cet élevage, mais ce qui a rapidement gêné le développement.

Au départ, l'approvisionnement en PL s'est fait par avion (ligne régulière ou avion privé) à partir de l'écloserie de Saint-Pierre.

En 1981, des divergences d'opinion au sein de la coopérative initiale concernant les options de développement entraîne le départ d'une partie des aquaculteurs qui constituent une seconde coopérative, la SOCOPREG. Cette scission ne facilite ni le développement des bassins, ni la fourniture cohérente et régulière de juvéniles de Martinique. Cette fourniture se concrétise cependant partiellement par des accords de livraison entre la coopérative initiale et la SICA de la Martinique. La SOCOPREG, quant à elle, s'oriente vers la construction d'écloseries privées.

L'absence d'assistance technique officielle par un organisme scientifique a entraîné l'absence quasi complète d'informations sur les stockages et les productions.

Pourtant certains sites commencent à représenter des surfaces importantes. (voir photo n° 6).

La coopération aquacole a cependant demandé dès 1980 une coopération technique avec le CNEXO. Cette assistance est restée ponctuelle et officieuse, faute de personnel et de moyens.

Elle a quand même permis la diffusion des informations les plus indispensables au démarrage de cet élevage (choix des sites, implantation des bassins, réglage du débit, grilles alimentaires, normes de stockage, techniques de pêche, etc.).

Le renforcement de ce soutien serait pourtant d'autant plus souhaitable que la phase des pionniers est désormais révolue et que les deux coopératives totalisent actuellement plus de 11 ha en eau répartis en 12 sites. Plusieurs projets nouveaux dont un de plus de 10 ha devraient voir le jour en 1984.



## II-2. Les écloséries

L'apparition de 2 coopératives en 1981 a considérablement retardé l'organisation d'une fourniture autonome de PL.

Pourtant, dès décembre 1981, M. PIKETTY (1) président en Martinique les "journées aquacoles de la CARAIBE" proposait l'aide du CNEXO pour la construction d'une éclosérie régionale sous condition de l'accord de tous aquaculteurs guadeloupéens.

Cet accord nécessita un an pour être signé (décembre 1982) et autorisa la mise en place des procédures pour la construction d'une éclosérie régionale de 14 à 17 millions de PL : montage financier, demandes de subventions, de prêts, concertation avec la commune, sélection d'un architecte, création d'une SICA maître d'ouvrage, convention pour la maîtrise d'oeuvre avec France-Aquaculture, etc.,

La construction doit commencer début 1984.

Pour ne pas perdre de temps et avec l'accord de tous les aquaculteurs, le CNEXO finança l'expédition, la construction et la mise en oeuvre d'une petite éclosérie provisoire sous serre avec l'aide de la D.D.A. et de la SICA naissante.

Dès juillet 1983, Thierry ROBIN, aidé d'un ouvrier local, produisait 130 000 PL pour le premier cycle (voir photo n° 7). Le second cycle donnait 160 000 PL. Le 3e devrait atteindre les 203 000 PL.

Entre-temps, le Président de la SOCOPEG, insatisfait des expéditions de PL de Martinique (aléas de fourniture et de survie au transport) décidait de construire sa propre éclosérie, bientôt imité par un autre aquaculteur. Ces deux écloséries en circuit fermé, n'ont diffusé à ce jour aucun résultat.

L'objectif essentiel est cependant atteint : organiser la production pour fournir à tous les aquaculteurs des juvéniles au coût le plus bas possible.

Quel que soit l'avenir des écloséries privées, l'éclosérie régionale mise en place par le CNEXO constitue une sécurité biologique et économique compte tenu et de l'actualisation permanente des connaissances en matière d'éclosérie et des importantes économies d'échelle réalisées grâce à la taille du projet.

## III - POINTS DE BLOCAGE INTERESSANT LA RECHERCHE

---

### III.1. En éclosérie

La première caractéristique de la méthode "eau claire" est le contrôle maximum de tous les paramètres d'élevage et tout particulièrement de la qualité de l'eau d'élevage (chlorée, filtrée, chauffée, voire traitée aux U.V.) afin de minimiser les effets d'accumulation toxique comme l'ammoniaque par exemple. (Armstrong, 1977). Ce contrôle est relativement facile en circuit ouvert. Par contre, en circuit fermé, la qualité de l'eau dépend directement de l'efficacité du filtre biologique.

Bien que le circuit fermé pour cet élevage soit maintenant bien maîtrisé (AQUACOP, 1983), il serait souhaitable d'en savoir plus sur l'évolution de la physico-chimie et de la bactériologie de l'eau d'élevage en relation avec la physiologie de la larve. En effet, pourquoi tous les cycles en circuit fermé durent-ils significativement plus longtemps qu'en circuit ouvert ? Par ailleurs, pourquoi la survie finale moyenne en circuit fermé (41-57 PL/litre) est-elle toujours inférieure à celle du circuit ouvert (70 PL/litre) ?

Autre point de blocage classique : la métamorphose. S'il n'est pas exceptionnel d'obtenir de remarquables survies larvaires (85 à 99%), le taux de survie à la métamorphose dépasse rarement 70%, quelles que soient les précautions prises (qualité d'eau parfaite, baisse de densité, gavage en *Artémia*, choc de salinité à la baisse, chauffage, etc.).

Des activateurs de métamorphose, notamment la phycoérythrine pour le lambi, *Strombus gigas* (Scott SIDDALL - pers. comm.), sont connus. Une connaissance plus fine du déterminisme biochimique de la métamorphose chez les *Macrobrachium* permettrait de sélectionner un ou plusieurs catalyseurs/activateurs, naturels ou de synthèse.

### III-2. En grossissement

Pour ce qui concerne les Antilles, trois domaines mériteraient d'être approfondis : la maturation sexuelle, la pathologie, l'éco-éthologie et ses conséquences sur la croissance et la survie.

La maturation sexuelle devient un phénomène important à bien connaître quand une éclosérie doit s'approvisionner régulièrement en millions de larves à partir de géniteurs prélevés dans les bassins. Sachant qu'une femelle pond en moyenne 400 à 600 larves par gramme de poids frais et que plus les pontes sont groupées, plus l'élevage larvaire est homogène, la gestion de bassins de géniteurs doit devenir rigoureuse. Le COP a déjà travaillé sur ce problème (conventions chevrettes territoire - CNEXO), mais beaucoup d'éléments restent imprécis, notamment l'influence de la lune, signalée au congrès sur les crustacés d'eau chaude à Hawaï (R. York, mars 1983, pers. comm.).

La pathologie, comme en phase larvaire, reste discrète. Cependant, on sait encore très peu de choses sur le déterminisme de la fixation des algues sur la carapace d'animaux affaiblis ou sur le déclenchement du classique "black spot disease", virus (?) nécrosant de l'exosquelette. L'explication par les "mauvaises conditions d'élevage" reste sommaire même s'il est vrai que pour la plupart des cas, une augmentation brutale de l'arrivée d'eau neuve déclenche des mues massives et l'assainissement du cheptel.

L'éco-éthologie reste le domaine de recherche le plus complexe et le plus nécessaire. Trois éléments concourent à cette importance : le cannibalisme habituel des crustacés, lié dans notre cas à l'imperfection nutritionnelle de l'aliment, la territorialité marquée, et la taille potentielle de cette espèce aux pinces caractéristiques (cf. nom du genre, voir photo n° 8).

Il est évident que la structure de la population et sa répartition dans l'espace (notamment concentrations dans l'axe des arrivées d'eau observées en plongée) ont une influence directe sur la croissance individuelle et moyenne et sur la survie. Ces problèmes, déjà difficiles à cerner dans le cas d'un ensemencement unique (méthode discontinue) tant le nombre de paramètres est grand, deviennent extrêmement complexes pour des restockages multiples, décalés de quelques mois les uns par rapport aux autres (méthode continue).

Or, les courbes classiques de croissance, de survie, de biomasse maximale au m<sup>2</sup> sont toutes issues d'expériences menées à partir d'un ensemencement unique, ce qui est un cas particulier parmi de nombreuses combinaisons.

Les simulations par ordinateur (Polovina, 1978) utilisent le même type d'approximation pour simplifier les calculs.

Les expériences américaines ou israéliennes de densité ont moins d'intérêt pour nous, car eux cherchent surtout à optimiser la croissance (donc à faible densité) pendant les 5 à 8 mois de saison "chaude". (S.W. Cange, 1983 - D. Cohen, 1983).



Il faut également ajouter une autre réserve qui ressemble, toutes proportions gardées, au principe d'incertitude d'Heisenberg (1) : dans un bassin restocké en continu on ne peut connaître simultanément à tout moment la croissance et la survie sous peine de perturber ou de détruire tout ou une partie de ce qu'on observe.

Un bassin ressemble plus à une "boîte noire" dont on connaît les "input" et les "output" ainsi qu'un certain nombre d'indicateurs : température, pH, oxygène, turbidité, etc. Seule l'analyse fine, avec l'aide éventuelle de l'ordinateur, de ces trois sources d'information et de leurs inter-relations permettra de rendre compte valablement, c'est-à-dire de manière prévisionnelle, des phénomènes internes au bassin. D'où la nécessité d'un suivi physico-chimique rigoureux des bassins exemplaires et d'un dialogue permanent avec les aquaculteurs qui doivent être les premiers bénéficiaires des enseignements découverts avec leur concours.

- 
- AQUACOP - 1977 - Production de masse de post-larves de Macrobrachium rosenbergii en milieu tropical : unité pilote - Publ. CNEXO - Actes colloq. 4, 213-232.
- AQUACOP - 1983 - Intensive larval rear ing of Macrobrachium rosenbergii recirculating systems. présenté au 1st International biennial conférence warm water aquaculture crustacea . Hawaï - février 1983.
- Armstrong, D.A, D.J Chippendale and A.W Knight, 1977  
Influence of pH on the toxicity of ammonia to larval of the giant prawn Macrobrachium rosenbergii. Eighth Workshop of world Mariculture Society Costa Rica 10 - 13 janvier 1977.
- Cange, S.W, I.W Avault - 1983  
Macrobrachium rosenbergii culture in brackish water ponds at four stocking densities. 1 st international biennial conference on warm water aquaculture crustacea - Hawaï février 83.
- Cohen, D. ,A.Ra'anana 1983 - The production of the fresh water prawn Macrobrachium rosenbergii in the temperate zone. 1 st international biennial conference on warm water aquaculture crustacea - Hawaï 1983.
- Fujimura.T - 1966 - Notes on the development of a practical mass culturing technique of giant prawn Macrobrachium rosenbergii - Indo-pacific Fisheries council (FAO) 12 th session - Hawaï.
- Fujimura.T et M. OKAMOTO - 1970  
Notes on progress made in developing a mass culture technique for Macrobrachium rosenbergii in Hawaï. In coastal Aquaculture in the Indo-Pacific Region.  
T.V.R. Pilay Ed, Fishing News Book, Ltd. London.
- Polovina.J.J. 1978 - a population dynamics and production economics model for prawn aquaculture presented at World Mariculture Society Annual Meeting.  
Atlanta - 1978.
- 

(1) En physique quantique, on ne peut connaître simultanément avec précision et la position d'une particule et sa vitesse. En effet, pour connaître l'une, il faut agir sur l'autre et réciproquement.

ANNEXE : Tableau de production en post-larves (en milliers)  
des écloseries depuis 1979.

Année	écloserie "eau verte" (X 1000)	total annuel	écloserie "eau claire" (X 1000)	total annuel	Total des deux éclo- series	observations
1979	35 "cycles" répartis en 8 bacs	1.209	en cons- truction		1.209	-29 août : cyclone DAVID
1980	42 "cycles" répartis en 8 bacs	1.149	265 266	531	1.680	-pbs de para- sitisme en "eau verte" -cyclone ALLEN -début de la formation "eau claire"
1981	172 457 417 393 183 183	1.636	293 364 236 200	1.093	2.729	-panne de groupe (-198.000 larves en "eau claire")
1982	327 267 60 158 15	827	221 353 294 337 48(1)+107	1.360	2.187	-pbs de toxi- cité d'eau de puits -généralisa- tion de "l'eau claire" (1) expérimen- tation bac 3 m3
1983	384 256	écloseries combinées ↓ 485 74 327 296 667 160 341 361 277	148(2) agrandissement		3.499	(2) -expérimen- tation bac 5 m3  -rodage de l'écloserie combinée agrandie -pbs techni- ques (pom- pes, supres- seurs)





Photo 1. Vue générale du site des écloséries "eau verte" (2 hangars au premier plan) et "eau claire" (bâtiment en béton au deuxième plan). On notera les bacs extérieurs de préparation du phytoplancton.



Photo 2. Raceways de 13 m<sup>3</sup> de l'éclosérie "eau verte".

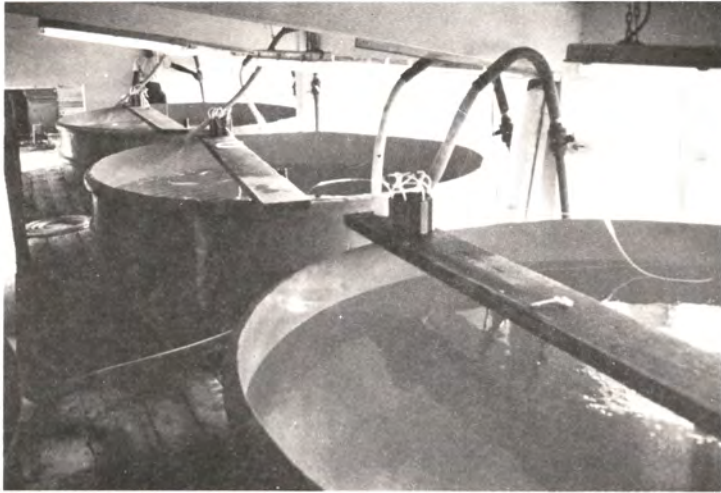


Photo 3. Nouveaux bacs 7 m<sup>3</sup> de l'écloserie "eau claire" agrandie.



Photo 4. Bassin de grossissement de 1 700 m<sup>2</sup> au LORRAIN (MARTINIQUE).



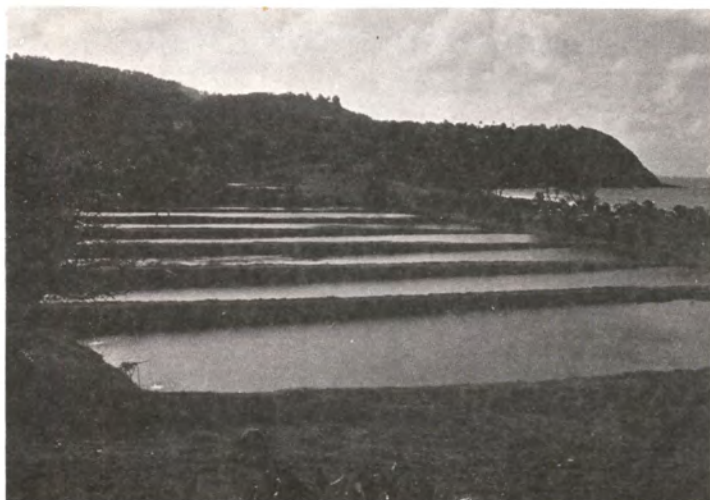


Photo 5. Ferme aquacole de 4 ha de l'Anse CHARPENTIER (MARTINIQUE).

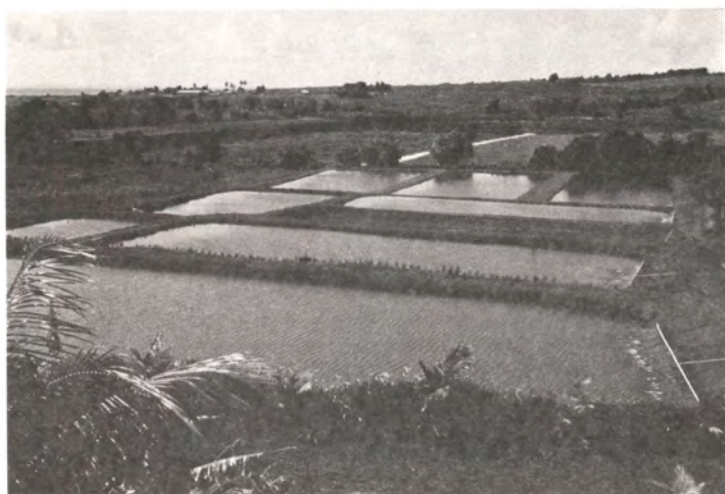


Photo 6. Ferme aquacole d'environ 2 ha à GOYAVE (GUADELOUPE).



Photo 7. Première production de post-larves à l'écloserie provisoire de POINTE NOIRE (GUADELOUPE).

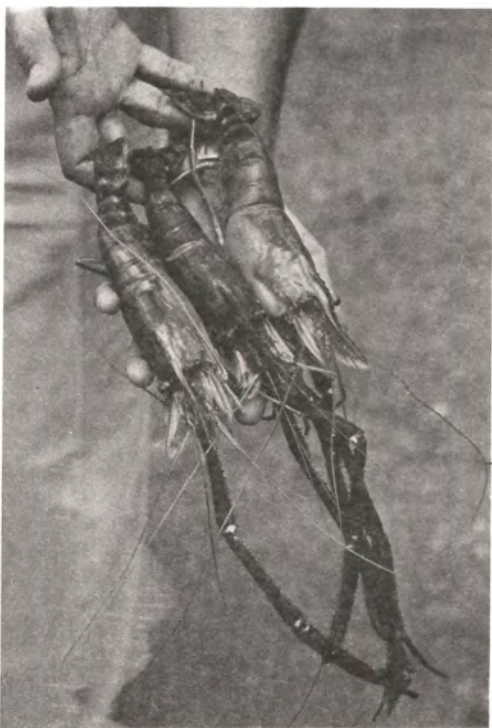


Photo 8. Adultes de Macrobrachium rosenbergii (120 à 160 g) munis de leurs pinces d'origine.



VARIATIONS DES ACTIVITES DIGESTIVES EN FONCTION DES FACTEURS DU MILIEU  
CHEZ LES CRUSTACES

François GALGANI<sup>(1,2,3)</sup>, Yves BENYAMIN<sup>(2)</sup>, Alain Van WORMHOUDT<sup>(3)</sup>  
et Hubert J. CECCALDI<sup>(1)</sup>

R E S U M E

L'équipement enzymatique protéolytique de l'hépatopancréas de six espèces de crevettes Pénéides (*Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis* et *P. vannamei*) et quelques unes de leurs variations physiologiques des protéases digestives de *P. japonicus* ont été caractérisées.

Dans l'hépatopancréas de *P. kerathurus*, il existe des activités trypsique, chymotrypsique, leucine-aminopeptidasique et carbocypeptidasique de type A et B. Il existe également une activité collagénolytique et une protéase de faible poids moléculaire. Les propriétés physico-chimiques et catalytiques de ces enzymes sont proches de celles décrites pour les autres groupes zoologiques. Les principales protéases sont représentées chez les six espèces étudiées par des formes moléculaires (profils électrophorétiques) différentes.

Un dosage immunoélectrophorétique et un dosage radioimmunologique ont été mis au point afin de mesurer les variations de la quantité de trypsine de l'hépatopancréas de *Penaeus japonicus* au cours des cycles biologiques.

Au cours du développement larvaire, les activités et les quantités de trypsine présentent un maximum au stade zoé. L'évolution des activités des protéases au cours de la croissance ne montre pas de discontinuité. Au cours du cycle d'intermue, les activités des protéases digestives et les quantités de trypsine présentent une valeur maximale au stade D<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Une augmentation de la température d'acclimatation des animaux provoque une augmentation des activités spécifiques des protéases liées à une modification des paramètres cinétiques dans le cas de la trypsine, et un changement quantitatif d'isoenzymes dans le cas de la leucine aminopeptidase. Les variations de la salinité ne modifient ni les activités spécifiques, ni les quantités de trypsine, ni les spectres électrophorétiques de différentes protéases.

Chez *Palaemon serratus*, la purification de l' $\alpha$ -amylase par chromatographie d'affinité a permis d'obtenir un anticorps, dont les réactions sont nulles avec l' $\alpha$ -amylase de bactérie et de porc, et faibles avec celles d'*Astacus*, *Homarus* et *Cancer*.

Dans l'hépatopancréas, l' $\alpha$ -amylase est localisée dans les cellules sécrétrices, d'absorption et fibrillaires mais aussi dans les hémocytes.

---

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES,

Laboratoire de Biochimie et Ecologie des Invertébrés marins.

1. Station marine d'Endoume, URA CNRS N° 41, 13007 MARSEILLE

2. Centre de Biochimie macromoléculaire du CNRS, B.P. 5051, 34033, MONTPELLIER

3. Laboratoire de Biologie marine du Collège de France, B.P. 38.

29110 CONCARNEAU

Les activités enzymatiques sont liées à des sécrétions de certains facteurs hormonaux.

En été, durant le cycle d'intermue, le taux de l'isoenzyme de l'amylase augmente deux fois entre l'intermue et la prémue. Son maximum est atteint au stade D', alors que l'activité maximale de l' $\alpha$ -amylase est atteinte au stade D". En hiver, aucune variation significative n'a été mesurée.

A partir d'extraits des pédoncules oculaires totaux ou de glande du sinus, trois fractions hyperglycémiques sont différenciées par électrophorèse, ayant respectivement des poids moléculaires d'environ 20.000, 8.000 et 2.500 daltons.

Chez *Homarus gammarus*, les activités enzymatiques digestives ne sont pas les mêmes lorsque les aliments avec lesquels ils sont nourris ont des compositions différentes. Pour un aliment contenant 35 % de protéines, les activités amyliques et protéasiques digestives, les teneurs en ADN et en ARN de l'hépatopancréas sont maximales, ainsi que la teneur en protéines totales de l'animal entier.

#### S U M M A R Y

Proteolytic enzymes of hepatopancreas of six species of Peneids (*Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis* and *P. vannamei*) have been studied. Some of their physiological variations have been characterized.

In *P. kerathurus* hepatopancreas, trypsin, chymotrypsin, leucine-aminopeptidase and carboxypeptidase A and B exist, as well as collagenase and a low molecular weight protease. Their physico-chemical and catalytic properties of these enzymes are close to those described in other zoological groups. Main proteases are characterized in the six species by different electrophoretic patterns.

Immuno-electrophoretic and radioimmunologic measurements have been used to measure trypsin variations in *P. japonicus* hepatopancreas during their biological cycles.

During larval development, activities and trypsin quantities are maximum during zoea stage. Evolution of proteases activities during the growth does not show any discontinuity. During moult cycle, activities of digestive proteases and quantities of trypsin show maximal values at D<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stages.

Increase in acclimation temperature of crustacean enhance increase of specific activities of proteases related to kinetic parameters variations in the case of trypsin, and to quantitative changes of isoenzymes in the case of leucine aminopeptidase. Variations of salinity does not modify specific activities, nor quantities of trypsin, nor electrophoretic patterns of these different proteases.

In *Palaemon serratus*, purification of  $\alpha$ -amylase by affinity chromatography have been completed; this amylase have no reaction with bacteria and pork  $\alpha$  amylases, and weak reaction with *Astacus*, *Homarus* and *Cancer*  $\alpha$ -amylases.

In *P. serratus* hepatopancreas,  $\alpha$ -amylase is located in secretory, absorption and fibrillar cells, and also in hemocytes. Enzymatic activities are linked to secretion of some hormonal factors.

In summer, during moult cycle, isoenzyme level of amylase increases.

From total eyestalk or from sinus gland, three hyperglycemic fractions have been differentiated by electrophoresis, having molecular weight near 20,000, 8,000 and 2,500 daltons.



In *Homarus gammarus*, digestive enzymatic activities are not the same when they are fed with different compound diets. For a food containing 35 % proteins, maximal values are measured for digestive amylase and proteases, for hepatopancreas DNA, RNA and for total protein content of animal.

**M O T S - C L E S :** *Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *Palaemon serratus*, *Homarus gammarus*, enzymes digestives, trypsine, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A et B, cycle d'intermue, croissance, développement larvaire, endocrinologie, glande du sinus, aliments composés.

**KEY WORDS :** *Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *Palaemon serratus*, *Homarus gammarus*, digestive enzymes, trypsin, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A and B, moult cycle, growth, larval development, endocrinology, sinus gland, compound diets.

## I. INTRODUCTION

Chez les Invertébrés marins, les facteurs du milieu jouent un rôle très important sur les fonctions physiologiques, comme la croissance, la reproduction ou la nutrition. Leur action peut être soit globale, jouant un rôle sur le métabolisme général des organismes, soit très spécifiques en passant par le relais des récepteurs, du tissu nerveux, de neurosecrétions, d'hormones et de modifications d'activités au niveau macromoléculaire dans les organes cibles.

En aquiculture, la mise au point des techniques d'élevage, et l'amélioration des performances de production passe par une bonne adaptation des aliments composés aux caractères physiologiques des espèces que l'on élève, et en particulier aux capacités de gestion de leurs enzymes digestives.

Il est donc indispensable de bien connaître d'une part les caractéristiques de ces enzymes purifiées, d'autre part, les variations et les modifications de leurs activités lorsque les conditions du milieu extérieur varient.

Les régulations des synthèses des enzymes digestives et le contrôle de leurs activités ne sont pas identiques selon les crustacés considérés, même à l'intérieur du groupe des Décapodes.

Aussi faut-il que des progrès soient réalisés sur ces divers plans indissociables les uns des autres.

Les enzymes digestives voient ainsi leurs activités affectées à chaque étape de leur croissance par les facteurs du milieu comme la température, la photopériode, la longueur d'onde ou l'intensité de la lumière.

Mais les animaux étudiés subissent également une évolution propre, en fonction de leur âge, et, suivant l'étape considérée de leur développement, les facteurs du milieu vont agir sur eux de façon différente.

## 2. PROTEASES DES CREVETTES PENEIDES

### 2.1. Propriétés des protéases

La trypsine représente l'élément majeur des enzymes protéolytiques digestives ; chez toutes les crevettes pénéides étudiées, son évaluation à l'aide d'inhibiteurs spécifiques indique qu'elle représente plus de 50 % des activités protéolytiques. Elle constitue 5 à 6 % de l'ensemble des protéines solubles de l'hépatopancréas. Les extraits bruts de trypsine peuvent être différenciés en 4 ou 5 isoenzymes. La trypsine a été purifiée par gel filtration, par chromatographie d'affinité et par chromatographie d'échange d'ions. La trypsine purifiée montre 6 formes moléculaires, dont les poids moléculaires sont identiques et voisins de 25.000 daltons.

Un anticorps préparé contre un extrait purifié de trypsine montre que le site antigénique de ces différentes isoenzymes est le même pour chacune d'elles, ou au moins qu'il en est très voisin.

La leucine aminopeptidase montre 2 isoenzymes.

Deux carboxypeptidases A et B, de poids moléculaire 35.000 et une protéase de faible poids moléculaire, 11.000 daltons ont été mises en évidence.

Une collagénase a été mise en évidence.

Il n'existe pas d'activité élastasiques.

Malgré les taux d'activité et des propriétés comparables les principales enzymes sont représentées chez les différentes espèces de Pénéides par des formes moléculaires différentes. Ce fait est mis en évidence par leurs profils électrophorétiques différents.

La trypsine de *P. japonicus* a été purifiée par gel filtration, chromatographie d'affinité et chromatographie d'échange d'ions. Six isoenzymes ont été mises en évidence. Elles ne forment qu'une seule bande en électrophorèse en milieu dissociant (SDS).

Les propriétés catalytiques de l'enzyme pure sont similaires à celles d'origine bovine à l'exception de la stabilité. L'enzyme de *P. japonicus* est en effet dénaturée dans les conditions optimales de stabilité de la trypsine bovine. Un immunosérum antitrypsine a été préparé par injection de 1,5 mg d'antigène chez le lapin.

La spécificité de l'immunosérum a été recherchée par différentes techniques (OUCHTERLONY, immuno électrophorèse en "rocket", transfert électrophorétique sur DEAE cellulose). Chaque isoenzyme réagit avec l'immunosérum.

## 2.2. Trypsine chez différentes espèces

Les trypsines extraites de plusieurs espèces de Crustacés ont des structures qui semblent être voisines dans la mesure où leurs sites antigéniques sont voisins. Les immunosérums obtenus à partir de la trypsine de *Penaeus japonicus* réagissent avec les extraits enzymatiques d'autres Crustacés étudiés. Les Pénéides *Penaeus merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. kerathurus*, montrent des réactions positives.

L'étude des relations croisées chez différentes espèces a montré que l'antisérum réagissait avec des extraits bruts des autres Pénéides, à l'exception de *P. monodon*. Dans le cas d'autres crustacés, l'immunosérum réagit avec les extraits brut d'*Athyphaera* (Caridés) et *Eupagurus* (Anomoures). L'utilisation d'antigènes purifiés et concentrés a permis de montrer que la réaction croisée existait avec les trypsines de Copépodes. La concentration en antigène est donc un facteur limitant l'intensité de la réaction.



Une méthode de dosage immunochimique par "rocket" immunoélectrophorèse a été mise au point afin d'aborder les études globales (tous isoenzymes confondus), ceux-ci étant complémentaires des dosages d'activité, et aborder plus tard l'étude d'autres espèces.

### 2.3. Etude des protéases digestives au cours des cycles physiologiques

L'évolution des activités des protéases au cours de la croissance montre une discontinuité vers 3 - 3,5 g. Cette variation pourrait être expliquée par un changement de régime alimentaire ou par l'apparition des caractères sexuels secondaires.

Au cours du cycle d'intermue, les activités des protéases digestives présentent deux maxima aux stades C<sub>3</sub>C<sub>4</sub> et D<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Les mesures immunoquantitatives de la trypsine montrent que pour cette enzyme, les variations d'activités sont dues à des modifications de la quantité d'enzymes présentes.

L'influence des facteurs du milieu a été étudiée.

L'augmentation d'activité de la trypsine quand la température augmente est expliquée par des modifications des constantes cinétiques, en particulier une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Pour la leucine amino-peptidase, on observe le renforcement d'une isoenzyme par rapport à l'autre quand la température s'élève.

Les variations de la salinité ne modifient ni les activités, ni les quantités de trypsine, ni les spectres électrophorétiques des différentes protéases.

### 3. ACTION DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE TRYPSIQUE

L'effet de la température sur l'activité trypsique a été mesuré sur l'enzyme purifiée à partir d'animaux acclimatés à 17°C et 29°C. Les résultats sont présentés à la figure 1. La courbe d'évolution de l'activité trypsique mesurée en relation avec la température présente un profil similaire dans les deux cas avec un optimum proche de 50°C.

L'activité de la trypsine purifiée a été également mesurée à 20°C après incubation pendant 15 mn à différentes températures. Les résultats sont similaires pour les trypsines d'animaux acclimatés aux deux températures (voir Fig. 2). L'enzyme présente en effet dans les deux cas une perte irréversible de l'activité entre 40°C et 50°C.

#### 3.1. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la température d'acclimatation

Le tableau I représente les variations du poids de l'hépatopancreas par rapport au poids total de l'animal et les variations de la concentration en protéines solubles de l'hépatopancreas en fonction de la température d'acclimatation.

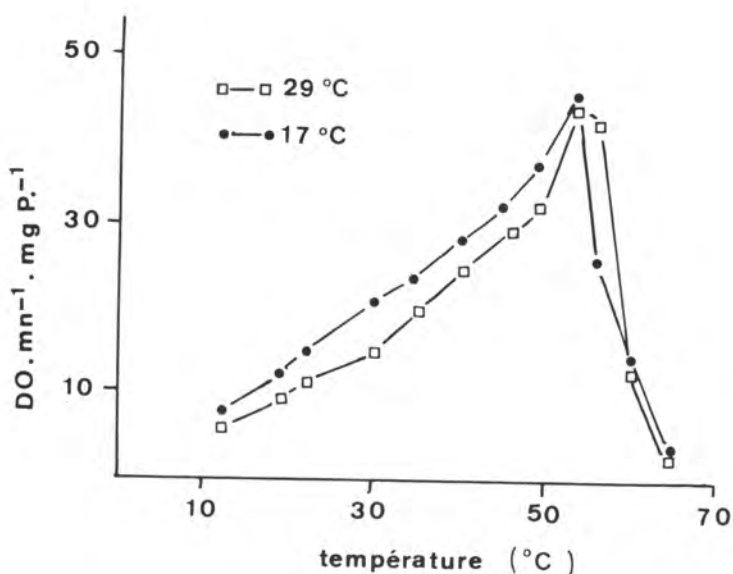


Figure 1 : Action directe de la température sur l'activité de la trypsine de Penaeus japonicus purifiée chez des animaux acclimatés à 17°C (●—●) et 29°C (□—□)

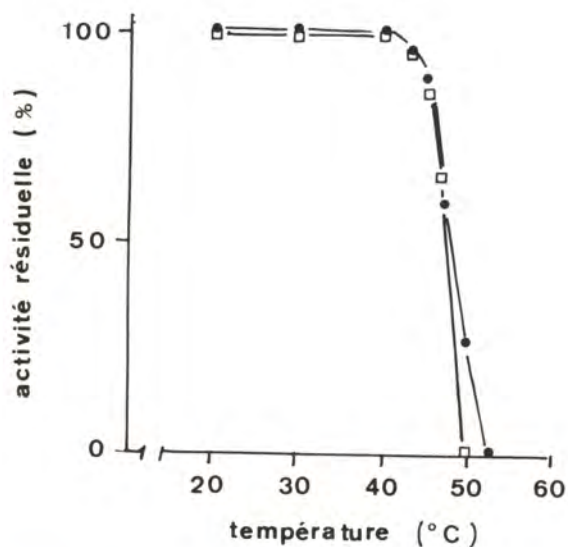


Figure 2 : Stabilité de la trypsine de Penaeus japonicus à la température. L'enzyme, purifiée chez des animaux acclimatés à 17°C (●—●) et 29°C (□—□), est incubée pendant 15 mn à différentes températures avant la mesure d'activité réalisée à 20°C .



Tableau I : Variations du poids de l'hépatopancréas et des protéines solubles en fonction de la température d'acclimatation

Températures	17°C	21°C	25°C	29°C
Poids hépatopancréas	0,034±0,0018	0,034±0,0038	0,032±0,0025	0,034±0,0021
Poids frais total				
Protéines solubles	11,12±1,41	11,11±1,86	10,57±1,02	11,23±1,22

Aucune variation importante n'est observée quand la température d'acclimatation des animaux varie.

Les activités spécifiques de la protéolyse globale, de la trypsine, de la leucine aminopeptidase et des carboxypeptidases A et B ont été mesurées sur les extraits d'hépatopancréas des crevettes acclimatées aux quatre différentes températures. Pour toutes les enzymes étudiées, on observe une augmentation de l'activité spécifique liée à une augmentation de la température. Les valeurs de  $Q_{10}$  calculées à partir des résultats présentés à la figure 3 sont 1,28 pour l'activité protéolytique globale, 1,71 pour l'activité trypsique, 2,18 pour l'activité de la leucine aminopeptidase et respectivement 2,49 et 2,41 pour les activités des carboxypeptidases A et B. Inversement, les quantités de trypsine de l'hépatopancréas, exprimées en pourcentage des protéines solubles ne varient pas au cours de l'acclimatation thermique.

### 3.2. Modifications des paramètres cinétiques de la trypsine

Les variations d'activité trypsique n'étant pas liées à des changements de la concentration d'enzyme, nous avons recherché des modifications des paramètres cinétiques de l'enzyme. Les résultats, présentés à la figure 4, montrent que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est maximale ( $K_m$  minimal) pour une température proche de la température d'acclimatation. Par ailleurs, la valeur minimale de  $K_m$  de la trypsine des animaux acclimatés à 29°C est inférieure à la valeur minimale du  $K_m$  de la trypsine d'animaux élevés à 17°C. Les énergies d'activation ont des valeurs de 7,61 kcal moles<sup>-1</sup> et 9,46 kcal moles<sup>-1</sup> pour les trypsines de crevettes respectivement élevées à 17°C et 29°C. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.3. Etude électrophorétique des protéases au cours de l'acclimatation thermique

Les résultats obtenus par électrophorèse montrent qu'il n'y a pas de différence entre les profils électrophorétiques des protéines solubles, de la trypsine et de la carboxypeptidase A des animaux respectivement acclimatés à 17° et 29°C. Pour la leucine aminopeptidase, la première isoenzyme est quantitativement plus importante que la deuxième (fig. 5) pour des animaux élevés à 17°C.

### 3.4. Discussion

Le choix de la durée d'acclimatation est basé sur les résultats obtenus par plusieurs auteurs ( Haschenmeyer, 1969 ; Dall, 1975 ; Van Wormhoudt, 1980) pour lesquels une période d'acclimatation de trois semaines paraît suffisante pour un retour des fonctions physiologiques à un état stable.

L'évolution des activités enzymatiques au cours de l'acclimatation thermique et les valeurs de  $Q_{10}$  observées permettent de penser que la compensation métabolique est partielle (Prosser, 1974). Dans le cas de la trypsine, la température n'affectant pas le renouvellement de l'enzyme, la compensation métabolique n'est pas due à une

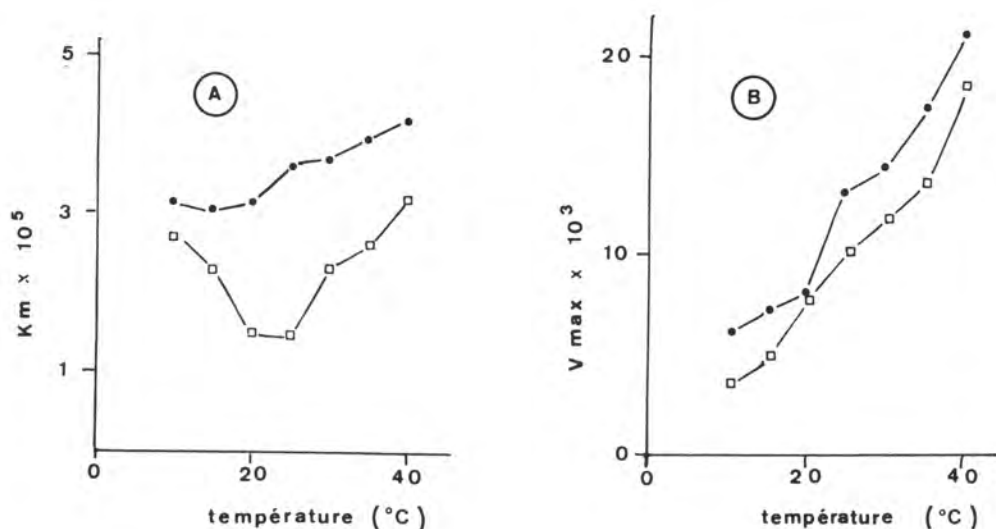


Figure 4 : Variation des paramètres cinétiques de la trypsine purifiée à partir des crevettes *Penaeus japonicus* acclimatées à 17°C (●—●) et 29°C (□—□).  
 (A) constante d'affinité apparente (Km)  
 (B) vitesse maximale d'hydrolyse du substrat (Vmax)

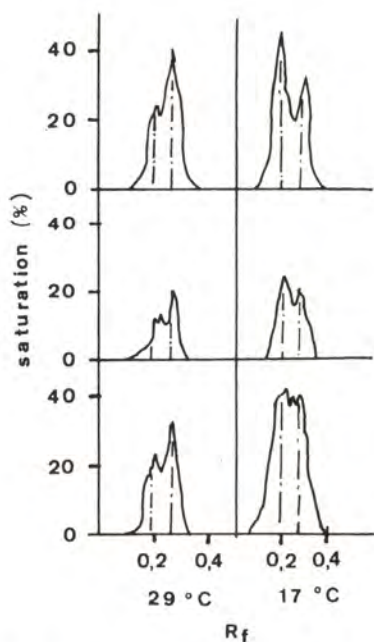


Figure 5 : Etude des isoenzymes de la leucine aminopeptidase de *Penaeus japonicus* en fonction de la température d'acclimatation. Enregistrements densitométriques (densitomètre VERNON) des gels après électrophorèse et révélation spécifique de l'enzyme



modification de la concentration de trypsine comme cela a été démontré pour d'autres enzymes (Haschenmeyer et Persell, 1973) mais le fait d'un changement des propriétés catalytiques de l'enzyme. Des résultats antérieurs ont montré que les modifications de la capacité catalytique peuvent être le fait de formes enzymatiques multiples (Baldwin et Hochachka, 1970 ; Somero, 1975) ou de variations conformationnelles (Somero, 1969 ; Low et Somero, 1976). Dans le cas de *Penaeus japonicus* aucune modification du spectre isoenzymatique n'est observée. Bien que les trypsines d'animaux élevés à deux températures différentes présentent les mêmes propriétés pour la stabilité, des modifications de structure tertiaire de l'enzyme pourraient expliquer les variations des paramètres cinétiques.

L'affinité maximale de l'enzyme correspond à une température proche de la température d'acclimatation des animaux. Ce résultat est identique à ceux obtenus pour la trypsine et la chymotrypsine de l'actinie *Actinia equina* (Van Praet, 1982), pour l'amylase de *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980) et pour la lactico-déshydrogénase de *Palaemon serratus* (Thébault et al., 1980) et de la truite *Salmo gairdneri* (Hochachka et Somero, 1968)..

Les résultats obtenus pour les énergies d'activation sont en accord avec ceux de Hochachka et Somero (1971) pour lesquels il n'y a pas de relation entre les énergies d'activation des enzymes et la température d'acclimatation des animaux.

Pour la leucine aminopeptidase, les mécanismes de compensation de l'activité enzymatique semblent liés au taux de synthèse différentiel des isoenzymes. Ce résultat est proche de celui obtenu par Guerin et Kerambrun (1982) pour la leucine amino-peptidase de l'annélide *Scololepsis fuliginosa*. Des mesures des paramètres cinétiques de chaque isoenzyme permettraient peut-être de mettre en évidence l'existence d'isoenzyme "froide" ou "chaude" comme cela a été décrit pour les pyruvate-kinases de plusieurs espèces (Low et Somero, 1976).

#### 4. ACTION DE LA SALINITE SUR L'ACTIVITE TRYPSIQUE

Peu de travaux décrivent l'influence de la salinité du milieu ambiant sur les activités enzymatiques des crustacés. Emerson (1967) a montré que les activités spécifiques de la glutamate déshydrogénase, la glutamate pyruvate transaminase et la glutamate oxaloacétate transaminase de *Artemia salina* ne suivent pas les variations de salinité du milieu ambiant. Plus récemment, Hand et Conte (1982) ont montré que l'activité spécifique et la quantité de malate déshydrogénase de la même espèce augmentaient quand la salinité augmentait.

Le présent travail concerne les variations des activités protéasiques, des quantités de trypsine et des profils électrophorétiques des protéases en fonction de la salinité du milieu ambiant.

Quatre lots de 8 animaux sont acclimatés à différentes salinités (19, 25, 31 et 37 ‰). L'adaptation est réalisée sur une période de 4 j, par addition d'eau douce courant préalablement déchlorée par bullage (24h). Les salinités sont contrôlées à l'aide d'un réfractomètre. La durée de l'expérience est de 20 j. Les quantités de trypsine sont mesurées par immunoélectrophorèse quantitative.

Les variations du poids frais de l'hépatopancréas par rapport au poids frais total des animaux et les concentrations des protéines solubles de l'hépatopancréas ont été étudiées en fonction de quatre salinités. Les résultats sont représentés dans le Tableau II.

Tableau II : Variations du poids de l'hépatopancréas et des protéines solubles en fonction de la salinité.

Salinité (en p.1000)	19	25	31	37
Poids hépatopancréas Poids frais total	0,035±0,0025	0,035±0,0026	0,036±0,0040	0,037±0,0044
Protéines solubles	9,79±1,16	10,95±1,19	10,86±1,08	12,78±1,24

On observe une baisse de la concentration des protéines solubles de l'hépatopancréas pour des faibles salinités.

Ce résultat est identique à celui obtenu pour *Artemia salina* (Conte *et al.*, 1973).

Les activités protéolytiques globales, trypsiques, leucine aminopeptidasiques et carboxypeptidasiques, mesurées sur des extraits d'animaux élevés à quatre salinités différentes, ne présentent pas de variation. Parallèlement, la quantité de trypsine, exprimée en pourcentage des protéines solubles, reste constante (fig. 6).

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de modification importante des profils électrophorétiques des protéines solubles, de la trypsine, de la leucine aminopeptidase et de la carboxypeptidase A quand la salinité du milieu varie.

## 5. L' $\alpha$ -AMYLASE CHEZ *Palaemon serratus*

### 5.1. Propriétés

L' $\alpha$ -amylase a été purifiée à partir de l'hépatopancréas par chromatographie sur une colonne d'amidon réticulé. L' $\alpha$ -amylase se présente sous la forme de 3 isoenzymes dont l'une  $\alpha$ -2 est largement dominante et représente 90% de l'activité de l'enzyme. La composition en acides aminés de l' $\alpha$ -amylase purifiée est comparable à celle de l' $\alpha$ -amylase de mammifère, mais elle est légèrement déficiente en acides aminés soufrés, la cystéine en particulier.

Un anticorps anti $\alpha$ -amylase de *Palaemon serratus* a été préparé chez le lapin mâle de race New Zealand, avec l'adjuvant complet de Freund, après 3 rappels. Ses réactions sont nulles avec l' $\alpha$ -amylase de bactérie ou de porc. Elles sont très faibles avec celles de l'écrevisse *Astacus leptodactylus*, du homard *Homarus gammarus* du crabe *Cancer pagurus*.

### 5.2. Localisation

La localisation de l' $\alpha$ -amylase a été réalisée également par la méthode de la peroxydase-antiperoxydase dans les cellules des tubules de l'hépatopancréas. L' $\alpha$ -amylase se présente au microscope optique sous forme de granules. Elle est localisée dans les 3 types de cellules différenciées : fibrillaire, absorbantes et sécrétrices, alors qu'elle est absente dans les cellules embryonnaires. Les granules sont généralement localisés dans le cytoplasme, bien qu'il en existe aussi dans les vacuoles.

### 5.3. Rôle des facteurs du milieu

L'activité de l' $\alpha$ -amylase dépend, surtout *in vitro*, de la teneur en Na Cl qui entraîne des changements de propriétés de l'enzyme modifiant les valeurs de la



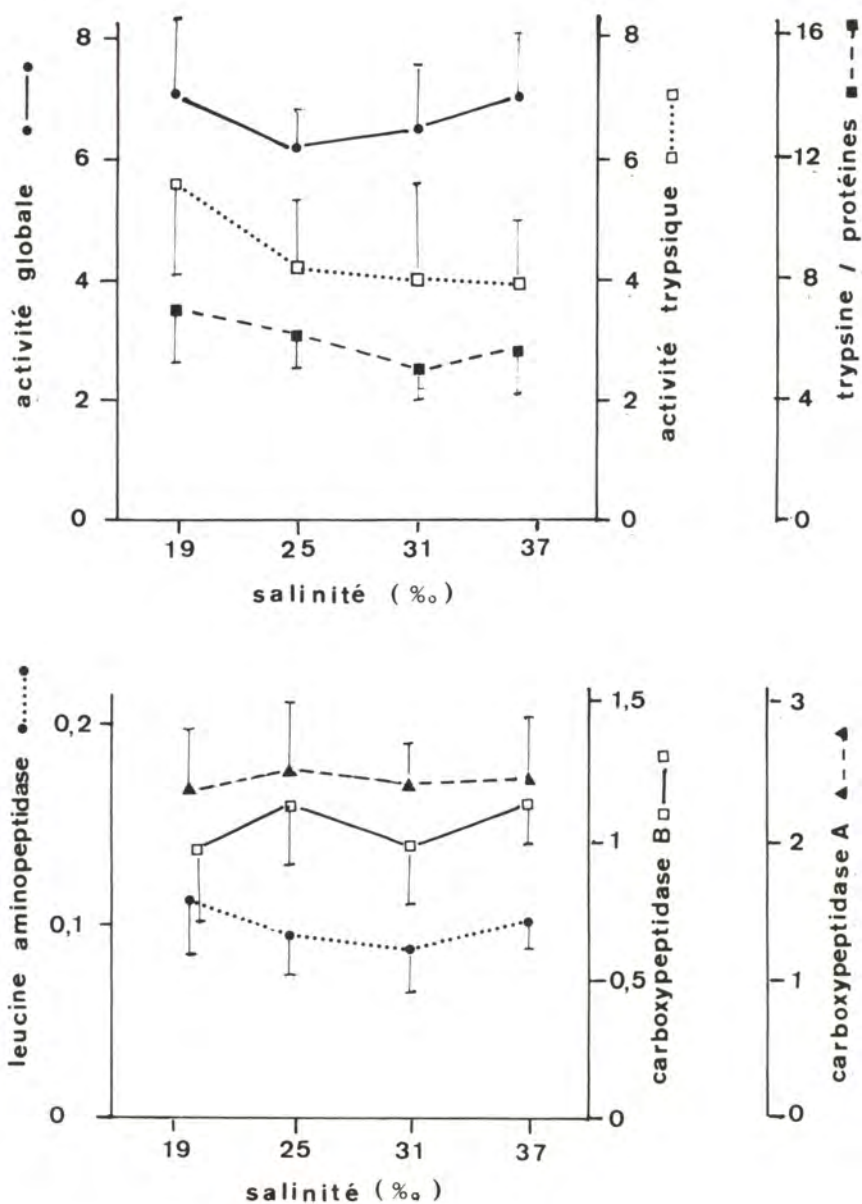


Figure 6 : Activités spécifiques des protéases digestives de Penaeus japonicus acclimatées à différentes salinités .  
 Les résultats sont des valeurs moyennes ( $\bar{x} \pm t Sm, \alpha = 0,05$ ) obtenues sur 8 animaux

constante de Michaelis.

Par ailleurs, l'affinité de l'enzyme pour son substrat est maximal à une température de mesure voisine de la température d'adaptation.

La température du milieu agit non seulement sur les propriétés cinétiques de l' $\alpha$ -amylase mais également en compensant partiellement l'augmentation de la synthèse des protéines lors de l'adaptation au chaud.

Le facteur trophique est responsable de l'induction de la synthèse des enzymes chez les larves. D'autre part, chez les adultes, l'activité des amylases et des protéases est modulée par le régime alimentaire. Elle est maximale pour une teneur en amidon du régime de 2,5 %, et une teneur en protéines de 45 % ( voir Tableau III).

Tableau III : Variation de l'activité spécifique de protéases (a) et des amylases(b) en fonction du pourcentage de protéines et de glucides consommables de l'alimentation chez *Palaemon serratus*.

% protéines (a)	0,25	6,5	25,8	36	45	53-56	63
Protéases spécifiques	1,7 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,4	3,5 ± 0,7	3,9 ± 0,6	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5

% glucides consommables (b)	0,1	0,3	0,6	2,8	5,6	9,4	10,5	20,5	51,6	80
Amylases spécifiques	3,2 ± 0,9	3,8 ± 0,6	4,8 ± 0,4	5,4 ± 1,4	5,2 ± 0,7	4,6 ± 0,5	4,3 ± 0,6	3,9 ± 0,6	4,1 ± 1,7	2,3 ± 0,7

Les expériences sont réalisées sur des juvéniles de 1 cm pêchés au mois de mai à Concarneau. Elles durent 3 semaines à 17°C.

#### 5.4. Rythme circadien d'activité enzymatique

Chez les larves du stade 1 qui ne se nourrissent pas, il n'y a pas de rythme circadien de variation des enzymes digestives. Par contre, au stade zoé 4, le rythme possède les mêmes caractéristiques que celles décelées chez l'adulte. Les variations d'amplitude sont importantes (30 - 40 %). Ces dernières sont encore plus fortes au stade post-larvaire et juvénile (70 % environ). Le rythme est à tendance générale diphasique.

#### 5.5. Contrôle hormonal des synthèses enzymatiques

Trois approches ont été envisagées pour mettre en évidence le contrôle hormonal. D'une part l'ablation de glandes endocrines, d'autre part la mesure de certaines



hormones peptidiques par immunocytochimie.

Chez les larves, seule l'ablation des pédoncules oculaires a pu être réalisée : à partir des derniers stades zoés il y a inhibition de l'activité spécifique des amylases. Les protéases semblent moins affectées. L'existence d'un facteur stimulateur de la synthèse des amylases est donc probable chez les larves de stade 7. Des expériences d'injection et de purification sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Une mesure du taux des ecdystéroïdes a été effectuée dans les pédoncules oculaires et dans le reste du corps. Ce taux est très élevé au stade zoé 1 et diminue fortement par la suite. Par contre, la concentration augmente dans le reste du corps (tableau IV).

La localisation de l'hormone hyperglycémiant par immunocytochimie a pu être réalisée dans la glande du sinus et de quelques cellules neuroendocrines dès le stade zoé 4.

Tableau IV : Variation de la concentration en ecdystéroïde dans les pédoncules oculaires au cours du développement larvaire de *Palaemon serratus*

\* Valeur variable au cours du cycle d'intermue, 180 pg/mg poids sec représentant la valeur optimale obtenue en fin de prémue (Van Wormhoudt, 1980). La spécificité de l'antisérum utilisé est de 100 % pour l'ecdysone ou l'ecdystérolone ; 52 % pour l'inokostérolone, 2 % pour la makistérolone et très faible pour les autres ecdystéroïdes.

nd = non déterminé.

Stades larvaires	pg/mg poids sec	
	Pédoncules oculaires	Reste du corps
Zoé 1	450	475
Zoé 4	134	208
Zoé 5	34	85
Post-larves	14	50
Adulte	0 - 180 *	nd

#### 5.6. Variations au cours du cycle d'intermue

Au cours de l'année, les variations observées au cours du cycle d'intermue sont les plus marquées durant les mois de fin de printemps et les mois d'été. L'activité des enzymes digestives présente alors deux maximums, l'un au stade B<sub>2</sub> - C et l'autre au stade D<sub>1</sub>' - D<sub>2</sub>. Ces maximums dépendent des facteurs trophiques et des facteurs hormonaux décrits en 5.3., 5.4. et 5.5., qui sont eux-mêmes sous le contrôle des facteurs du milieu. Au niveau cellulaire, une séquence des événements a pu être établie entre la teneur en ADN, en ARN et en protéines au niveau du cytoplasme

et du noyau.

#### 6. ENZYMES DIGESTIVES CHEZ *Homarus gammarus*

Six aliments composés, présentés sous forme de granulés secs, et contenant différents taux de protéines (farines de poissons et de crustacés, gluten de blé) : de 21,8 à 45,5 %, sont testés sur six lots de 100 homards juvéniles, ayant atteint le stade VIII, et élevés individuellement.

Les meilleures croissances, pondérale et linéaire, sont obtenues avec un régime contenant au moins 35 % de protéines. La teneur en ADN et le rapport poids frais/ADN montrent que les animaux nourris avec l'aliment contenant 36,6 % de protéine, ont la meilleure croissance au niveau cellulaire, due plus à l'hyperplasie qu'à l'hypertrophie. La teneur en ARN et en protéines totales de l'individu entier confirment ces résultats. Le rapport ARN/ADN, qui est un indice de l'activité cellulaire, est meilleur pour ce lot : 2,1 après 146 jours.

Les mesures effectuées sur l'hépatopancréas, et en particulier les activités spécifiques des protéases et des amylases digestives aboutissent aux mêmes conclusions.

Au cours de cette expérience une relation inverse entre la décoloration des homards et la teneur en protéines du régime alimentaire a pu être observée.

#### 7. CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus chez les Pénéides concernant l'influence des facteurs externes sur les activités protéasiques montre que :

- l'activité d'une enzyme n'est pas nécessairement liée à la quantité d'enzyme. Elle fait intervenir des mécanismes de régulation qui peuvent être différents des changements de concentration.

- les mécanismes de régulation sont propres à chaque activité enzymatique. Ainsi, pour l'action de la température, la régulation de l'activité trypsique s'effectue par des modifications des capacités catalytiques de l'enzyme alors que la régulation de l'activité leucine aminopeptidasique semble s'effectuer par des changements quantitatifs d'isoenzymes.

- la salinité ne semble pas affecter spécifiquement les activités protéasiques digestives mais l'ensemble des protéines solubles.

Ces résultats montrent que les facteurs externes n'affectent pas tous les protéases digestives. L'étude d'autres facteurs externes tels que l'intensité lumineuse du milieu, la photophase et surtout l'alimentation doit apporter des renseignements complémentaires concernant les mécanismes de régulation intervenant dans la digestion des protéines (Ceccaldi, 1982).

REMERCIEMENTS : Cette étude a été réalisée dans le cadre du contrat de l'ATP mixte CNRS-CNEXO Bases biologiques de l'aquaculture 82/2773.

Nous tenons à remercier le CNRS et le CNEXO pour leur aide matérielle dans la réalisation de ces travaux.



- BALDWIN J. et HOCHACHKA W. 1970 - Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatation : acetyl cholinesterase from trout brain. *Biochem. J.* 244, p. 4480-4489.
- CECCALDI H.J. 1982 - Contribution of physiology and biochemistry to progress in aquaculture. *Bull. Japan. Soc. Fish.* 48 (8), p. 1011-1028.
- CONTE F. , PETERSON G. et EWING R. 1973 - Larval salt gland of *Artemia salina* nauplii : regulation of protein synthesis by environmental salinity. *J. Comp. Physiol.*, 82, p. 277-289.
- DALL W. 1975 - Indices of nutritional state in the western rock lobster *Palinurus longipes* (Milne edwards). II : Gastric fluid constituents. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.*, 18, p. 1 - 18.
- EMERSON D.N. 1967 - Some aspect of free aminoacid metabolism in developping encysted embryos of *Artemia salina* the brine shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 20, p. 245-261.
- GUERIN J.P. et KERAMBRUN P. 1982 - Effet à court et moyen terme de chocs thermiques et influence de la cinétique de décroissance de la température consécutive au choc sur l'activité de la leucine aminopeptidase chez *Scalolepis fuliginosa* Clarapède (Annelida, Polychaeta). *J. exp. Mar. Biol. Ecol.*, 64, p. 271-286.
- HAND S. et CONTE F. 1982 - Larval brine shrimp malate deshydrogenase biosynthesis and temporal pattern related to environmental salinity. *J. exp. Zool.*, 219, p. 17-27.
- HASCHENMEYER A. 1969 - Studies on the control of protein synthesis in low temperature acclimatation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28, p. 535-552.
- HASCHENMEYER A. et PERSELL R. 1973 - Kinetic studies on aminoacid uptake and protein synthesis in liver of temperature acclimated toadfish. *Biol. Bull.* 145, p. 472-481.
- HOCHACHKA P. et SOMERO G. 1968 - The adaptation of enzymes to temperature *Comp. Biochem. Physiol.*, 27, p. 659-668.
- HOCHACHKA P. et SOMERO G. 1971 . Biochemical adaptation to the environment. *Fish physiology*, vol 6, Acad. press. N.Y.
- LOW P. et SOMERO G. 1976 - Adaptation of muscle pyruvate kinase to environmental températures and pressures. *J. exp. Zool.*, 198, p. 1-12.
- LUCIEN-BRUN H., Van WORMHOUDT A., LACHAUX A. et CECCALDI H.J. (1984). Effets de régimes composés sur la croissance de homards juvéniles *Homarus gammarus* L; estimation biochimique de la composition optimale du régime alimentaire en protéines. *Aquaculture* (sous presse)
- PROSSER C. 1974 - Température. *Comparative Animal Physiology*, III<sup>rd</sup> ed., SAUNDERS, Philadelphia, p. 362-428.
- SOMERO G. 1969 - Pyruvate kinase variants of the alaskan king crab. *Biochem. J.*, 114, p. 237-241.
- THEBAULT M:T., BERNICARD A. et Le GAL Y. 1980 - Effect of acclimatation temperature on lactate deshydrogenase activity in *Palaemon serratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65 (B), p. 357-361.
- Van PRAET 1982 - Amylase and trypsin - and chymotrypsin - like proteases from *Actinia equina* L.; their role in the nutrition of the sea anemone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72 (A), p. 523-528.
- Van WORMHOUDT A. 1980 - Adaptations des activités digestives, de leurs cycles et de leur contrôle, aux facteurs du milieu chez *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda Natantia). Thèse, université Aix-Marseille II, 351 pages.

# **POISSONS**

I

Reproduction - Génétique



DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES GONADOTROPINES DE POISSONS

B. BRETON, E. SAMBRONI, Y. ZOHAR

Lab. Physiologie des poissons-INRA-Av. Gl Leclerc-35042 RENNES Cédex

R E S U M E

La spécificité immunologique des gonadotropines de Poissons n'autorise généralement pas l'utilisation des systèmes de dosage radioimmunologique (RIA) homologues existant pour les GtH Carpe et Saumon, à la mesure concentrations de GtH hypophysaire et plasmatique d'autres espèces. L'emploi d'un système de dosage utilisant un anticorps dirigé contre la sous-unité  $\beta$  de GtH de Carpe a cependant récemment permis le développement d'une méthode de dosage de la GtH d'Anguille (Dufour et al., 1983). Nous avons repris un travail similaire à partir de la sous-unité  $\beta$  de la GtH glycoprotéique maturante de Saumon, mais également étudié la possibilité d'employer des systèmes sous-unitaires mixtes Carpe - Saumon au dosage de la GtH dans des espèces où elle n'est pas encore purifiée. Dans ce but des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ont été purifiées à partir de GtH de Carpe et Saumon, et été utilisées pour la préparation des anticorps correspondants. L'analyse en liaison directe en compétition des comportements des différents antigènes iodés et des 6 anticorps confirme la spécificité zoologique importante des sous-unités de type  $\alpha$ . Par contre les systèmes mettant en jeu un composant de type  $\beta$  homologue ou hétérologue reconnaissant aussi bien les gonadotropines de Carpe et de Saumon et leurs sous-unités  $\beta$ . Les différentes liaisons anti (s.GtH -  $\beta$  s.GtH - c.GtH -  $\beta$  c.GtH) hormones iodées (s.GtH -  $\beta$  s.GtH - c.GtH -  $\beta$  c.GtH) ont été étudiées par rapport à leur déplacement par des extraits hypophysaires totaux ou des GtH partiellement purifiées de Brochets - Perche - Daurade - Tilapia - Anguille - Milkfish. Il a toujours été possible de trouver une ou plusieurs combinaisons antigène anticorps paraissant spécifiquement déplacées par chacune de ces préparations hypophysaires. La validation du dosage a été réalisée pour la GtH de Daurade pour laquelle il existe une bonne correspondance entre les activités des fractions obtenues après gel filtration des glycoprotéines hypophysaires totales, mesurées par RIA, et par un dosage biologique basé sur la stimulation de la production *in vitro* de 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogestérone par des follicules ovariens de Truite arc-en-ciel en présence d'un inhibiteur de la phosphodiesterase l'IBMX. Pour la Perche, bien que la réaction croisée ne soit que partielle, une mesure relative des niveaux de GtH apparaît possible. Une stimulation *in vivo* des niveaux plasmatiques hormonaux théoriques par du LH-RH et du LH-RHa confirme la nature gonadotrope du principe mesuré dans un système anti  $\beta$  s.GtH - c.GtH I<sup>125</sup>.

A B S T R A C T

The species specificity of fish gonadotropins generally does not allow the use of Carp and Salmonid homologous RIA systems for GtH measurement in other species. Recently, Dufour et al., (1983) have demonstrated the lack of specificity of a system directed against the  $\beta$  subunit of the Carp GtH, we have developed a similar system for the  $\beta$  subunit of the Salmon GtH, and equally studied the possibility offered by heterologous subunits system between Carp and Salmon to measure the GtH in several other species. Antibody against  $\alpha$  and  $\beta$  s.GtH from those two species have been developed. The species specificity of the two  $\alpha$  subunits has been confirmed after studying the direct bindings and competitions between the 6 iodinated antigens and the corresponding antibodies, but on the contrary the systems in which a homologous or heterologous  $\beta$  component is included recognized as well  $\alpha$  and s.GtH and their  $\beta$  subunits. Using the different combinations between anti s.GtH -  $\beta$  s.GtH - c.GtH -  $\beta$  c.GtH and the iodinated s.GtH -  $\beta$  s.GtH - c.GtH -  $\beta$  c.GtH, it has always been possible to find one or several which is specifically competed by partially purified pike and sparus GtH and pituitary extracts from perch - tilapia - eel milkfish. The validation of the assay has been done for sparus GtH after comparison with a bioassay developed for this gonadotropin.

MOTS CLES:Gonadotropine - Immunoessais

KEY WORDS:Gonadotropin - immunoassays



## INTRODUCTION

L'étude écophysiological des mécanismes de régulation de la fonction de reproduction des Poissons nécessite, entre autres outils méthodologiques, de disposer d'hormones gonadotropes purifiées (GtH) et de leur dosage radioimmunologique. Bien que ces outils aient été développés pour deux grandes familles, les Cyprinidés (Breton et al., 1971), et les Salmonidés (Crim et al., 1973; Breton et al., 1975), ils ne peuvent généralement pas être utilisés pour d'autres espèces à cause d'une spécificité zoologique qui intéresse aussi bien les propriétés immunologiques des GtH (Breton et al., 1972; Tan et Dodd 1978; Bye et al., 1980) que leurs activités biologiques (Breton et al., 1972; Fontaine et al., 1972). Dans les espèces marines éventuellement candidates à l'aquaculture intensive (Bar, Daurade, poissons plats...) seule la GtH d'un poisson plat, la plie américaine, a été isolée (Ng et Idler, 1978). Or la reproduction régulière de ces espèces élevées en captivité pose encore de nombreux problèmes (contrôle de la saison de ponte, déclenchement des mécanismes de maturation et d'ovulation au moment opportun, mécanisme de reversion sexuelle chez la Daurade par exemple...). L'étude de la dissociation des GtH de Carpe (Borzawa-Gérard, 1974) et de Saumon (Breton, 1981) a permis de montrer que, contrairement aux gonadotropines natives, leurs sous-unités de type  $\beta$  présentaient une spécificité immunologique relativement faible (Borzawa-Gérard et Kerdelhué, 1978; Dufour et al., 1979; Borzawa-Gérard et al., 1980). A partir de ces données, ces auteurs ont développé un dosage radioimmunologique hétérologue de la GtH de l'Anguille européenne *Anguilla anguilla* en utilisant un dosage radioimmunologique de la sous-unité  $\beta$  de la GtH de Carpe (Dufour et al., 1983). Dans le travail présent nous avons étudié les possibilités offertes par l'utilisation d'un système équivalent, préparé à partir de la GtH de Saumon, mais par des systèmes mixtes Carpe - Saumon pour la détection de la GtH dans des préparations hypophysaires d'origine zoologique très diverses dont la Daurade, pour laquelle les premiers stades de purification de la GtH ont également été définis, l'obtention de l'hormone purifiée étant un préalable à toute étude de l'action biologique spécifique d'une gonadotropine dans une espèce donnée.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. - Préparation des GtH de Carpe et de Saumon et de leurs sous-unités

Ces hormones ont été préparées par les techniques décrites précédemment pour la s-GtH (Breton et al., 1978) et ses unités (Breton, 1981). Elles ont servi à la préparation d'anticorps sur lapin. L'immunisation a été pratiquée par injection intradermique multipoints de 100  $\mu$ g de chaque préparation émulsionnée dans de l'adjuvant de Freund complet. Chaque lapin a reçu 5 injections espacées de 15 jours. Le sacrifice de l'animal a lieu 8 jours après la dernière injection. Deux anticorps ont été préparés contre la s-GtH - 2 contre l' $\alpha$ -s-GtH - 4 contre la  $\beta$ -s-GtH - 2 contre la c-GtH - 2 contre l' $\alpha$ -c-GtH et 3 contre la  $\beta$ -c-GtH.

### 2. - Techniques radioimmunologiques

La technique utilisée est identique à celle décrite précédemment pour la GtH de Carpe (Breton et al., 1971). Les marquages des 2 GtH et de leurs sous-unités sont réalisés à l'I<sup>125</sup> après oxydation par la Chbramine T, la purification des traceurs marqués est faite sur colonne d'ultrogel ACA 54 (0,9 x 30 cm). Les divers anticorps ont été titrés par étude de leur liaison aux antigènes radioiodés correspondant. Seul l'anticorps présentant le plus haut titre de travail a été retenu pour la poursuite du travail (50% de la liaison maximum).

anti	s-GtH	1/2	10 <sup>-5</sup>
anti	$\beta$ s-GtH		10 <sup>-5</sup>
anti	$\alpha$ s-GtH		10 <sup>-5</sup>
anti	c-GtH	1/3	10 <sup>-5</sup>



anti	$\beta$ c-GtH		$10^{-5}$
anti	$\alpha$ c-GtH	1/4	$10^{-4}$

Etude en liaison directe : La liaison de chacun des 6 antigènes radioiodés aux 6 types d'anticorps a été étudiée après une incubation de 24 heures à 4°C en tampon véronal 0.025 M pH 8.6 contenant 10% de BSA. Le complexe antigène - anticorps est séparé par immunoprécipitation à l'aide d'un sérum de mouton anti  $\gamma$  globulines de lapin préparé au laboratoire. Après incubation d'une nuit à 4°C, le précipité formé est séparé par centrifugation (1500 g) pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé par retournement des tubes et les précipités comptés dans un compteur autogamma 5110 PACKARD.

Etude en compétition : Le déplacement de la liaison à l'équilibre de chaque anticorps aux 6 antigènes radioiodés a été étudié pour les 6 anticorps différents par les 6 antigènes eux-mêmes et par des extraits hypophysaires d'Anguille européenne Anguilla anguilla, de Tilapia Sarothérodon mossambica, de Daurade Sparus auratus, de Milkfish Chanos chanos, et de Brochet Esox lucius, espèces présentant toutes un intérêt aquacole important. La compétition par des GtH partiellement purifiées de Brochet et Daurade a aussi été étudiée. Après incubation de 4 jours à 4°C le complexe hormone anticorps est séparé par la même technique que précédemment. Pour chaque facteur les caractéristiques de la courbe de compétition sont déterminées après transformation logit - log des résultats. Dans chaque système anticorps-antigène iodé, les pentes des courbes d'inhibition produites par chaque préparation hypophysaire ont été comparées à celle obtenue en présence de l'antigène froid correspondant par analyse de covariance selon Snedecor et Cochran (1957).

### 3. - Préparations hypophysaires

Les extraits hypophysaires bruts ont été préparés par broyage des hypophyses desséchées à l'acétone dans un homogénéiseur verre teflon. Les broyats ont été centrifugés 20 minutes à 2500 g, à 4°C. La concentration protéique des surnageants est déterminée par colorimétrie à l'aide du réactif de folin ciocalteu (Lowry et al., 1951). Les contenus en GtH des hypophyses sont exprimés en ng/mg de protéines hypophysaires. Pour le Brochet et la Daurade nous avons utilisé des GtH partiellement purifiées. La GtH de Brochet ( $\beta$ -GtH) a été purifiée en suivant la méthodologie développée pour la s-GtH (Breton et al., 1978) à partir de 200 hypophyses collectées sur des femelles sacrifiées après un traitement gonadotrope d'induction de ponte en Février Mars 1980. Les glycoprotéines hypophysaires séparées sur colonne de concanavaline A sépharose subissent une chromatographie d'exclusion sur colonne d'ultrogel ACA 54 (100 x 1,5 cm). Après concentration les fractions actives sur le test de maturation intrafolliculaire des ovocytes de Truite arc-en-ciel (Jalabert et al., 1974) ont été déposées sur une colonne de DEAE cellulose biogel A 0,5 x 5 cm équilibrée en tampon tris 0.01M pH 7.8. Les produits non retenus sont recueillis en une seule fraction. Les protéines retenues sont éluées par une solution de NaCl 0,15M sans être fractionnées. La fraction non retenue n'a pas d'activité biologique, alors que les protéines éluées par le NaCl possèdent 38% de l'activité d'un standard de s-GtH purifiée, sur le test de maturation intrafolliculaire des ovocytes de Truite arc-en-ciel. Cette fraction n'est pas homogène et présente 4 bandes en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5%.

La même procédure a été appliquée à un mélange d'hypophyses liophylisées de Daurade (0.376 g) prélevées à la Station de Mariculture d'Elat (Israël) pendant la période de reproduction 1980 et de 3.412 g d'hypophyses congelées fraîches, prélevées pendant la même période en 1981. Seules les 2 premiers stades de purification qui ont donné 3,15 mg de protéines biologiquement actives ont été réalisés. La concordance entre un dosage biologique et un dosage radioimmunologique a été recherchée.

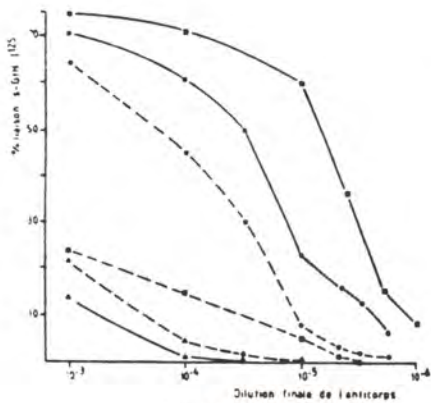


FIGURE 1

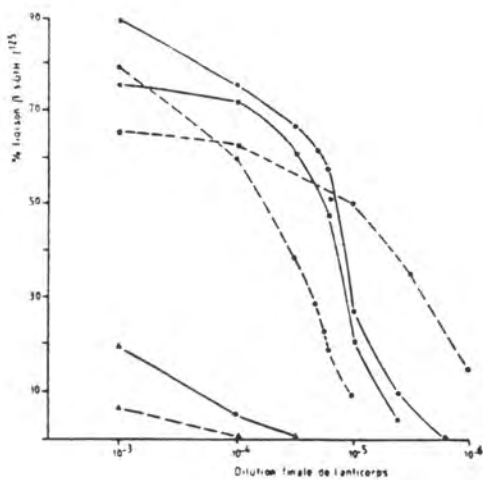


FIGURE 2

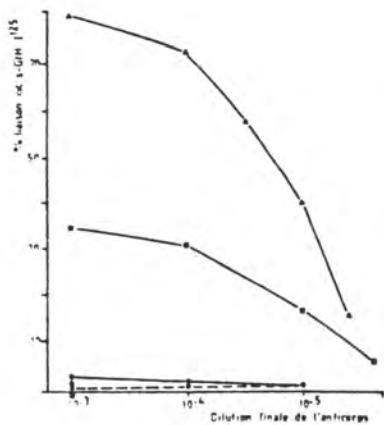


FIGURE 3

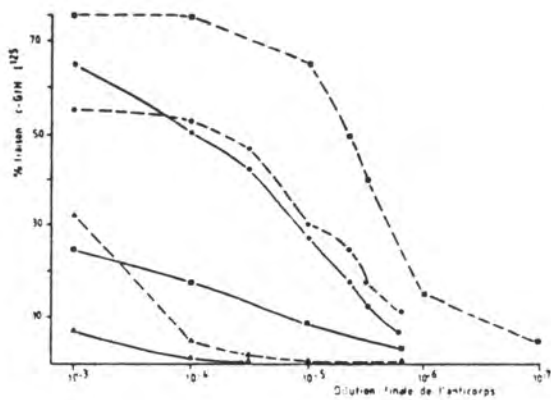


FIGURE 4

COURBE DE LIAISONS DES ANTIGENES IODES, TRAITES CONTINUS SALMON,  
TRAITES DISCONTINUS, CARPES AIX ANTI :

GcH ●—●  
S GcH —●—●  
α GcH ○—○



#### 4. - Dosage biologique de la GtH de Daurade

Le test de maturation intrafolliculaire des ovocytes de Truite n'a pas pu être utilisé pour la mesure de l'activité biologique des préparations hypophysaires de Daurade à cause du faible contenu gonadotrope de ce matériel et sans doute d'un éloignement phylogénétique trop important des espèces donneuse et receveuse. Un nouveau test basé sur la stimulation gonadotrope *in vitro* de la sécrétion de 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogestérone par des follicules de Truite a été mis au point. La sensibilité du dosage a été augmentée en amplifiant le signal du premier messenger de la gonadotropine (AMPC) en empêchant sa dégradation par la phosphodiesterase à l'aide d'un bloqueur de cet enzyme le 3-isobutyl-1 méthylxanthine (IBMX) (Fostier et Jalabert, 1983). Pratiquement, les follicules sont pré-incubés 2 heures dans un milieu contenant 0.1mM d'IBMX, après addition des extraits gonadotropes, l'incubation est poursuivie 48 heures et la 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogestérone libérée dans le milieu est dosée par radioimmunologie (Fostier et al., 1981). Ce dosage autorise une sensibilité de 5 ng de GtH/ml.

#### 5. - Traitement avec du LH-RH analogue D Ala 6 - Des Gly 10 - LH-RH

Des Perches soleil conservées au Laboratoire ont été traitées par du LH-RHa seul ou en présence de pimozide. Dans ce cas le traitement pimozide (10 mg/kg) est réalisé 3 heures avant l'injection du LH-RHa (50  $\mu$ g/kg). Un groupe d'animaux témoins ne reçoit qu'une solution saline. Tous les animaux sont sacrifiés 6 heures après l'injection du LH-RHa. Les hypophyses et les sérums ont été conservés congelés pour la détermination de leur contenu gonadotrope par radioimmunologie.

### RESULTATS

#### 1. - Liaison directe des antigènes aux anticorps (figure 1)

La s-GtH se lie aux anti s-GtH et  $\beta$  s-GtH mais aussi à l'anti  $\beta$  c-GtH. Les liaisons maximum sont comprises entre 68 et 76% à la dilution 10<sup>-3</sup>. La hiérarchie de liaison décroissante est la suivante anti s-GtH -  $\beta$  s-GtH -  $\beta$  c-GtH. Par contre la liaison de cet antigène à l'anti c-GtH est faible 23,5% ainsi qu'aux immunosérums anti sous-unité  $\alpha$  des 2 espèces. Les courbes de liaison de la  $\beta$  s-GtH (figure 2) aux anticorps sont comparables à celles obtenues avec la s-GtH native. Les liaisons maximum sont comprises entre 90 et 75%, avec une hiérarchie décroissante suivante, anti  $\beta$  s-GtH -  $\beta$  c-GtH - s-GtH. De plus contrairement à la s-GtH elle se lie à 65% sur un anti c-GtH, mais ne se lie que faiblement aux anti  $\alpha$  c-GtH. L' $\alpha$  - s-GtH (figure 3) se lie à 80% avec l'anticorps homologue, la liaison à l'anti s-GtH n'est que de 35% et pratiquement nulle avec tous les autres immunosérums.

Des résultats comparables ont été obtenus avec la c-GtH et ses unités. La figure 4 montre les courbes de liaison de la c-GtH, on retrouve une hiérarchie de liaison parallèle à celle obtenue avec la s-GtH, soit en ordre décroissant anti c-GtH -  $\beta$  s-GtH -  $\beta$  c-GtH -  $\alpha$  c-GtH - s-GtH -  $\alpha$  s-GtH. Les hiérarchies de liaison de la  $\beta$  c-GtH sont similaires à celles de la  $\beta$  s-GtH. Elle se lie aussi à l'anti s-GtH contrairement à l'hormone native. L' $\alpha$  c-GtH ne se lie qu'à l'anti c-GtH et l'anti  $\alpha$  c-GtH.

#### 2. - Etude des compétitions

##### - par les antigènes purifiés

##### systèmes IS - s-GtH I<sup>125</sup> (tableau 1)

Dans le système homologue anti s-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> la pente de la droite de compétition par l'hormone correspondante froide ( $\logit B/B_0 = f(\log \text{dose})$ ) est de - 0.79. Seules les sous-unités  $\beta$  s et c déplacent spécifiquement le système. Par contre la c-GtH n'induit pas de compétition spécifique.

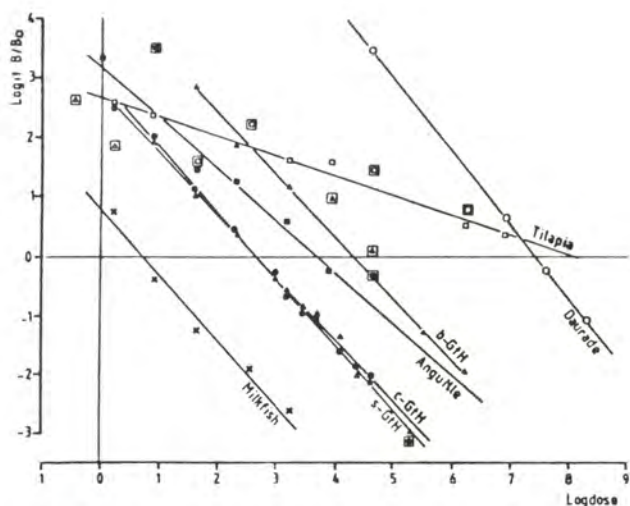


FIGURE 5 :

COURBES DE COMPETITION DE PREPARATIONS GONADOTROPES HYPOPHYSAIRES  
DANS LE SYSTEME ANTI  $\beta$ -c-GtH - s-GtH I<sup>125</sup>

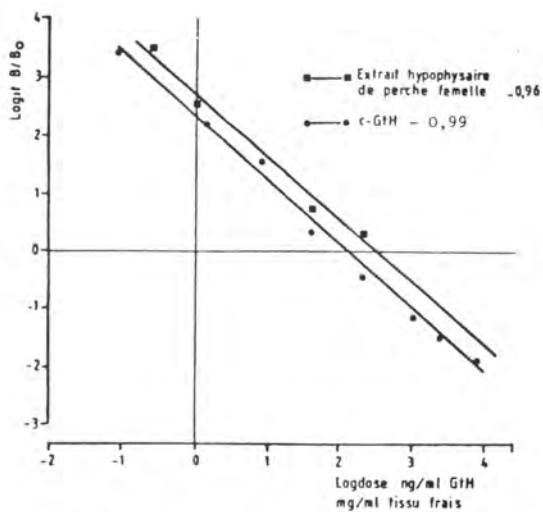


FIGURE 6 :

COURBES DE COMPETITION DE LA c-GtH ET D'UN EXTRAIT HYPOPHYSAIRE  
DE PERCHE SOLEIL DANS UN SYSTEME ANTI  $\beta$  s-GtH - c-GtH I<sup>125</sup>



Dans le système anti  $\beta$  s-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> la liaison de la s-GtH est spécifiquement déplacée par la s-GtH, la  $\beta$  s-GtH ( $p < 0.01$ ) et à un moindre degré ( $p < 0.05$ ) par la  $\alpha$  et  $\beta$  c-GtH.

Dans le système anti  $\beta$  c-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> des droites de compétitions parallèles sont obtenues avec les 2 hormones natives et leurs sous-unités  $\beta$ . Les liaisons trop faibles de la s-GtH I<sup>125</sup> aux IS  $\alpha$  s-GtH - c-GtH -  $\alpha$  c-GtH n'autorisent pas d'études de compétition.

#### Systèmes IS $\beta$ s-GtH I<sup>125</sup> (tableau 2)

Dans tous les systèmes liant initialement la  $\beta$  s-GtH; les 2 hormones natives c-GtH et s-GtH, ainsi que leurs sous-unités  $\beta$  déplacent spécifiquement la liaison de  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup> aux anti-hormones totales et anti sous-unités  $\beta$ . Par contre, les sous-unités  $\alpha$  n'entrent pas en compétition avec la  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup> dans ces systèmes pas plus qu'il n'est possible d'étudier les systèmes IS anti  $\alpha$  -  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup> cette dernière ne se liant pas aux anti  $\alpha$  sous-unités.

- Par les GtH partiellement purifiées et les extraits hypophysaires

#### Systèmes IS - s-GtH I<sup>125</sup> (tableau 3)

La GtH de Brochet partiellement purifiée déplace spécifiquement les systèmes anti s-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> et anti  $\beta$  s-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> dans lesquels les teneurs en GtH de la préparation, exprimée en équivalent s-GtH, sont respectivement de 0,82 et 0,85  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  de protéine hormonale. Ces 2 systèmes sont également spécifiquement déplacés par l'extrait hypophysaire d'Anguille qui contient 2,8  $\mu\text{g}$  d'équivalent s-GtH par mg d'une poudre acétonique. Pour l'extrait hypophysaire de Daurade seul le système anti s-GtH s-GtH I<sup>125</sup> permet de mesurer la GtH hypophysaire dans cette espèce de même qu'un système hétérologue anti  $\beta$  c-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> est le seul spécifiquement déplacé par l'extrait hypophysaire de milkfish. Aucun de ces systèmes n'est déplacé par l'extrait d'hypophyse de Tilapia. La figure 5 visualise les différentes courbes de compétition obtenues dans le système hétérologue anti  $\beta$  c-GtH - s-GtH I<sup>125</sup>, qui autorise apparemment la plus grande diversité de reconnaissance immunologique d'activités de type gonadotrope.

#### Systèmes IS - $\beta$ s-GtH I<sup>125</sup> (tableau 4)

La GtH partiellement purifiée déplace spécifiquement la liaison de la  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup> à l'anti s-GtH mais aussi aux anti  $\alpha$  et  $\beta$  c-GtH. Dans ces 3 systèmes les contenus en équivalent en s-GtH de la préparation sont voisins 0,59, 0,63 et 0,70  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  de protéine ils sont inférieurs à ceux mesurés dans les systèmes précédents mais restent supérieurs à ceux obtenus lors de la détermination de son activité biologique  $0,38 \pm 0,12$ . Seul le système anti  $\beta$  s-GtH -  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup> est spécifiquement déplacé par l'extrait hypophysaire de Daurade, mais aussi par ceux d'Anguille, de Tilapia et de Xénope. L'extrait hypophysaire d'Anguille induit aussi une compétition spécifique dans le système anti  $\beta$  c-GtH -  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup>. Dans tous les systèmes spécifiquement déplacés par cet extrait, la teneur en GtH mesurée en équivalent s-GtH est comprise entre 2,708 et 3,088  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

### 3. - Application à la purification de la GtH de Daurade, validation biologique

L'activité gonadotrope des fractions protéiques obtenues après chromatographie sur ultrogel ACA 54 a été mesurée par dosage biologique et immunologique dans les systèmes décrits précédemment. Les résultats sont montrés dans le tableau 4. C'est dans le système anti  $\beta$  s-GtH -  $\beta$  s-GtH I<sup>125</sup> que les valeurs obtenues (en équivalent s-GtH) sont les plus proches de celles mesurées par dosage biologique, bien que restant la plupart du temps inférieures. Le rapport des activités immunologiques et biologiques est voisin de 0,75 sauf pour la fraction 29 pour laquelle l'activité mesurée par R.I.A. est supérieure à celle déterminée par essai biologique. Dans ce système les pentes des droites de compétition de chaque fraction restent parallèles à celle de la droite de référence correspondant à la

TABLEAU 1 : Pente des courbes d'inhibition de différentes préparations gonadotropes dans les systèmes IS anti-gonadotrope s-GtH I 125

COMPETITEUR		s-GtH	$\beta$ s-GtH	$\alpha$ s-GtH	c-GtH	$\beta$ c-GtH
ANTICORPS						
anti	s-GtH	- 0.79	- 0.92	/	- 0.43	- 0.75
anti	$\beta$ s-GtH	- 0.82	- 0.78		- 0.67	0.61
anti	$\alpha$ s-GtH					
anti	c-GtH					
anti	$\beta$ c-GtH	- 1.08	- 0.95		- 1.07	- 1.02

TABLEAU 2 : Pente des courbes d'inhibition de différentes préparations gonadotropes dans les systèmes IS anti-gonadotrope  $\beta$  s-GtH I 125

COMPETITEUR		s-GtH	$\beta$ s-GtH	$\alpha$ s-GtH	c-GtH	$\beta$ c-GtH
ANTICORPS						
anti	s-GtH	- 1.04	- 0.82	/	- 0.73	- 0.94
anti	$\beta$ s-GtH	- 0.92**	- 1.02	- 0.04	- 0.96	- 0.87
anti	$\alpha$ s-GtH					
anti	c-GtH	- 0.85*	- 0.88	/	- 1.14	- 1.12
anti	$\beta$ c-GtH	- 1.10*	- 1.12	- 0.23	- 1.08	- 1.24



TABLEAU 3 : PENTE DES COURBES D'INHIBITION DE C-GtH PURIFIEES ET D'EXTRAITS HYPOPHYSAIRES DE CONADOTROPINES -  $\alpha$ -GtH 1125  
 LES CONTENUS EN GtH SONT EXPRIMES EN EQUIVALENT  $\alpha$ -GtH

	$\alpha$ -GtH	c-GtH	b-GtH	DAURADE	ANGUILLE	MILKFISH	TILAPIA
anti $\alpha$ -GtH	- 0.79	- 0.43	- 0.86	- 0.94	- 1.10	- 0.36	- 0.34
			0.82	10.72	2883		
anti $\beta$ $\alpha$ -GtH	- 0.82	- 0.67	- 0.99	- 1.30	- 1.03	- 0.41	- 0.26
			0.85		2708		
anti $\beta$ c-GtH	- 1.08	- 1.07	- 1.03	- 1.24	- 0.87	- 1.06	- 0.33
						73.10	
			$\mu\text{g}/\mu\text{g}$	$\text{ng}/\mu\text{g}$	$\text{ng}/\text{mg}$	$\text{ng}/\text{mg}$	

TABLEAU 4 : PENTE DES COURBES D'INHIBITION DE c-GtH PURIFIEES ET D'EXTRAITS HYPOPHYSAIRES DANS LES SYSTEMES IS-ANTIGONADOTROPIN  
 $\beta$ - $\alpha$ -GtH 1125  
 LES CONTENUS EN GtH SONT EXPRIMES EN EQUIVALENT  $\alpha$ -GtH.

	$\alpha$ -GtH	c-GtH	b-GtH	DAURADE	ANGUILLE	MILKFISH	TILAPIA	XENOPE
anti $\alpha$ -GtH - 1.12	- 1.33	- 1.23	- 0.74	- 0.61	- 0.24	- 0.18	- 0.09	
		0.59						
anti $\beta$ $\alpha$ -GtH - 1.34	- 0.78	- 1.25	- 1.16	- 0.99	- 0.43	- 0.97	- 0.88	
		- 0.71	29,88	3088		79,17	34,65	
anti c-GtH - 0.85	- 1.14	- 0.95	- 0.68	- 0.72	- 0.13	- 0.21		
		0.63						
anti $\beta$ c-GtH - 0.96	- 1,15	- 1.10	- 0.64	- 0.91	- 0.31	- 0.30	- 0.04	
		0,70		2822				

TABIEAU 5 : ACTIVITE IMMUNOLOGIQUE EQUIVALENT ng s-GtH/ $\mu$ g de PROTEINE

FRACTION N°	ACTIVITE BIOLOGIQUE EQUIVALENT s-GtH PAR ng de PROTEINE	s - GtH I <sup>125</sup>		R - s-GtH I <sup>125</sup>	
		IS - s-GtH	IS Bc-GtH	IS Bc-GtH	IS Bc-GtH
29	31	18.5	17.9	33.6	- 1.25
		- 1.10		- 1.08	
30		27.7	17.5	31.5	- 1.06
		- 0.73		- 0.77	
31	58	36.2	33.05	40.61	- 1.12
		- 0.99		- 0.75	
32	43	30	37.1	36.64	- 1.30
		- 0.76		- 1.08	
33	38	23.7	30.8	28.2	- 1.20
		- 0.99		- 0.59	
34	15	11.3	11.83	11.3	- 1.18
		- 0.99		- 0.89	
35	8.33	6.3	9.98	6.21	- 0.80
		- 0.30		- 0.77	
36	< 4	N.D.	N.D.	N.D.	
pente de référence		- 1.04		- 0.83	- 1.10

TABIEAU 6 : DOSAGE DE LA GtH CHEZ LA PERCHE SOLEIL APRES STIMULATION PAR LE LH-RH A SEUL OU EN PRESENCE DE PIMOZIDE  
VALEURS ESTIMEES PAR RAPPORT A LA c-GtH DANS LE SYSTEME IS B s-GtH - c-GtH - c-GtH  
PENIE DE LA DROITE DE REFERENCE - 0,99

N°	SEXE	R C S	P L A S M A	
			GtH ESTIMEE ng/ml	PENIE DROITE DE REGRESSION
1	♂	1.81 spermiant	0.55	- 0.63
2	♀	0.62	0.55	
3	♀	0.69	0.50	- 0.58
4	♀	14.71	0.90	- 0.55
5	♂	0.37	0.90	- 0.65
6	♀	0.83	1.51	- 0.67
7	♀	24.19	1.54	- 0.78
8	♂	2.08 spermiant	1.23	



s-GtH. Dans tous les autres systèmes à un degré moindre dans le système anti s-GtH - s-GtH I<sup>125</sup> dont la "spécificité" pour un facteur hypophysaire de Daurade a été démontré précédemment, les pentes de ces droites ne sont pas constantes tout au long du chromatogramme, et les concentrations en GtH des fractions sont sous-estimées comparées aux résultats des dosages biologiques. Le dosage n'a pas été validé pour le dosage de la GtH dans le plasma de la Daurade, c'est-à-dire par la mesure de modifications naturelles ou expérimentales des concentrations périphériques de GtH. Ces systèmes le permettent cependant. Ainsi le système anti  $\beta$  s-GtH - c-GtH I<sup>125</sup> s'est révélé être déplacé spécifiquement par un extrait hypophysaire de Perche soleil (figure 6). Les pentes des droites de régression logarithme  $B/B_0 = f \log \text{dose}$  correspondant à la c-GtH et l'extrait sont respectivement de - 0.99 et - 0.96. Le tableau 6 montre les mesures de GtH plasmatique dans un groupe de Perches traitées par une solution saline : animaux 1,2,3., un d Ala<sup>6</sup> DesGly 10 - LH-RH : animaux 4, 5 ; et une combinaison de pimozide LH-RHa : animaux 6,7,8. Les pentes des droites de régression correspondant au plasma de chacun de ces animaux ne sont pas statistiquement différentes entre elles, mais diffèrent de la droite de référence correspondant à la c-GtH et de celle, caractéristique du déplacement induit par l'extrait hypophysaire. Les plus fortes valeurs de GtH plasmatique sont obtenues chez les animaux traités par le pimozide et le LH-RHa et les plus faibles chez les animaux qui ne reçoivent que la solution saline.

## DISCUSSION

Ces résultats apportent à la fois de nouveaux éléments fondamentaux sur les relations structure - activité immunologique des gonadotropines de poissons, et élargissent à d'autres espèces, les possibilités d'utiliser des systèmes de dosages hétérologues pour le dosage de leurs GtH spécifiques à condition toutefois de valider les systèmes retenus, démarche qui n'a pu être conduite à son terme chez la Daurade par manque de matériel biologique. Une approche comparable à celle mise en oeuvre chez la Perche est envisagée.

Ainsi que l'avaient démontré Dufour et al., 1979 ; Burzawa-Gerard et al., 1980 pour les sous-unités de la c-GtH, nous retrouvons des caractéristiques immunologiques comparables pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la GtH de Saumon. La sous-unité  $\alpha$  possède une spécificité zoologique très stricte alors que celle des déterminants antigéniques des sous-unités  $\beta$  l'est beaucoup moins. Il ne s'agit cependant pas d'une aspécificité totale, il doit exister des différences à l'intérieur même du groupe des poissons, les divers extraits hypophysaires s'ils entrent tous en compétition ne le font pas tous de la même façon dans les systèmes anti  $\beta$  ou qui mettent en jeu un seul de ces composants. Une telle étude ne permet aucune évaluation des distances phylogénétiques entre les espèces considérées, comme l'ont d'ailleurs montré d'autres travaux (Bye et al., 1980 - revue de Licht et al., 1977). Ces travaux montrent également qu'il existe une parenté immunologique entre la sous-unité  $\beta$  de s-GtH et un facteur "gonadotrope" présent dans l'hypophyse d'un amphibien le Xénope, laissant supposer une certaine conservation des déterminants antigéniques  $\beta$  entre ces 2 classes de vertébrés comme entre poissons et mammifères (Burzawa-Gerard et al., 1980). Les hormones s-GtH et c-GtH bien que purifiées à partir d'un test biologique sur poisson sont actives à la fois sur l'induction *in vitro* de la maturation d'ovocytes de Xénope (Breton et Schuetz, données non publiées) et sur la stimulation de la stéroïdogenèse testiculaire dans cette même espèce (Boujard, 1982), ce qui fait apparaître des analogies fonctionnelles de ces hormones chez les Amphibiens et les Poissons (revue de Idler, 1982). Si comme on l'admet chez les mammifères la spécificité d'action biologique fonctionnelle est liée à la sous-unité  $\beta$ , cette caractéristique est préservée dans les GtH de poissons, et d'amphibiens, les communautés antigéniques entre sous-unités  $\beta$  pourraient aussi être le reflet de communautés d'action biologique.



Sur un plan plus pratique, il a été possible en utilisant des systèmes hétérologues homospécifique Saumon ou hétérospécifique Saumon - Carpe d'en trouver un ou plusieurs spécifiquement déplacés par chacun des 5 extraits hypophysaires de poissons téléostéens utilisés. Quand plusieurs systèmes reconnaissent un facteur hypophysaire, les teneurs hypophysaires en ce facteur mesurées sur les différents systèmes sont voisines : cas de l'extrait hypophysaire d'Anguille et des GtH partiellement purifiées de Brochet et Daurade. Dans ce dernier cas la constance de la pente des droites de régression, traduisant les compétitions induites par chaque fraction, laisse supposer que c'est bien le même facteur qui est mesuré par R.I.A. tout le long du chromatogramme et qu'il n'y a pas interférence d'autres facteurs hormonaux hypophysaires de type TSH en particulier, que le gel filtration sur ultrogel ACA 54 ne permet pas de séparer de la GtH. La comparaison des activités biologiques et immunologiques renforce cette hypothèse. La validation du dosage pour la détermination de la GtH hypophysaire, n'implique pas obligatoirement une validation dans le plasma. Ainsi le système anti  $\beta$  s-GtH - c-GtH I<sup>125</sup> est spécifiquement déplacé par un extrait hypophysaire de Perche, mais les droites de régression traduisant les compétitions en présence de dilutions sériées des plasmas ne sont pas parallèles aux références. Ce résultat traduit sans doute l'existence d'une réaction d'aspécificité constante en présence de plasma, les pentes étant parallèles entre tous les plasmas. Ce dernier élément pourrait cependant autoriser, à la condition de travailler à une dilution constante des plasmas, une "estimation" de leurs concentrations en GtH que le sens des variations induites après traitements LH-RHa peut aussi corroborer. Ces variations sont en accord avec celles observées dans d'autres espèces (Chang et Peter, 1982; Billard et al., 1983), mais leur amplitude est plus faible aboutissant cependant à un triplement des niveaux de base. On pourrait supposer que comme chez le poisson rouge (Gillet et al., 1981) le jeune auquel les Perches ont été soumises durant leurs 3 semaines de captivité aboutit à une diminution de la sécrétion de GtH, mais aussi à celle de la réceptivité hypophysaire à des stimulations par le LH-RHa. En conclusion ce travail montre qu'il paraît sans doute possible parmi tous les systèmes proposés, d'en trouver un suffisamment spécifique pour la détermination de GtH d'espèces chez lesquelles elle n'est pas encore purifiée, cependant la validation du dosage dans le plasma pourrait nécessiter l'utilisation de sérum d'animaux hypophysectomisés, opération difficilement réalisable dans certaines espèces.

#### R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été supporté par l'I.N.R.A., le C.N.E.X.O., contrat 82/2678Y. Il a aussi bénéficié de l'aide de la Fondation Rotschild qui a permis le séjour de l'un des auteurs (Y. Zohar) au laboratoire.

Nous remercions le Docteur E. Gordin, Directeur de la Station de Mariculture de l'I.O.L.R. à Eilat (Israël) qui a organisé la collecte des hypophyses de Daurade, ainsi que les Docteurs A. Fostier et B. Jalabert pour les déterminations des activités biologiques des préparations, Mademoiselle Bougoussa et Monsieur Thomas ont assuré la réalisation technique de ce travail, Madame Bouix a réalisé la dactylographie de ce manuscrit, nous les en remercions.

L'expérimentation sur Perche a été réalisée dans le laboratoire du Docteur R.E. Peter avec l'aide du N.R.C.S. du Canada.

---

Billard R., Alagarwami K., Peter R.E., Breton B., 1983 - Potentialisation par le pimozide des effets du LH-RHa sur la sécrétion gonadotrope hypophysaire, l'ovulation et la spermiation chez la Carpe commune Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 296, p. 181-184.



- Boujard D., 1982 - Etude in vivo et en périfusion, du contrôle de la stéroïdogénèse testiculaire par les gonadotropines chez les Amphibiens. Thèse de 3ème cycle - Université de Rennes I.
- Breton B., Kann G., Burzawa-Gerard E., Billard R., 1981 - Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de Carpe Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 272, p. 1515-1517.
- Breton B., Billard R., Jalabert B., 1972 - Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques poissons téléostéens. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 13, p. 347-362.
- Breton B., Jalabert B., Fostier A., Billard R., 1975 - Etude sur le cycle reproducteur de la Truite et de la Tanche : effets de variations expérimentales de la température. J. Physiol., 70, p. 561-564.
- Breton B., Prunet P., Reinaud P., 1978 - Sexual differences in salmon gonadotropin. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 18, p. 754-765.
- Breton B., 1981 - A study of salmo Oncorhynchus tshawytscha pituitary gonadotropin dissociation. Gen. Comp. Endocrinol., 45, p. 147-152.
- Burzawa-Gerard E., 1974 - Séparation et réassociation des sous-unités de l'hormone gonadotrope d'un poisson téléostéen, la Carpe Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 279, p. 1681-1684.
- Burzawa-Gerard E., Kerdelhue B., 1978 - Etude par radioimmunologie des propriétés des immunsérums de l'hormone gonadotrope de la Carpe Cyprinus carpio et de ses sous-unités. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 18, 4, p. 773-780.
- Burzawa-Gerard E., Dufour S., Fontaine Y.A., 1980 - Relations immunologiques entre les hormones glycoprotéique hypophysaires de poissons et de mammifères ainsi qu'entre leurs sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Gen. Comp. Endocrinol., 41, p. 199-211.
- Bye V.J., Breton B., Billard R., 1980 - Immunological cross-reaction between pituitary gonadotropin for North Atlantic fish. Gen. Comp. Endocrinol., 41, p. 130-134.
- Chang J.P., Peter R.E., 1983 - Effects of pimozide and des Gly<sup>10</sup>(D ala<sup>6</sup>) luteinizing hormone releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration and ovulation in female goldfish, Carassius auratus. Gen. Comp. Endocrinol. sous presse.
- Crim L.W., Meyer A.K., Donaldson E.M., 1973 - Radioimmunoassay estimates of plasma gonadotropin levels in the spawning pink salmon. Gen. Comp. Endocrinol., 21, p. 69-76.
- Dufour S., Burzawa-Gerard E., Fontaine Y.A., 1979 - Evolution des hormones glycoprotéiques hypophysaires : données radioimmunologiques sur les sous-unités de l'hormone gonadotrope de la Carpe Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 289, 137-140.
- Dufour S., Delerue-le Belle N., Fontaine Y.A., 1983 - Development of a heterologous radioimmunoassay for eel Anguilla anguilla gonadotropin. Gen. Comp. Endocrinol., 49, p. 404-413.
- Fontaine Y.A., Salmon C., Fontaine-Bertrand E., Burzawa-Gerard E., Donaldson E.M., 1972 - Comparison of the activities of two purified fish gonadotropins on

- adenyl-cyclase activities of the goldfish ovary. Can. J. Zool., 50, p. 1673-1676.
- Fostier A., Jalabert B., Campbell C., Terqui M., Breton B., 1981 - Cinétique de libération in vitro de 17 -hydroxy-20 -dihydroprogestérone par des follicules de Truite arc-en-ciel Salmo gairdneri. C.R. Acad. Sci., 292, p. 777-780.
- Fostier A., Jalabert B., 1983 - Mise au point d'un dosage biologique pour la mesure des activités gonadotropes hypophysaires. Reprod. Nutr. Devel. sous presse.
- Gillet C., Billard R., Breton B., 1981. - La reproduction du poisson rouge Carassius auratus élevé à 30°C. Effets de la photopériode, de l'alimentation et de l'oxygénation. Cah. Lab. Montereau., 11, p. 49-56.
- Idler D.R., 1982 - Some perspectives on fish gonadotropins. Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Wageningen the Netherlands, C.J.J. Richter, H.J. Th. GOOS, Editors) Pudoc p. 4-13.
- Jalabert B., Breton B., Billard R., 1974 - Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test de maturation in vitro des ovocytes de Truite. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 14, p. 217-228.
- Licht P., Papkoff H., Farmer S.W., Muller C.H., Tsui H.W., Crews D., 1977 - Evolution of gonadotropin. Structure and function. Recent Progress in Hormone Research., 33, p. 169-248.
- Lowry O.H., Rosebrough N.S., Farr A.L., Randall R.S., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, p. 265-275.
- NG. T.B., Idler D.R., 1978 - Big and little forms of plaice vitellogenic and maturational hormones. Gen. Comp. Endocrinol., 34, p. 408-420.
- SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G., 1957 - "Statistical methods". State Univ. Press. Ames.
- Tan E.S.P., Dodd J.M., 1978 - Immunological relatedness of gonadotrophins of various fishes as shown by radioimmunoassays. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 18, p. 781-785.



ROLE DES HORMONES STEROIDES ET DES FACTEURS EXTERNES DANS LE  
CONTROLE DE LA FONCTION GONADOTROPE HYPOPHYSAIRE DE L'ANGUILLE EUROPEENNE  
(*Anguilla anguilla* L.) FEMELLE

J. LELOUP-HATEY, Y.A. FONTAINE, S. DUFOUR et B. QUERAT  
Laboratoire de Physiologie générale et comparée du Muséum  
Laboratoire d'Endocrinologie comparée associé au C.N.R.S.  
7, rue Cuvier, 75231 PARIŞ CEDEX 05

R E S U M E

La fonction gonadotrope (estimée par dosage radioimmunologique (RIA) pour la sous-unité  $\beta$  de l'hormone gonadotrope de carpe (cGTH)) est peu active chez l'anguille femelle d'eau douce : la teneur hypophysaire en GTH est de l'ordre de 15 ng d'équivalent cGTH/mg tissu frais et la teneur plasmatique est toujours inférieure à 1 ng d'équivalent cGTH/ml et souvent indétectable ( $< 0,2$  ng équivalent cGTH/ml). La stéroïdogénèse ovarienne est également basse. Les taux plasmatiques de testostérone libre (T) et d'oestradiol libre ( $E_2$ ) sont inférieurs à 0,3ng/ml (RIA). Un apport d' $E_2$  entraîne une forte augmentation de la teneur hypophysaire en GTH (jusqu'à 1000 fois) sans que le taux plasmatique soit modifié. La stimulation de la fonction gonadotrope et le développement des ovaires doivent se produire sous l'influence des facteurs externes rencontrés lors de la migration vers la mer des Sargasses. L'adaptation à l'eau de mer entraîne une élévation massive (jusqu'à 200 fois) de la production de  $E_2$  sans modification de celle de T ; en revanche, aucune modification décelable de la fonction gonadotrope, ni aucun développement des ovaires n'ont été observés. La salinité doit probablement intervenir en synergie avec d'autres facteurs du milieu pour déterminer le développement ovarien pendant la migration marine.

A B S T R A C T

Gonadotropic activity (estimated by radioimmunoassay (RIA) for  $\beta$  subunit of carp gonadotropin (cGTH)) is relatively low in the female freshwater (FW) eel : pituitary GTH was about 15 ng equivalent cGTH/mg fresh tissue. Plasma GTH was always less than 1 ng equivalent cGTH/ml and often undetectable ( $< 0.2$  ng equivalent cGTH/ml). Ovarian steroidogenesis in FW fish is similarly low ; plasma concentration of both free testosterone (T) and free estradiol ( $E_2$ ) were less than 0.3 ng/ml as measured by RIA. Treatment with  $E_2$  in FW fish caused a great increase in pituitary GTH, up to 1000 times control values, without changing plasma GTH. Stimulation of gonadotropic activity and ovarian development occur during the eel's migration to the Sargasso Sea. Adaptation to seawater (SW) caused a great increase of plasma  $E_2$  concentration (up to 200 times that in FW fish) without modifying that of T. However, adaptation to SW did not cause any detectable change in gonadotropic activity or ovarian development. Environmental factors other than salinity probably are involved also in the process of ovarian development.

M O T S - C L E S : Anguille, gonadotropine, stéroïdes sexuels, facteurs externes.

K E Y W O R D S : Eel, gonadotropin, sexual steroids, environmental factors.

Le cycle biologique de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) est original à plusieurs égards. Les larves (leptocéphales) migrent de la mer des Sargasses (où les plus petites ont été pêchées) jusqu'au plateau continental européen où elles se transforment en anguillettes (civelles). Ces dernières remontent plus ou moins loin les rivières et mènent ensuite une vie sédentaire pendant une longue phase de croissance (anguilles jaunes). Après 10 à 20 ans, ces animaux se transforment en anguilles "argentées" qui entament leur migration vers les eaux marines puis, sans doute, vers la mer des Sargasses. C'est là que la reproduction de l'anguille est supposée s'effectuer mais on n'en possède aucune preuve directe. Les gonades, en particulier les ovaires (nous nous bornerons ici aux résultats obtenus chez les femelles) restent immatures durant toute la vie en eau douce, y compris au stade argenté (Fontaine M. et al., 1964 ; Fontaine Y.A. et al., 1976) et aucune maturation sexuelle spontanée n'a été observée. Des injections d'extraits d'hypophyses de carpes ou d'hormones gonadotropes sont par contre capables de déclencher cette maturation (Fontaine M. et al., 1964 ; Fontaine Y.A. et al., 1976). Ainsi, l'absence de développement des ovaires chez l'anguille en eau douce doit être due à une insuffisance de la fonction gonadotrope de l'animal lui-même. Cette fonction gonadotrope doit être activée durant la migration vers la mer des Sargasses sous l'influence, directe ou indirecte, de facteurs du milieu extérieur. Par ailleurs, les hormones stéroïdes (qui exercent de façon très générale des rétrocontrôles sur la fonction gonadotrope des vertébrés) sont susceptibles de jouer un rôle dans le blocage apparent ou le déblocage de la fonction gonadotrope. L'étude de la validité de ces hypothèses nous a guidés dans le travail dont nous présentons ici les premiers résultats.

## I - MATERIEL et METHODES

### A. Animaux

Les anguilles proviennent des étangs de Péronne (Somme) où elles sont pêchées au moment de la migration d'avalaison. Elles sont ensuite conservées au laboratoire, dans des conditions standard, dans des bacs en eau douce courante, soumis à la photopériode et à la température naturelles, sauf indications contraires précisées dans la description des expériences.

### B. Traitements

Cathétérisation : un cathéter est préalablement inséré dans l'artère pulmonaire (artère irriguant la vessie natatoire; Leloup-Hatey, 1976) de certaines anguilles destinées à une étude des paramètres du métabolisme des stéroïdes sexuels ou à la recherche des pulsations sécrétoires de l'hormone gonadotrope.

Traitements hormonaux : des injections de divers stéroïdes en suspension dans une solution saline (Na Cl 0,15 M) sont faites dans la cavité générale.

### C. Sacrifice et prélèvements

Les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le sang est recueilli sur héparine et le plasma obtenu après centrifugation est conservé à - 20°C jusqu'à son utilisation.

L'hypophyse est rapidement prélevée, pesée et congelée à - 20°C jusqu'à l'extraction réalisée par broyage avec un mini ultra Turax dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 contenant du NaCl (0,15 M).

Les ovaires sont prélevés en totalité et pesés pour calculer le rapport gonadosomatique ( $\frac{\text{poids des ovaires}}{\text{poids du corps}} \times 100$ ).

Des fragments de 200 mg sont prélevés dans la partie médiane de l'ovaire pour une étude de la stéroïdogénèse ovarienne.



#### D. Dosage radioimmunologique (RIA) de l'hormone gonadotrope (GTH) d'anguille

Un RIA préalablement établi pour la sous-unité  $\beta$  de la GTH de carpe (cGTH) (Burzawa-Gérard et Kerdelhué, 1978), et qui montre une faible spécificité zoologique (Dufour *et al.*, 1979 ; Burzawa-Gérard *et al.*, 1980) a été utilisé. Le développement et la validation de ce RIA hétérologue pour la GTH d'anguille ont été décrits (Dufour *et al.*, 1983 a). Une préparation partiellement purifiée de GTH d'anguille, obtenue après filtration sur Sephadex G100 d'un extrait salin de 1400 hypophyses d'anguille est utilisée comme standard (ang GTH STD); l'activité de ce standard, estimée *in vitro* sur la concentration en adénosine monophosphate cyclique dans des fragments d'ovaire d'anguille, selon la méthode de Fontaine-Bertrand *et al.*, 1978, est 500 fois plus faible que celle de la cGTH (Dufour *et al.*, 1983 a). Chaque échantillon d'hypophyse ou de sérum d'anguille est dosé à plusieurs dilutions et en duplicats ; la concentration en GTH est déterminée relativement au standard ang GTH STD, par analyse de covariance dans la partie linéaire des courbes d'inhibition de liaison ; une estimation en "équivalent cGTH" est obtenue d'après le rapport (500) d'activité des deux standards.

#### E. Stéroïdogénèse ovarienne

Les incubations d'ovaire sont faites dans un milieu mis au point pour l'étude *in vitro* de l'ovaire des Téléostéens (Jalabert, 1976) et tamponné à pH 8.0 par de la soude et de l'hepès. Des précurseurs tritiés : prégénolone, progestérone, androstènedione ou testostérone sont ajoutés au milieu. Les composés radioactifs éthérosolubles synthétisés en 5 heures à 13°C sont purifiés par chromatographie sur colonne de célite imprégnée d'éthylène glycol (Siiteri, 1975). Les composés sont élués par un mélange isooctane-acétate d'éthyle (la concentration en acétate d'éthyle du mélange croissant selon un gradient exponentiel). Leur identification est faite dans les effluents par les méthodes classiques (isopolarité, avant et après transformation chimique, activité spécifique constante au cours de cristallisations répétées).

#### F. Dosage radioimmunologique des stéroïdes du plasma

11-oxotestostérone, testostérone et oestradiol ont été dosés sur des extraits à l'éther éthylique obtenus avant (fraction libre), puis après hydrolyse à la  $\beta$ -glucuronidase (fraction glucuroconjugée) du plasma.

La haute spécificité de l'immunsérum anti-11-oxotestostérone (fourni par le Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A. de Rennes) permet un dosage direct sur les extraits plasmatiques. La mesure est faite selon le protocole décrit par Fostier *et al.* (1982) ; le stéroïde lié à l'immunsérum est mesuré après sa précipitation par le polyéthylène glycol.

La spécificité des immunsérums antitestostérone et antioestradiol (fournis par le Lab. de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A. de Nouzilly), n'a pas permis le dosage direct de la testostérone et de l'oestradiol sur les extraits plasmatiques. Une purification préalable sur colonne de chromatolithe A (Biomérieux) est réalisée. Les stéroïdes sont élués par un mélange isooctane : acétate d'éthyle. Les dosages radioimmunologiques sont faits sur les effluents contenant testostérone ou oestradiol : la fraction du stéroïde liée à l'immunsérum est évaluée après adsorption de la fraction libre par du charbon dextran. Les teneurs sont exprimées en ng de stéroïde par ml de plasma.

#### G. Métabolisme des stéroïdes sexuels

Une étude du métabolisme des stéroïdes sexuels a été effectuée par une méthode classique utilisée depuis longtemps chez les Mammifères (Tait et Burstein, 1964). Après injection intraartérielle d'une dose traceuse du stéroïde tritié, la

Tableau 1 - Teneur hypophysaire en GTH chez différents lots d'anguilles dans les conditions standard.

Lot : (nombre d'animaux et date d'arrivée au Laboratoire)	Poids du corps (g)	RGS (%)	GTH hypophysaire ( $\mu\text{g}$ ang GTH STD/mg hypophyse fraîche)
(7) - octobre 1978	187 $\pm$ 7	1,37 $\pm$ 0,07	2,08 $\pm$ 1,02
(4) - avril 1980	708 $\pm$ 163	1,27 $\pm$ 0,14	13,2 $\pm$ 4,4
(17) - mai 1980	311 $\pm$ 37	0,90 $\pm$ 0,09	3,76 $\pm$ 1,07
(10) - octobre 1980	260 $\pm$ 6	1,66 $\pm$ 0,05	24,5*
(10) - décembre 1981	239 $\pm$ 2	1,21 $\pm$ 0,09	1,77*

\* dosage sur l'ensemble des hypophyses.

Tableau 2 - Activités enzymatiques mises en évidence dans le tissu ovarien de l'anguille argentée en eau douce.  
(Etude des produits libérés dans le milieu d'incubation).

Transformation "Précurseur $\longrightarrow$ Produit"	Activités enzymatiques correspondantes
Prégnénone $\longrightarrow$ Progestérone	3 $\beta$ -hydroxystéroïde deshydrogénase
Progestérone $\longrightarrow$ $\Delta_4$ -androsténone ( $\Delta_4$ )	$\Delta_{4-5}$ isomérase
$\Delta_4$ $\longrightarrow$ Testostérone	17 $\alpha$ hydroxylase
$\Delta_4$ $\longrightarrow$ Oestradiol 17 $\beta$	C <sub>21</sub> - C <sub>19</sub> desmolase
$\Delta_4$ $\longrightarrow$ 5 $\alpha$ Androsténone	17 $\beta$ hydroxylase
	aromatase
	5 $\alpha$ réductase
Action inhibitrice de la métopirone	11 $\beta$ hydroxylase



courbe de décroissance de ce composé dans le plasma est établie et les paramètres du métabolisme calculés à partir d'elle. Cette méthode a été appliquée dans les conditions précédemment décrites pour mesurer le métabolisme du cortisol chez l'anguille (Leloup-Hatey, 1976). L'interprétation de la courbe de décroissance de la radioactivité plasmatique extractible à l'éther a été faite, dans le cas des stéroïdes sexuels, en adoptant un modèle à 2 compartiments.

La vitesse de clairance métabolique est exprimée en ml de plasma épurés du stéroïde par heure chez une anguille d'un kg.

La vitesse de production, en ng par heure chez une anguille d'un kg, est égale au produit de la vitesse de clairance métabolique par la concentration plasmatique.

#### H. Calculs statistiques

Pour chaque groupe expérimental, la moyenne est donnée avec son erreur standard.

L'homogénéité des valeurs des groupes expérimentaux est déterminée par le test de Bartlett et lorsque l'homogénéité est prouvée, les groupes sont comparés par une analyse de variance.

Dans quelque cas, le test U des valeurs non paramétriques de Mann et Whitney est utilisé (étude du métabolisme des stéroïdes sexuels et dans quelques autres cas précisés dans le texte).

## II - RESULTATS

### A. Fonction gonadotrope, stéroïdogénèse ovarienne et stéroïdes sexuels plasmatiques chez l'anguille en conditions standard.

Les teneurs hypophysaires en GTH, qui montrent une grande variabilité (tableau 1), sont en moyenne de l'ordre de 8  $\mu$ g ang GTH-STD/mg d'hypophyse fraîche, soit l'équivalent de 16 ng cGTH/mg. La GTH est souvent indétectable dans le sérum ou le plasma (< 0,2 ng d'équivalent cGTH/ml) et en tous cas inférieure à 1 ng/ml.

En ce qui concerne la stéroïdogénèse, nous avons montré que l'ovaire synthétise des  $\Delta_4$ -prégnènes et est capable de transformer ceux-ci en androgènes (type androsténone ou testostérone) puis en oestrogènes (type oestradiol- $17\beta$ ). Une nette activité 5  $\alpha$ -réductasique et une indéniable activité  $11\beta$ -hydroxylante sont également observées (tableau 2).

La testostérone, la  $11$ -oxotestostérone et l'oestradiol sont présents dans le plasma des anguilles femelles, à des concentrations de 0,15 à 0,70 ng/ml, la moitié environ étant sous forme glucuroconjuguée (tableau 3, eau douce). Les vitesses de clairance métabolique de l'oestradiol et de la testostérone sont respectivement de  $0,50 \pm 0,08$  et  $1,89 \pm 0,11$  ml de plasma épuré du stéroïde par heure chez un animal type d'un kg.

### B. Rétro-contrôle des stéroïdes sexuels sur la fonction gonadotrope

Des injections répétées d'oestradiol déterminent une augmentation de la teneur hypophysaire en GTH. La réponse, significative après 11 injections de 0,625  $\mu$ g/g de poids du corps, croît très vite avec la dose ; des teneurs 1000 fois plus élevées que chez les témoins peuvent être observées (Dufour et al., 1983 b). Aucune augmentation de la GTH plasmatique n'est pourtant observée.

L'action de l'oestradiol sur l'hypophyse est spécifique : la testostérone ou la progestérone n'ont pas d'effet, tandis que le cortisol exerce une action

Tableau 3

Influence de l'adaptation à l'eau de mer sur les teneurs plasmatiques en testostérone, oestradiol et 11 oxotestostérone.

	Adaptation 1 mois		Adaptation 3 mois	
	Eau douce (conditions standard)	Eau de mer	Eau douce (conditions standard)	Eau de mer
Poids (g)	239 $\pm$ 8 (11)*	267 $\pm$ 8 (11)	226 $\pm$ 8 (8)	202 $\pm$ 13 (6)
RGS	1,57 $\pm$ 0,05 (11)	1,59 $\pm$ 0,08 (11)	2,05 $\pm$ 0,12 (8)	1,54 $\pm$ 0,02 (6)
Testostérone (ng/ml)	L 0,15 $\pm$ 0,04 (11)	0,21 $\pm$ 0,06 (11)	0,08 $\pm$ 0,02 (8)	0,09 $\pm$ 0,04 (6)
	G 0,16 $\pm$ 0,03 (4)	0,39 $\pm$ 0,16 (5)	0,10 $\pm$ 0,07 (4)	0,10 $\pm$ 0,04 (4)
	T 0,36 $\pm$ 0,14 (4)	0,58 $\pm$ 0,22 (5)	0,16 $\pm$ 0,02 (4)	0,12 $\pm$ 0,04 (4)
Oestradiol (ng/ml)	L 0,28 $\pm$ 0,13 (11)	22,2 $\pm$ 1,2 (11)	0,36 $\pm$ 0,15 (8)	8,08 $\pm$ 0,85 (6)
	G 0,30 $\pm$ 0,09 (5)	3,15 $\pm$ 0,49 (5)	0,14 $\pm$ 0,10 (4)	0,24 $\pm$ 0,19 (4)
	T 0,68 $\pm$ 0,34 (5)	26,2 $\pm$ 1,95 (5)	0,30 $\pm$ 0,12 (4)	7,72 $\pm$ 0,65 (4)
11 oxo- testostérone (ng/ml)	L 0,17 $\pm$ 0,05 (6)	0,30 $\pm$ 0,04 (10)	0,30 $\pm$ 0,09 (5)	0,24 $\pm$ 0,10 (5)
	G 0,10 $\pm$ 0,02 (6)	0,15 $\pm$ 0,02 (10)	0,20 $\pm$ 0,03 (5)	0,15 $\pm$ 0,02 (5)
	T 0,28 $\pm$ 0,07 (6)	0,45 $\pm$ 0,04 (10)	0,50 $\pm$ 0,12 (5)	0,39 $\pm$ 0,03 (5)

\* Le nombre d'animaux est indiqué entre parenthèses

Température : 11,5  $\pm$  0,5°C

L : fraction libre G : fraction glucuroconjuguée T : hormone totale (L + G)

Tableau 4 - Comparaison de l'action de différents stéroïdes sur la concentration hypophysaire en GTH immunoréactive chez l'anguille femelle.

Traitement *	0 (solution saline)	Progestérone	Testostérone	Cortisol	Oestradiol 17 $\beta$
Poids du corps g	204 $\pm$ 15	224 $\pm$ 15	213 $\pm$ 14	219 $\pm$ 15	215 $\pm$ 19
RGS	1,04 $\pm$ 0,09	0,94 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,19	0,80 $\pm$ 0,08	1,33 $\pm$ 0,10
GTH hypophysaire ( $\mu$ g ang GTH STD/mg hypophyse fraîche)	0,56 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 0,23 NS	1,36 $\pm$ 0,68 NS	5,54 $\pm$ 1,15 p < 0,005	148,5 $\pm$ 78,5 p < 0,005

\* Les animaux sont maintenus en eau douce à 20°C, en photopériode 8 L/16 D. Ils reçoivent 11 injections en 24 jours de 3,1  $\mu$ g de stéroïde/g poids du corps ou de solution saline seule ; 5 animaux/lot.



qui, bien que significative, reste très faible (tableau 4).

### C. Effets des facteurs externes

#### 1 - Sur la fonction gonadotrope

Aucun effet significatif de la salinité (eau douce ou eau de mer), de la température (10 ou 20°) ou de la lumière (photopériode 8 h jour - 16 h nuit, ou noir complet) sur la teneur hypophysaire en GTH d'anguilles non traitées n'a été observé au bout de 26 j, ni au bout de 3 mois (tableau 5 pour l'expérience de 3 mois).

Un protocole expérimental similaire à celui décrit dans le tableau 5 (mais avec deux animaux par lot et une durée d'adaptation de 45 jours) a été appliqué à des anguilles parallèlement traitées à l'oestradiol (21 injections de 2 µg/g). Les résultats obtenus indiquent que, là aussi, la teneur hypophysaire en GTH n'est pas différente en eau douce et en eau de mer ; par contre, ils suggèrent que le noir complet est capable d'augmenter cette teneur ( $2225 \pm 525$  µg ang GTH STD/mg d'hypophyse pour les 4 animaux au noir à 10°C versus  $859 \pm 70$  µg ang GTH STD/mg d'hypophyse pour les 4 animaux à 8 L/16 D à 10°C; test Mann-Whitney :  $P < 0,05$ ).

Quant à la GTH circulante (dosée dans les échantillons sanguins obtenus au moment du sacrifice, c'est-à-dire entre 10 h et midi), elle reste très faible dans tous les lots, qu'il s'agisse d'anguilles traitées ou non à l'oestradiol ; elle est indétectable ou en tous cas  $< 0,2$  µg ang GTH STD/ml, soit 0,4 ng d'équivalent cGTH/ml.

La présence éventuelle de pulsations de GTH qui auraient échappé à l'étude sur ces prélèvements ponctuels a été recherchée chez des anguilles de 400 à 690 g cathétérisées, adaptées depuis un mois à l'eau douce ou à l'eau de mer, à 10°C, sous une photopériode de 8 h jour - 16 h nuit (lumière allumée à 8 h 30). Des prélèvements de sang, effectués soit toutes les 3 heures pendant 24 heures, soit toutes les 90 mn de 15 à 22 h 30, soit toutes les 60 mn de 8 h à 17 h, ont montré des teneurs en GTH demeurant indétectables jusqu'à la dose de 100 µl, c'est-à-dire inférieures à 0,3 µg ang GTH STD/ml, soit 0,6 ng d'équivalent cGTH/ml.

#### 2 - Sur les stéroïdes sexuels (taux plasmatiques et métabolisme)

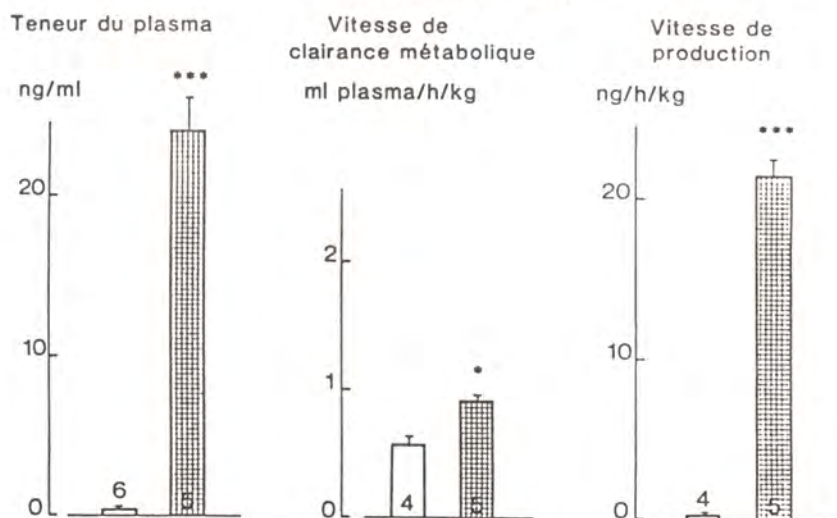
En ce qui concerne les stéroïdes, un effet important de la salinité a par contre été mis en évidence. Chez des anguilles adaptées à l'eau de mer, l'oestradiol plasmatique est considérablement augmenté ( $P < 0,01$ ), la fraction libre étant plus affectée que la fraction glucuroconjugée ; cette élévation est moins importante après 3 mois qu'après 1 mois d'adaptation (tableau 3). Les taux plasmatiques de testostérone et de 11-oxotestostérone ne sont pas, quant à eux, modifiés significativement. Les vitesses de clairance métabolique ont été déterminées pour la testostérone et l'oestradiol libres ; la figure 1 montre qu'elles sont légèrement mais significativement augmentées en eau de mer. Il en résulte que les vitesses de production sont encore plus accrues en eau de mer que les teneurs plasmatiques (figure 1).

Dans chacune des expériences (tableaux 3 et 5) dont il vient d'être question, le RGS ne varie pas significativement d'un lot à un autre. Il n'est en particulier pas modifié sous l'influence de l'eau de mer.

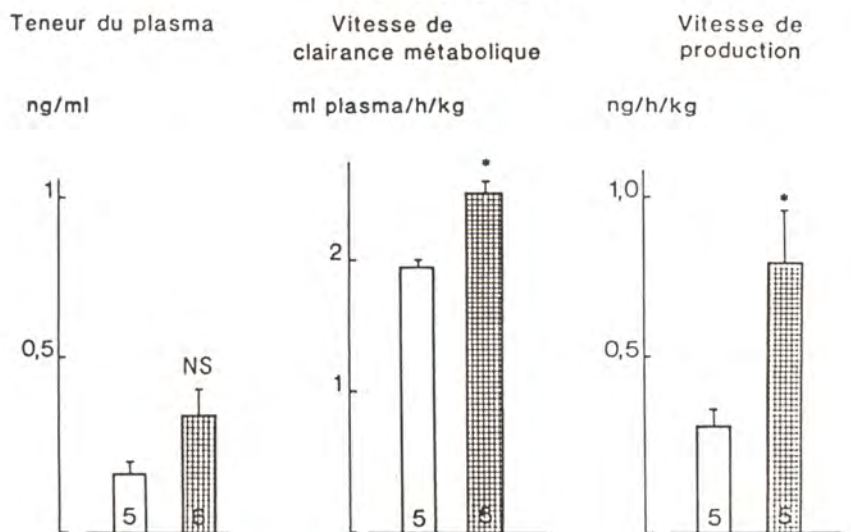
### III - DISCUSSION ET CONCLUSION

La teneur en GTH de l'hypophyse d'anguille argentée normale est voisine de celle trouvée chez le saumon juvénile (Crim et Peter, 1978) ou la truite juvénile (Crim et Evans, 1979) ; elle est environ 1000 fois plus basse que celle trouvée chez la carpe ou la truite matures (Weil, 1981). Les résultats obtenus avec le

## œstradiol<sub>17β</sub>



## testostérone



□ eau douce    ▨ eau de mer  
(1 mois)

Saison: automne T°:12°C

Figure 1 - Influence du changement de salinité du milieu extérieur sur le métabolisme des stéroïdes sexuels chez l'anguille argentée ♀. Le nombre d'animaux est indiqué à la base des colonnes.

\* P < 0,05      \*\*\* P < 0,01 (Test U de Mann et Whitney).



plasma sont également similaires à ceux d'autres auteurs travaillant sur des salmonidés immatures (Crim et Peter, 1978 ; Crim et Evans, 1979). Tout ceci confirme que l'activité gonadotrope de l'hypophyse est très faible chez l'anguille argentée en eau douce, en accord avec les données histologiques (Olivereau et Chambolle, 1978). Cette déficience gonadotrope explique que les taux de stéroïdes sexuels circulants soient eux-mêmes très bas, du même ordre que ceux mesurés chez des salmonidés juvéniles (Ng et Idler, 1980). On possède peu de données sur les clairances métaboliques des stéroïdes sexuels chez les poissons ; les valeurs obtenues ici sont faibles par rapport à celle trouvée pour la testostérone chez la Raie femelle mature (10 ml de plasma/kg/heure) (Fletcher et al, 1969) ou pour l'oestradiol chez la truite femelle au début de la période de recrudescence ovarienne (21 à 28 ml de plasma/kg/heure (Zohar, 1982).

Chez l'anguille ♀ l'oestradiol exerce un rétrocontrôle positif sur la biosynthèse de GTH comme il le fait chez des salmonidés immatures (Crim et Peter, 1978 ; Crim et Evans, 1979), mais aucune décharge de l'hormone n'est mise en évidence en accord donc avec les données histologiques d'Olivereau et Olivereau (1979).

L'hypophyse d'anguille est donc capable de répondre, comme celle de poissons juvéniles d'autres espèces, par une augmentation de la synthèse de GTH à une stimulation stéroïdienne : l'absence du mécanisme de rétrocontrôle positif sur la synthèse de gonadotropine ne peut donc être invoquée pour expliquer le blocage de la fonction gonadotrope chez l'anguille. L'effet positif des hormones stéroïdes sur la synthèse hypophysaire de GTH peut jouer un rôle physiologique important au cours de la maturation sexuelle de l'anguille, mais il apparaît dans nos expériences incapable de déclencher la puberté, du fait de la faible libération de GTH ; il n'intervient probablement, au cours de la puberté de l'anguille, qu'après une stimulation préalable du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire, en permettant une amplification de la synthèse de gonadotropine.

Aucune manipulation des facteurs du milieu extérieur ne nous a jusqu'ici permis de déclencher une sécrétion significative de la GTH hypophysaire. Les effets d'autres facteurs, et d'autres combinaisons de facteurs, sont en cours d'étude.

L'adaptation à l'eau de mer détermine une augmentation considérable de la production et du taux plasmatique d'oestradiol. Il n'en est pas de même pour la testostérone, ce qui signifie que l'aromatase est au moins autant stimulée que les activités enzymatiques intervenant dans la synthèse de la testostérone. La situation est différente de celle observée chez les anguilles subissant un traitement gonadotrope qui stimule la vitellogénèse (injection de l'extrait salin de 50 µg d'hypophyse de carpe/100 g poids du corps, 3 fois par semaine). On observe alors une élévation du taux plasmatique de l'oestradiol moins importante que chez les anguilles en eau de mer (maximum de  $4,60 \pm 0,80$  ng/ml, après 7 semaines de traitement). Simultanément, contrairement à ce qui est observé chez les anguilles en eau de mer, le taux plasmatique de la testostérone croît jusqu'à une valeur maximale de  $3,7 \pm 0,15$  ng/ml atteinte plus précocément (après 2 semaines) que pour l'oestradiol (Zohar, Querat et Leloup-Hatey, résultats inédits).

Quel est le mécanisme de l'augmentation de l'oestradiol circulant en eau de mer ? Si elle résulte d'une stimulation gonadotrope celle-ci doit rester faible puisque la GTH n'a pu être détectée dans le sang et puisque le RGS n'est pas modifié. Un mode de sécrétion pulsatile de la GTH a été démontré chez d'autres téléostéens, en particulier chez la truite, et les caractères de cette pulsatilité varient en fonction du stade (Zohar, 1982). Chez l'anguille juvénile, les pulsations pourraient être telles que seule la stéroïdogénèse soit affectée ; leur intensité doit en tout cas être faible, étant donné la très petite quantité de GTH présente dans l'hypophyse, et elles n'ont jusqu'ici pu être détectées. On

doit aussi envisager la possibilité que la salinité détermine l'augmentation de l'oestradiol par une voie différente (sans stimulation gonadotrope) ; cette hypothèse est en cours d'étude.

Malgré l'augmentation de l'oestradiol plasmatique en eau de mer (jusqu'à 20 ng/ml), la teneur en GTH de l'hypophyse ne s'élève pas significativement contrairement à ce qui est observé chez les animaux injectés d'oestradiol (où quelques résultats préliminaires indiquent que la teneur plasmatique est en général supérieure à 100 ng/ml). Des différences dans l'intensité et le rythme des élévations de l'oestradiol plasmatique rendent probablement compte de cette différence.

Quoiqu'il en soit, même dans l'éventualité où le facteur salinité participe à la stimulation de la fonction gonadotrope, il ne doit jouer à lui seul qu'un rôle limité, il intervient probablement en synergie avec d'autres facteurs externes qui se manifestent au cours de la migration vers la Mer des Sargasses.

Tableau 5 - Etude de l'influence de différents facteurs externes sur la fonction gonadotrope chez l'anguille (4 animaux par lot).

Conditions externes (durée : 3 mois)	Poids du corps (g)	Rapport gonado- somatique = RGS (%)	(GTH) hypophysaire ( $\mu$ g ang GTH STD/ mg hypophyse fraîche)
20°C lumière (8 L 16 D) eau douce	206 $\pm$ 14	0,81 $\pm$ 0,16	3,92 $\pm$ 3,41
10°C lumière (8 L 16 D) eau douce	251 $\pm$ 41	0,94 $\pm$ 0,26	4,18 $\pm$ 1,67
10°C lumière (8 L 16 D) eau de mer	250 $\pm$ 25	0,93 $\pm$ 0,06	3,40 $\pm$ 2,28
10°C noir complet eau douce	226 $\pm$ 18	0,84 $\pm$ 0,19	4,25 $\pm$ 2,27
10°C noir complet eau de mer	236 $\pm$ 3,5	0,91 $\pm$ 0,10	2,10 $\pm$ 0,78

La cGTH  $\beta$  nous a été fournie par le Docteur E. BURZAWA-GERARD, l'anticorps anti cGTH  $\beta$  par les Docteurs E. BURZAWA-GERARD et B. KERDELHUE, les immunosérums antitestostérone et antioestradiol par le Docteur M. TERQUI, l'immunosérum anti-11-oxotestostérone par le Docteur A. FOSTIER. Nous leur exprimons à tous notre gratitude.

Nous remercions Mesdames N. DELERUE-LE BELLE et A. HARDY, Mademoiselle S. BALOCHE pour leur assistance technique, Madame F. LIERON, Messieurs C. GRIZARD et P. LAFAY pour l'aide apportée lors de la réalisation de cet article.



- Burzawa-Gérard E., Dufour S. et Fontaine Y.A., 1980 - Relations immunologiques entre les hormones glycoprotéiques hypophysaires de poissons et de mammifères, ainsi qu'entre leurs sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Gen. Comp. Endocrinol., 41, p. 199-211.
- Burzawa-Gérard E. et Kerdelhué B., 1978 - Etude par radioimmunologie des propriétés des immunsérums de l'hormone gonadotrope de la carpe (Cyprinus carpio) et de ses sous-unités. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 18, p. 773-780.
- Crim L.W. et Peter R.E., 1978 - The influence of testosterone implantation in the brain and pituitary on pituitary gonadotropin levels in Atlantic Salmon parr. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 18, p. 689-694.
- Crim L.W. et Evans D.M., 1979 - Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (Salmo gairdneri). Gen. Comp. Endocrinol., 37, p. 192-196.
- Dufour S., Burzawa-Gérard E. et Fontaine Y.A., 1979 - Evolution des hormones glycoprotéiques hypophysaires : données radioimmunologiques sur les sous-unités de l'hormone gonadotrope de la carpe (Cyprinus carpio L.). C. R. Acad. Sc. Paris, sér. D, 289, p. 137-140.
- Dufour S., Delerue-Le Belle N. et Fontaine Y.A., 1983 a - Development of a heterologous radioimmunoassay for eel (Anguilla anguilla) gonadotropin. Gen. Comp. Endocrinol., 49, p. 404-413.
- Dufour S., Delerue-Le Belle N. et Fontaine Y.A., 1983 b - Effects of steroids hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European fresh water eel, Anguilla anguilla L. Gen. Comp. Endocrinol., 52, p. 190-197.
- Fletcher G.L., Hardy D.C. et Idler D.R., 1969 - Testosterone production and metabolic clearance rates in sexually mature male and female skate (Raja radiata). Endocrinology, 85, p. 552-560.
- Fontaine M., Bertrand E., Lopez E. et Callamand O., 1964 - Sur la maturation des organes génitaux de l'anguille femelle (Anguilla anguilla L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. C. R. Acad. Sc., Paris, 259, p. 2907-2910.
- Fontaine Y.A., Lopez E., Delerue-Le Belle N., Fontaine-Bertrand E., Lallier F. et Salmon C., 1976 - Stimulation gonadotrope de l'ovaire chez l'anguille (Anguilla anguilla L.) hypophysectomisée. Morphologie, activité adényl cyclase et phosphodiesterase de l'adénosine monophosphate cyclique. J. Physiol., Paris, 72, p. 871-892.
- Fontaine-Bertrand E., Salmon C. et Fontaine Y.A., 1978 - Effet d'hormones gonadotropes in vitro, sur la concentration de l'adénosine monophosphate cyclique dans l'ovaire de l'anguille (Anguilla anguilla L.). Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 18, p. 805-811.
- Fostier A., Billard R., Breton B., Legendre M. et Marlot J., 1982 - Plasma 11-oxotestosterone and gonadotropin during the beginning of spermiation in Rainbow Trout (Salmo gairdneri R.). Gen. Comp. Endocrinol., 46, p. 428-434.
- Jalabert B., 1976 - In vitro oocyte maturation and ovulation in Rainbow Trout (Salmo gairdneri), northern pike (Esox Lucius) and Goldfish (Carassius auratus). J. Fish. Res. Board. Can., 33, p. 974-988.

- Leloup-Hatey J., 1976 - Méthode de mesure des vitesses d'épuration métabolique et de sécrétion du cortisol chez l'anguille (Anquilla anguilla L.). Can. J. Physiol. Pharmacol., 48, p. 274-281.
- Ng T.B. et Idler D.R., 1980 - Gonadotropic regulation of androgen production in flounder and salmonids. Gen. Comp. Endocrinol., 42, p. 25-38.
- Oliverreau M. et Chambolle P., 1978 - Ultrastructure des cellules gonadotropes de l'anguille normale et après injection d'oestradiol. C. R. Acad. Sc ., Paris, sér. D, 287, p. 1409-1412.
- Oliverreau M. et Oliverreau J., 1979 - Effect of estradiol 17 $\beta$  on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. Cell Tissue Res., 199, p. 431-454.
- Siiteri P.K., 1975 - A universal chromatographic system for the separation of steroid hormones and their metabolites. In "Methods in Enzymology", O'Malley W. and Hardman J.G. Eds, Acad. Press, N.Y., 34, Part A, p. 485-489.
- Tait J.F. et Burstein S., 1964 - In vivo studies of steroid dynamics in man. In "The hormones". Pincus G., Thimann K.V. et Astwood E.B. Eds, Acad. Press, N.Y., 5, p. 441-557.
- Weil C., 1981 - La fonction gonadotrope de l'hypophyse au cours du cycle sexuel chez deux poissons téléostéens, la carpe commune (Cyprinus carpio) et la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri) ; son contrôle par l'hypothalamus, les gonades et les facteurs externes. Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 250 p.
- Zohar Y., 1982 - L'évolution de la pulsativité et des cycles nycthémeraux de la sécrétion gonadotrope chez la truite arc-en-ciel femelle, en relation avec le cycle sexuel annuel et par rapport à l'activité stéroïdogénèse de l'ovaire. Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 273 p.

---

- Travail soutenu en partie par les ATP "Bases biologiques de la reproduction" (C.N.E.X.O., C.N.R.S., Mission de la Recherche) et "Biologie de la reproduction et du développement" (C.N.R.S.).

---



INDUCTION DE L'OVULATION ET STIMULATION DE LA SPERMATION  
PAR LE LHRH OU UN ANALOGUE DE LHRH ASSOCIE OU NON AU PIMOZIDE  
CHEZ QUELQUES ESPECES DE POISSONS TELEOSTEENS

R. BILLARD (1), CLAUDINE WEIL (1), G. BARNABE (2)

R E S U M E \*

Dans le but d'identifier des produits de substitution aux agents d'induction de ponte classiquement employés chez les poissons, comme HCG ou des préparations hypophysaires, dont l'emploi pose parfois des problèmes, nous avons testé l'efficacité du LHRH et d'un de ses analogues (LHRH-A = D-Ala<sup>6</sup> LHRH éthylamide) sur l'induction de l'ovulation et la stimulation de la spermiation. En outre le LHRH-A a été combiné à un agent anti dopaminergique, le pimozide, dans le but de tenter de lever l'inhibition exercée par la dopamine sur la libération des gonadotropines (GtH). Chez la carpe, le LHRH-A seul n'a pas induit l'ovulation mais seulement la maturation ovocytaire. L'association de pimozide et de LHRH-A a significativement amplifié la sécrétion d'hormone gonatropie induisant l'ovulation et stimulant la spermiation. Cette combinaison a avancé l'ovulation chez la truite. La qualité des ovules a été sensiblement altérée par le traitement au pimozide chez la truite et reste à être testée chez la carpe. Chez le bar, le LHRH-A est beaucoup plus actif que LHRH et des ovulations sont obtenues à des doses extrêmement faibles : 0,5 et 1 µg/kg de poids vif avec des qualités d'oeufs très satisfaisantes. Les expériences ont été conduites chez la carpe et la truite, espèces pour lesquelles il existe des techniques de dosage de la GtH et des disponibilités importantes en animaux expérimentaux. Des applications sur un nombre restreint d'animaux ont été faites chez le bar.

A B S T R A C T \*

Induction of ovulation and stimulation of spermiation by LHRH or an LHRH analog associated or not with pimozide. Effects on some teleost fish.

The object of this paper was to try to find some substitutes for the usual products used to induce laying in fish. The products currently employed, such as HCG or pituitary preparations, have caused some problems. We report here some experiments to test the effectiveness of LHRH and one of its analogs (LHRH-A = D-Ala<sup>6</sup> ethylamide) on induction of ovulation and stimulation of spermiation. LHRH was also combined with pimozide, an anti-dopaminergic agent, to try to cancel dopamine inhibition of gonatotropin (GtH) release. LHRH-A alone (50 µg/kg) did not initiate ovulation but only oocyte maturation. When pimozide (10 mg/kg) and LHRH-A (50 µg/kg) were combined, gonadotropic hormone secretion was significantly increased, causing ovulation and stimulating spermiation. This combination advanced ovulation in trout. Trout egg quality was markedly altered by the pimozide treatment; it remains to be tested in carp. In sea bass, LHRH-A was much more effective than LHRH, and ovulation was obtained at very low doses (0,5 and 1 µg/kg live weight) with very satisfactory egg quality.

(1) Laboratoire de Physiologie des Poissons,  
Campus de Beaulieu 35042 RENNES Cedex

(2) Station de Biologie Marine et Lagunaire  
34200 SETE

L'induction de l'ovulation et quelquefois la stimulation de la spermiation sont obligatoires dans le cas de certaines espèces qui ne se reproduisent pas spontanément en captivité (exemple : la carpe, le bar). Dans d'autres cas, il est utile d'avancer ou de synchroniser les ovulations pour mieux gérer les géniteurs et l'écloserie (exemple : les salmonidés).

L'approche la plus souvent pratiquée pour obtenir la libération des gamètes, consiste à administrer des préparations hormonales. Parmi celles-ci, il faut citer une hormone mammalienne HCG (Hormone chorionique humaine) qui est injectée à des doses variant entre 200 et 1000 unités internationales par kg de poids corporel et quelquefois même davantage (voir revue par Zohar et Billard, 1978). Cependant, HCG n'est active que sur certaines espèces : daurade, poisson rouge, bar, mullet mais n'a pas d'effet sur la carpe. Il a d'autre part été montré que HCG provoquait une artériosclérose chez la truite (House et al, 1979).

Une autre source d'hormone est représentée par des extraits hypophysaires de poissons, les plus courants étant ceux de carpe et de saumon. Ils sont largement utilisés mais sont en général bruts, et leur activité biologique n'est pas connue. La  $17\alpha$  hydroxy  $20\beta$  dihydroprogestérone a aussi été proposée pour induire l'ovulation (Jalabert et al, 1977, Bry, 1980, voir revue par Billard, 1983) mais ne fait pas encore l'objet d'application large en pratique piscicole.

Par contre, l'usage d'une neurohormone hypothalamique identifiée chez les mammifères, le LHRH (luteinizing hormone releasing hormone) et plus spécialement celui d'un analogue, le LHRH-A (Des-Gly<sup>10</sup>- D-Ala<sup>6</sup> LHRH éthylamide) s'est développé en Chine pour induire la ponte chez plusieurs espèces de carpes (Anon, 1975, 1977). Actuellement l'emploi de différents analogues du LHRH se répand également en salmoniculture (Donaldson et al, 1982, Crim et al, 1983 a-b, Crim et Glebe, 1983). Ce composé et ses analogues présentent en effet des avantages non négligeables. Ils provoquent la libération de l'hormone gonadotrope endogène (revue de Lam, 1982), ils sont aisément synthétisés, ils sont facilement disponibles et leur activité biologique est plus constante que celle des extraits bruts hypophysaires. Un dosage plus précis est donc dès lors possible. Ils sont, d'autre part, peu antigéniques et se montrent actifs, au moins chez certaines espèces, à des doses relativement faibles; des résultats récents montrent que les doses peuvent être réduites par l'addition de produits antidopaminergiques (voir ci-après).

Des travaux portant chez différentes espèces sur l'induction de la reproduction par le LHRH ou le LHRH-A ont été entrepris dans le cadre de l'action thématique programmée "Bases biologiques de l'Aquaculture", et ont fait l'objet d'un certain nombre de publications (Billard et al, 1983 a-b-c). Le présent article résume un certain nombre de ces résultats et envisage quelques-uns des problèmes posés par l'usage des LHRH en vue de stimuler la libération des gamètes.

#### I - DIFFERENCE D'EFFICACITE DES LHRH ENTRE EUX ET ENTRE ESPECES

La littérature récente a montré qu'il existait, chez les poissons, de grandes différences d'efficacité entre le LHRH et celle de l'analogue Des-Gly<sup>10</sup>- [D-Ala<sup>6</sup>] LHRH éthylamide. Le LHRH-A apparaît plus actif que le LHRH sur la stimulation de la sécrétion gonatotrope chez le poisson rouge (Peter, 1980), la carpe (Breton et al, 1983) et le saumon coho (Van der Kraak et al, 1983).

Chez la tanche, il faut administrer des doses de l'ordre de 100-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LHRH pour induire l'ovulation (Kouril et Barth, 1981) alors que 10-40  $\mu\text{g}$  de LHRH-A suffisait (Kouril et al, 1983). De même chez la carpe, le LHRH-A est plus efficace que le LHRH pour stimuler la spermiation à la dose de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mais pas à la dose de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  où le LHRH se montre aussi actif que le LHRH-A (Billard et al, 1983 a).



Chez le bar, des injections intramusculaires pratiquées pendant la période de reproduction, à la Station de Biologie de Sète, (entre Novembre et Mars), ont également montré que le LHRH-A est beaucoup plus actif que le LHRH (tableau 1). Un LHRH commercial (Fertagyl, Intervet) n'est pas actif sur l'ovulation à la dose de 100 µg/kg; l'ovulation a cependant été obtenue à la dose de 1 mg/kg. Les expériences portant sur le LHRH-A à diverses doses et réalisées sur des effectifs réduits, tendent à montrer que l'ovulation peut être induite à partir de 0,5 µg/kg.

Ces doses de LHRH-A induisant l'ovulation apparaissent relativement faibles, comparées à celles habituellement rapportées dans la littérature pour le même analogue pour d'autres espèces de poissons d'eau douce, par exemple : 10 µg/kg en injection chez différentes espèces de carpes chinoises (Anon, 1977), plus de 100 µg/kg en injection intrapéritonéale chez le poisson rouge (Sokolowska et al, 1984), 50 µg/kg sous forme d'implant en silastic chez la truite arc-en-ciel, 5 µg/kg étant inactif, (Weil, résultats non publiés), 40 µg/kg en injection intrapéritonéale chez le saumon (Donaldson et al, 1982)

De même avec un autre analogue, le D-Trp<sup>6</sup> Des Gly<sup>10</sup> LH-RH éthylamide des doses de 37 et 184 µg/kg, administrées sous forme d'implant, sont efficaces chez la truite arc-en-ciel (Crim et al, 1983-b).

Bien qu'il soit difficile de comparer tous ces résultats étant donné les différents modes d'administration, les différences toujours possibles dans le stade sexuel, lors du traitement, et la gamme de doses de LHRH-A essayée par ces différents auteurs, le bar semble être un modèle intéressant car il apparaît peu sensible au LHRH et très sensible au LHRH-A (tabl. 1). L'ovulation peut donc être induite par ce composé et le fait en routine une séquence de deux injections de 1000 UI/kg de HCG espacées de 6 heures.

Les doses de LHRH et à un moindre degré de LHRH-A, apparaissent en général devoir être administrées à des doses relativement élevées pour obtenir une réponse gonadotrope hypophysaire et une reprise gonadique chez les poissons téléostéens. Ces doses sont plus fortes que celles généralement utilisées chez les vertébrés supérieurs. Cela peut être attribué à un problème de spécificité zoologique, mais la démonstration d'une telle spécificité n'a pas encore été faite clairement. Un autre élément d'explication peut résider dans le fait qu'il existe au moins dans certaines familles de poisson un système inhibiteur de la sécrétion gonadotrope hypophysaire qui pourrait limiter les effets du LHRH exogène; ce point sera discuté ci-après.

## II - LE SYSTEME INHIBITEUR DE LA SECRETION GONADOTROPE CHEZ LES TELEOSTEENS ET LES POSSIBILITES DE LA LEVEE D'INHIBITION

L'existence d'un système inhibiteur de la sécrétion gonadotrope a été démontrée chez le poisson rouge par Peter et al, 1978, Peter et Paulencu, 1980.

Cette inhibition de la sécrétion gonadotrope hypophysaire est originaire du noyau préoptique périvericulaire (NPP) qui est situé dans la région antéroventrale de la zone préoptique (voir revue par Peter, 1982). La fig. 1 montre bien que la lésion du NPP chez des poissons rouges ♂ et ♀, au repos sexuel, provoque une augmentation significative de la sécrétion gonadotrope hypophysaire par rapport à une opération fantôme. Cette augmentation est plus forte qu'après injection de LHRH-A seul, à la dose de 100 µg/kg poids vif. La combinaison de la lésion et de l'administration de LHRH-A amplifie fortement la réponse. La réponse due à la stimulation avec le LHRH-A seul, appliqué à des femelles gravides n'entraîne en général pas ou peu d'ovulation; par contre, les lésions et la combinaison lésion-stimulation induit l'ovulation de la plupart des femelles traitées (Peter et Paulencu, 1980).

**TABLEAU 1** : EFFET DE HCG, LHRH (FERTAGYL, INTERVET),  
LHRH-A (SIGMA) SUR L'OVULATION DU BAR  
BARNABE ET AL (NON PUBLIE)

TRAITEMENT	DOSE /KG	♀ INJECTÉES	♀ OVULÉES
LHRH	1 µg	6	0
	100 µg	4	0
	1 MG	6	6
LHRH-A	0,1 µg	3	2
	0,5 µg	4	4
	1 µg	6	6
	10 µg	3	3
	HCG	2 X 1000 UI	9
SOLVANT	0.5 ML	5	0

**TABLEAU 2**

NOMBRE DE JOURS ÉCOULÉS ENTRE LE TRAITEMENT ET L'OVULATION AU TAUX DE 80 % CHEZ LA TRUITE FARIO. LES VALEURS CORRESPONDENT À DIFFÉRENTES EXPÉRIENCES FAITES AU COURS DE LA SAISON DE REPRODUCTION 1982 À LA PISCICULTURE DE VERMENOUX.

TRAITEMENT	LRH-A SEUL			LRH-A + PIMOZIDE					
	INJECTION		IMPLANT	INJECTION			IMPLANT		
	1	2 <sup>(a)</sup>		MG PIM.	0	1	10	0	10
DOSE DE LRH-A									
0 µg	12	12	14	8	11	6	12	11	
1 "	14	16	15	12	7	6	--	--	
5 "	--	--	--	--	--	--	--	7	
10 "	8	9	15	6	5	4	--	--	
50 "	--	--	--	--	--	--	--	5	

(a) LA 2ÈME INJECTION EST ADMINISTRÉE 6 J. APRÈS LA 1ÈRE. LES JOURS SONT COMPTÉS APRÈS LA 1ÈRE INJECTION.

LES DOSES SONT DONNÉES PAR KG DE POIDS VIF

D'APRÈS BILLARD ET AL, 1983c



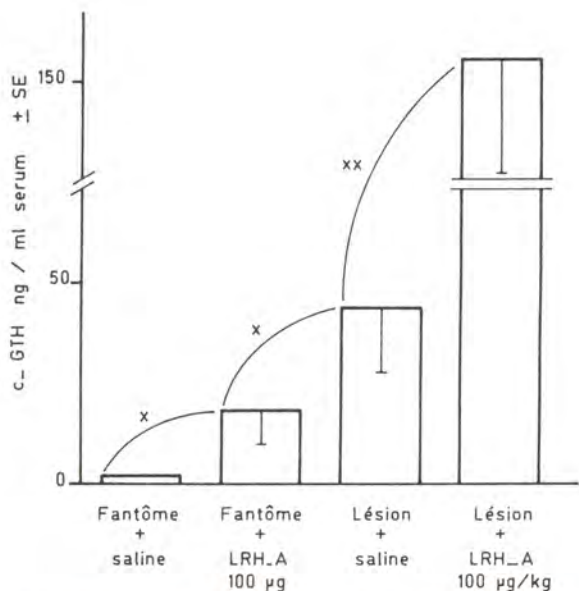


Fig. 1 : Effets consécutifs à l traitement au LHRH-A (100 µg/kg de poids vif) ou à des lésions du NPP, réalisés indépendamment ou en association, sur le taux de gonadotrophine (C-GTH) chez le poisson rouge (sexes mélangés) au repos sexuel. Température d'élevage 20°C, photopériode : 16 L 8 N (Peter et Billard, non publié) Fantôme = opération fantôme  
Saline = solution saline  
\* P < 0,05  
\*\* P < 0,01

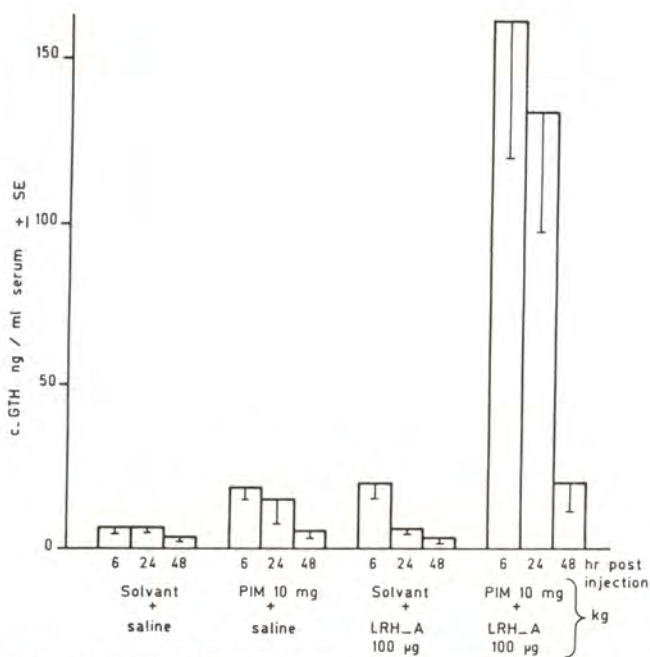


Fig. 2 : Effets de l'administration de LHRH-A associé ou non au pimozide (PIM) sur le taux de sécrétion de gonadotrophine chez le poisson rouge mâle en spermiation. Chaque lot reçoit le pimozide ou son solvant (Ringer acidifié), suivi 6 h plus tard de l'injection de LHRH-A ou de solution saline (saline). Les prélèvements de sang sont effectués 6, 24 et 48 heures après l'injection. Température d'élevage 20°C. Photopériode : 16 L 8 N (Sokolowska, Billard et Peter, non publié).

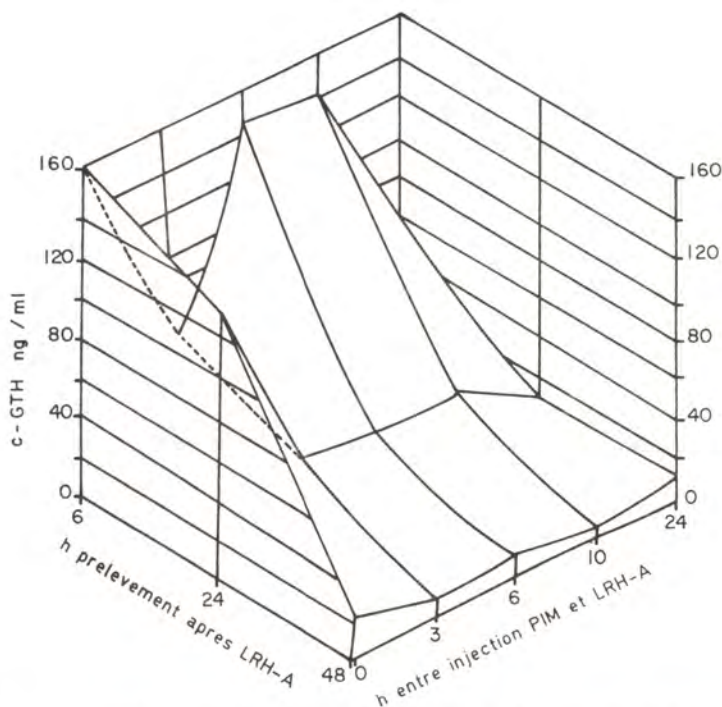


Fig. 3 : Evolution des teneurs en gonadotrophine (en ng/ml sérum) après traitement au pimoziide (PIM) (10 mg/kg) et au LHRH-A (100 µg/kg) chez le poisson rouge mâle en spermiation. L'intervalle entre l'injection de pimoziide et de LHRH-A varie entre 0 et 24 h et les prélèvements de sang sont pratiqués 6, 24 et 48 heures après l'injection de LHRH-A. Température d'élevage 20°C - photopériode 16 L 8 N (Sokolowska, Billard et Peter, non publié).

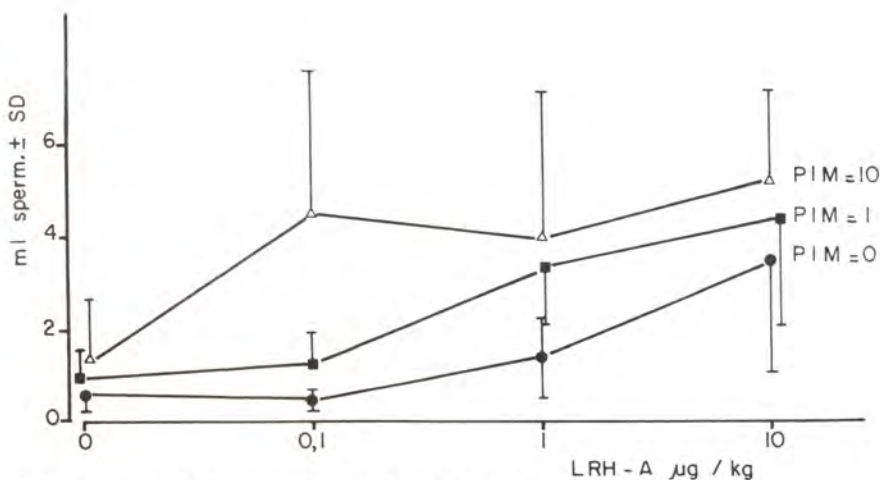


Fig. 4 : Effets de doses croissantes de LHRH-A et de pimoziide (PIM) sur la stimulation de la spermiation chez la carpe mâle. Expérience réalisée en Août sous photopériode naturelle et à une température d'élevage variant entre 16 et 19°C (Billard et al, non publié).



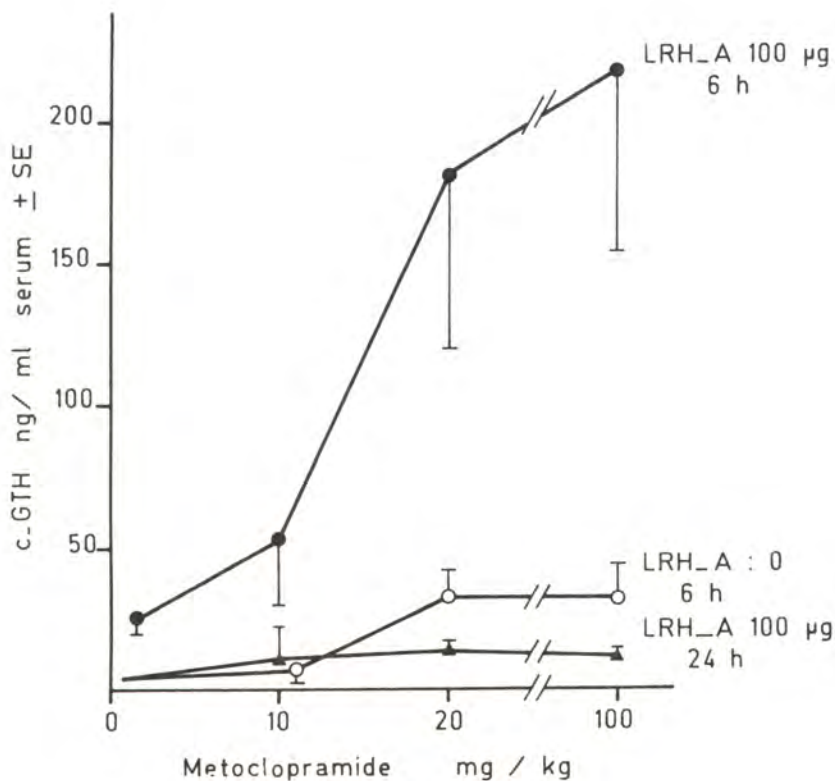


Fig. 5 : Effets, chez le poisson rouge femelle gravide, de doses croissantes de métochloramide (composé antidopaminergique) associé ou non (6 h plus tard) à du LHRH-A (100 µg/kg), sur le taux de C-GTH dans le sérum mesuré 6 et 24 heures après l'injection de LHRH-A ou de solution saline. Température d'élevage 20°C, photopériode (16 L 8 N) (Billard, Nohorniak et Peter, non publié).

Une situation analogue a été retrouvée chez la carpe où une lésion de l'aire préoptique provoque l'ovulation (Peter et al, non publié) : on voit que la levée de l'inhibition de la sécrétion gonadotrope par lésion du noyau hypothalamique autorise une stimulation beaucoup plus importante que par le LHRH-A.

Les recherches conduites pour identifier les facteurs impliqués ont montré que l'inhibition était due à la dopamine (Chang et Peter, 1982, 1983 a-b, Chang et al, 1983).

Dès lors des tentatives ont été faites pour associer des produits antidopaminergiques avec le LHRH-A. Le traitement conjoint de pimozide 10 mg/kg LHRH-A 100 µg/kg entraîne une amplification de la sécrétion gonadotrope chez le poisson rouge (Chang et Peter, 1982, 1983 b, Sokolowska et al, 1983) (voir aussi fig. 2); chez la carpe, Billard et al, 1983 b obtiennent l'induction de l'ovulation et la stimulation de la spermiation (doses de 50 µg/kg de LHRH-A et 10 mg/kg de pimozide. Une telle association a aussi été tentée avec succès chez la truite arc-en-ciel pour avancer l'ovulation, mais la fertilité des ovules s'est trouvée réduite par le traitement avec le pimozide (Billard et al, 1983 c). Chez la truite fario, le traitement combiné pimozide-LHRH-A, appliqué en pleine période de reproduction, avance les ovulations sans affecter la fertilité des ovules (Billard et al 1983 c) (voir aussi tabl. 2).

Dans les expériences qui viennent d'être rapportées, le traitement au pimozide était administré 6 heures avant l'injection de LHRH-A afin de ménager un certain temps pour la levée d'inhibition. Dans l'expérience rapportée dans la fig. 3 et portant sur le poisson rouge en spermiation, il apparaît que ce délai n'est pas nécessaire et que l'administration simultanée du pimozide et du LHRH-A entraîne une augmentation de la C-GTH sérique aussi importante que si les injections sont espacées de 6 h; la diminution observée après un intervalle de 3 h reste inexplicée.

Du fait du coût du traitement et en raison des effets délétères observés sur la fertilité des ovules chez les salmonidés, des essais de diminution des doses de pimozide ont été tentés. Chez la carpe mâle, il apparaît que les effets du traitement, mesurés par le volume de sperme recueilli, restent les plus marqués lorsque la dose de pimozide est de 10 mg/kg; dans ce cas, la réponse est maximale dès la dose de 0,1 µg/kg de LHRH-A (Billard, données non publiées). Il est donc nécessaire, au moins dans ce cas, de maintenir les doses élevées de pimozide de 10 mg, ce qui autorise une réduction de la dose de LHRH-A (fig. 4).

Un autre composé antidopaminergique, le métoclopramide a été testé en raison de son coût inférieur à celui du pimozide, mais les résultats de la figure 5 montrent que chez le poisson rouge gravide des doses élevées sont nécessaires, (20 à 100 mg/kg), pour obtenir des réponses notables. Ces réponses sont brèves et après 24 heures, le taux de C-GTH est revenu au niveau de base. La réponse était plus soutenue dans le temps dans le cas du pimozide administré à des O<sup>7</sup> spermants (voir fig. 2).

En conclusion, la levée du système inhibiteur de la sécrétion gonadotrope hypophysaire par des agents antidopaminergiques permet d'amplifier les effets du LHRH-A dont les doses peuvent alors être diminuées. Cependant, ces conclusions ne sont actuellement valables que pour un nombre limité d'espèces. L'existence d'effets secondaires sur la fertilité des oeufs, après traitement au pimozide dans le cas de l'avancement de l'ovulation chez la truite arc-en-ciel, demande à être confirmée mais semble inhérente à cette technique au moins pour certaines espèces.



Chez les mammifères, on a décrit un effet de désensibilisation de l'hypophyse par le LHRH ou ses analogues, quand ceux-ci sont administrés de façon prolongée : la sécrétion de LH est alors diminuée.

Chez les poissons, bien qu'un effet similaire ait été montré dans certaines conditions chez le poisson rouge O $\rightarrow$  avec des injections répétées d'un analogue (Peter, 1980), il n'a pas été retrouvé chez le saumon atlantique quand des analogues du LHRH sont administrés sous forme d'implants à certains stades de la gamétogénèse mâle et femelle (Crim et al, 1983 a). En effet des teneurs élevées en GTH sont observées chez le O $\rightarrow$  et la ♀ pendant 3 semaines, quand les implants sont administrés environ 2 mois avant la date de reproduction. Des prélèvements sanguins sériés, effectués chez le saumon préspermiant, ont montré que la teneur en GTH s'élevait dès le 1er jour après l'implantation et se maintenait à un niveau élevé pendant la durée de l'expérience qui était de 12 jours (Weil et Crim, 1983).

Ce maintien d'un niveau élevé de GTH pendant plusieurs semaines ne semble avoir lieu qu'à certains stades de la gamétogénèse; il serait plus bref (1 à 2 semaines) quand le LHRH est implanté chez des animaux déjà spermiant (saumon atlantique : Crim et al, 1983 a; truite arc-en-ciel : Weil, résultats non publiés).

Ces implants administrés environ 2 mois avant la reproduction se sont révélés actifs non seulement pour stimuler la sécrétion de GTH, mais également pour avancer l'ovulation (saumon atlantique : Crim et al, 1983 a; Crim et al, 1983 b) et la spermiation (Weil et Crim, 1983).

Plus récemment, l'avancement de l'ovulation a pu être obtenue chez la truite fario après implantation de doses plus faibles que celles utilisées par les précédents auteurs (5  $\mu$ g/kg au lieu de doses allant de 37 à 800  $\mu$ g/kg), mais seulement en combinaison avec 10 mg/kg de pimozide (Billard et al, 1983 c et tableau 2). En effet, l'ovulation au taux de 80 % est obtenu au bout de 7 jours au lieu de 11 jours chez les témoins recevant seulement du pimozide. Elle est également avancée quand 50  $\mu$ g de LHRH-A sont administrés avec 10 mg de pimozide. Par contre, le LHRH-A seul, aux doses de 1 et 10  $\mu$ g, n'avance pas l'ovulation.

L'administration du LHRH sous forme d'implants semble être adéquate chez les salmonidés pour maintenir des niveaux élevés en GTH observés au cours de la maturation ovocytaire (Zohar, 1982). Ce même auteur a montré expérimentalement que ces niveaux de base élevés étaient nécessaires pour la synthèse par les follicules de la 17 $\alpha$  hydroxy 20 $\beta$  dihydroprogestérone, inducteur final de la maturation ovocytaire chez les salmonidés.

Par contre, l'administration de LHRH-A, sous forme d'implant, ne peut à elle seule résoudre le problème de la sensibilité de l'animal au LHRH-A chez d'autres espèces comme le poisson rouge. En effet, chez cette espèce, l'efficacité du LHRH-A n'est pas améliorée par son administration sous forme d'implant (Sokolowska et al, 1984). Seule l'action simultanée du pimozide (agent antidopaminergique, voir II) permet d'obtenir un pourcentage d'ovulation élevée, que le LHRH-A soit injecté ou administré sous forme d'implant. Il faut rappeler que la décharge ovulante de GTH chez cette espèce est brève (Breton et al, 1972, Stacey et al, 1979).

L'utilisation du LHRH-A sous forme d'implant semble avoir un avenir prometteur chez des espèces comme les salmonidés où les niveaux de GTH sont élevés pendant la maturation ovocytaire. Cependant, des études complémentaires restent à faire. Des réponses gonadotropes plus soutenues pourraient se révéler nécessaires et pourraient être induites en obtenant aussi une diffusion prolongée du pimozide. Parmi les problèmes qui surgissent, il apparaît nécessaire de pratiquer l'intervention à un moment précis du cycle, c'est-à-dire après que les taux d'oestradiol aient commencé de décroître. Il se peut en définitive que cette technique d'administration par implants demande plus de matériel, LHRH-A et pimozide, que par injection, ce qui en limiterait l'intérêt.

#### IV - CONCLUSION

Les travaux récents faisant appel au LHRH-A pour obtenir l'ovulation et la spermiation des poissons semblent prometteurs en particulier dans le cas d'une levée préalable de l'inhibition dopaminergique de la sécrétion gonadotrope hypophysaire. Une meilleure efficacité du GnRH se doit d'être recherchée en procédant comme cela fut fait chez les mammifères à la substitution des amino acides dans la séquence du GnRH spécifique.

Il est, par ailleurs, nécessaire d'obtenir, pour les différents groupes et espèces, une bonne connaissance des profils neurohormonaux et hormonaux lors de la séquence maturation ovocytaire-ovulation et spermiation d'une part, et de la réceptivité des divers organes cibles de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique d'autre part.

- 
- ANON., 1975 - Experiments on inducement of spawning in domestic fish by injection of synthesized hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH). Kexue Tongbao 20, 1 : 43-48. Translation Series N° 4186 FMS.
- ANON., 1977 - Further research into the effects of LRH-A on induced ovulation in farm fish. Acta Biochim. Biophys. Sinica, 9 : 14-23.
- BILLARD R., 1983 - Sur quelques possibilités de maîtriser la reproduction chez les poissons téléostéens. La Pisciculture Française, 67 : 15-33.
- BILLARD R., CHOISIS J.-P. et REINAUD P., 1983 a - Stimulation of spermiation in carp in response to LH-RH and D-Ala<sup>6</sup>-LH-RH Ethylamide. Aquaculture, 35 : 173-176.
- BILLARD R., ALAGARSWAMI K., PETER R.-E. et BRETON B., 1983 b - Potentialisation par le pimozide des effets du LHRH-A sur la sécrétion gonadotrope hypophysaire, l'ovulation et la spermiation chez la Carpe commune (*Cyprinus carpio*). C.R. Acad. Sc. Paris, 296, III : 181-184.
- BILLARD R., REINAUD P., HOLLEBECQ M.G. et BRETON B., 1983 c - Advancement and synchronisation of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-A combined or not with pimozide. Symposium sur la reproduction des Salmonidés, Seattle, 31 Octobre-2 Novembre. Sous presse.
- BRETON B., BILLARD R., JALABERT B. et KANN G., 1972 - Dosage radio-immunologique des gonadotropines plasmatiques chez *Carassius auratus* au cours du nyctémère et pendant l'ovulation. Gen. Comp. Endocrinol., 18 : 463-468.
- BRETON B., JALABERT B., BIENIARZ K., SOKOLOWSKA M. et EPLER P., 1983 - Effects of synthetic LH-RH and analog on plasma gonadotropin levels and maturational response to 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone. Aquaculture, 32 : 105-114.
- BRY C., 1980 - Temporal aspects of macroscopic changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) oocytes before ovulation and ova fertility during the post-ovulation period; effect of treatment with 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone. Aquaculture, 24 : 153-160.

---

Une partie des résultats expérimentaux présentés dans cette revue a été obtenue dans le cadre de l'ATP CNRS-CNEXO "Bases biologiques de l'Aquaculture".



- CHANG J.-P. et PETER R.-E., 1982 - Actions of dopamine on gonadotropin release in goldfish *Carassius auratus*. Richter C.J.J. and Goos H.J.Th. (comp.), Reproductive Physiology of Fish, PUDOC, Wageningen: 51p.
- CHANG J.-P. et PETER R.-E., 1983 a - Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish *Carassius auratus*. Neuroendocrinology, 36 : 351-357.
- CHANG J.-P. et PETER R.-E., 1983 b - Effects of pimozide and Des Gly<sup>10</sup>, [D-Ala<sup>6</sup>] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration and ovulation in female goldfish *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 52 : 30-37.
- CHANG J.-P., COOK A.-F. et PETER R.-E., 1983 - Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 49: 22-31.
- CRIM L.-W. et GLEBE B.-D., 1983 - Advancement and synchrony of ovulation in atlantic salmon with pelleted LHRH analog. Symposium sur la reproduction des salmónidés, Seattle, 31 Octobre-2 Novembre. Sous presse.
- CRIM L.-W., EVANS D.-M. et VICKERY B.-H., 1983 a - Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40 : 61-67.
- CRIM L.-W., SUTTERLIN A.-M., EVANS D.-M. et WEIL C., 1983 b - Accelerated ovulation by pelleted LHRH analogue treatment of spring-spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperature. Aquaculture, 35 : 299-307.
- DONALDSON E.-M., HUNTER G.-A., VAN DER KRAAK G. et DYE H.-M., 1982 - Application of LH-RH and LH-RH analogues to the induced final maturation and ovulation of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisuth*). Richter C.J.J. and Goos H.J.Th. (comp.), Reproductive Physiology of Fish, PUDOC, Wageningen : 177-180.
- HOUSE E.-W., DORNAUER R.-J. et VAN LENTEN B.-J., 1979 - Production of coronary arteriosclerosis with sex hormones and human chorionic gonadotropin (HCG) in juvenile steelhead and rainbow trout *Salmo gairdneri*. Atherosclerosis, 34 : 197-206.
- JALABERT B., BRETON B., BRZUSKA E., FOSTIER A. et WIENIAWSKI J., 1977 - A new tool for induced spawning : the use of 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone to spawn carp at low temperature. Aquaculture, 10 : 353-364.
- KOURIL J. et BARTH T., 1981 - Inducing fish egg ovulation by means of LH-RH in the artificial stripping of tench (*Tinca tinca*). Bul. Vùrh Vodnany, 1 : 13-18.
- KOURIL J., BARTH T., HAMACKOVA J., SLANINOVA J., SERVITOVA L., MACHACEK J. et FLEGEL M., 1983 - Application LH-RH and its analog for reaching ovulation in female tench, grass carp, carp and sheat fish. Bul. Vùrh Vodnany, 2 : 3-16.
- LAM T.J., 1982 - Applications of endocrinology to fish culture. Can. J. Fish Aquat. Sci., 39 : 111-137.
- PETER R.-E., 1980 - Serum gonadotropin levels in mature male goldfish in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and des-Gly<sup>10</sup>-[D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH ethylamide. Can. J. Zool., 58 : 1100-1104.
- PETER R.-E., 1982 - Nature, localization and actions of neurohormones regulating gonadotropin secretion in teleosts. Richter C.J.J. and Goos H.J.Th. (comp.), Reproductive Physiology of Fish, PUDOC, Wageningen : 30-39.

- PETER R.-E. et PAULENCU C.R., 1980 - Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish *Carassius auratus*. Neuro-endocrinology, 31 : 133-141.
- PETER R.-E., CRIM L.-W., GOOS H.J.Th. et CRIM J.-W., 1978 - Lesioning studies on the gravid female goldfish : neuro-endocrine regulation of ovulation. Gen. Comp. Endocrinol., 35 : 391-401.
- SOKOLOWSKA M., PETER R.-E., NAHORNIK C.-S., PAN C.H. et CHANG J.-P., 1984 - Induction of ovulation in goldfish *Carassius auratus* by pimozide and analogues of LH-RH. Aquaculture, 36 : 71-83.
- STACEY N.-E., COOK A.-F. et PETER R.-E., 1979 - Ovulatory surge of gonadotropin in the goldfish *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 37 : 246-249.
- VAN DER KRAAK G., LIN H.-R., DONALDSON E.-M., DYE D.-M. et HUNTER G.-A., 1983 - Effects of LH-RH and des-Gly<sup>10</sup>-[D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH-ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Gen. Comp. Endocrinol., 49 : 470-476.
- WEIL C. et CRIM L.-W., 1983 - Administration of LHRH analogues in various ways : effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 35 : 103-115.
- ZOHAR Y., 1982 - L'évolution de la pulsativité et des cycles nycthémeraux de la sécrétion gonadotrope chez la truite arc-en-ciel femelle en relation avec le cycle sexuel annuel et par rapport à l'activité stéroïdogène de l'ovaire. Th. Doctorat Etat, Paris
- ZOHAR Y. et BILLARD R., 1978 - New data on the possibilities of controlling reproduction in teleost fish by hormonal treatment. Coll. Aquac. Thon, Sète, Actes de Colloques du CNEXO, 8 : 111-123.



LIAISON DE L'OESTRADIOL-17 $\beta$  DANS LES HEPATOCYTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL  
ET INDUCTION DE LA VITELLOGENINE ET DE SON ARNm SPECIFIQUE.

J.L. MAITRE, L. MERCIER, L. DOLO et Y. VALOTAIRE

Laboratoire de Biochimie Générale, Campus de Beaulieu, UER SVE,  
Université de RENNES I, 35042 Rennes Cedex.  
ERA C.N.R.S. n° 567.

R E S U M E.

Chez toutes les espèces ovipares étudiées à ce jour, la synthèse et l'utilisation de la vitellogénine (Vg) est un phénomène intimement lié à la reproduction. La synthèse de la Vg dans le foie de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*) est sous la dépendance de l'oestradiol ( $E_2$ ) qui agit vraisemblablement selon le schéma classique du mécanisme d'action des hormones stéroïdes. Après liaison de l'hormone à un récepteur spécifique, le complexe oestradiol-récepteur migre dans le noyau où il interagit avec l'ADN et module l'expression du gène de la Vg, ce qui se traduit par une augmentation de la synthèse de ARNm Vg et de Vg. Nous montrons ici : (1) la présence de récepteurs spécifiques des oestrogènes (constante de dissociation  $K_D = 1,5 \times 10^{-9}M$  pour  $E_2$ ) dans le cytosol du foie de truite mâle. (2) Le foie du mâle constitue un contrôle expérimental idéal au niveau "zéro". Nous avons suivi - dans le foie de truite mâle - la cinétique d'induction de l'ARNm Vg par hybridation avec l'ADNc Vg, après stimulation par  $E_2$  et (3) l'apparition de Vg dans le sérum en utilisant une technique de dosage original (rocket immuno-électrophorèse). Le modèle vitellogénine du foie de truite mâle et les techniques originales mises au point seront très précieuses pour étudier l'influence des facteurs endogènes et exogènes sur les différentes étapes (récepteurs, transcription, traduction) de la régulation de la synthèse de Vg.

A B S T R A C T.

In all egg laying vertebrates, synthesis and use of vitellogenin (Vg) are intimately bound to the active phase of reproduction. In the liver of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*), Vg synthesis is influenced by oestradiol ( $E_2$ ) which, we believe, acts through the classical mechanism of steroid hormone action. After binding of the hormone to a soluble specific receptor protein, the oestradiol-receptor complex is translocated to the nucleus, where it interacts with DNA and modulates expression of Vg genes, leading to increased synthesis of specific mRNA and Vg. We show here : (i) the presence of specific oestrogen receptors (dissociation constant  $K_D = 1.5 \times 10^{-9}M$  for  $E_2$ ) in the cytosol of the male trout liver. (ii) The male liver, offering, an ideal experimental control of "zero" background, we followed - in the liver of male trouts - the kinetics of induction of Vg mRNA by hybridization with Vg cDNA, after  $E_2$  stimulation, and (iii) the apparition of Vg in the serum by using an original rocket immuno-electrophoretic technique. The male trouts liver vitellogenin model and the original techniques we developed will be very useful to study the influence of endogenous and exogenous factors on the different steps (receptors, transcription, translation) of vitellogenesis regulation.

MOTS CLES : Vitellogénine, oestradiol, récepteurs, ARNm vitellogénine, truite.  
KEY WORDS : Vitellogénine, estradiol, receptors, mRNA vitellogenine, trout.

## INTRODUCTION.

Chez les vertébrés ovipares, les protéines du jaune d'oeuf sont synthétisées dans le foie sous forme d'une grosse molécule précurseur : la vitellogénine qui se scinde en phosvitine et lipovitelline après incorporation par les oocytes (Clemens 1974 ; Gruber et al 1976 ; Tata et Smith 1979 ; Wahli et al 1981).

La synthèse et l'utilisation de la vitellogénine sont des phénomènes intimement liés à la reproduction. Comme chez les autres vertébrés, la synthèse de vitellogénine chez les poissons est sous le contrôle direct des oestrogènes : oestradiol (Campbell et Idler 1976 ; Elliot et al 1979 ; Emmersen et Petersen 1976 ; Hara et Hirai 1978) et oestrone (Van Bohemen 1982 a, 1982 b). Cependant, à part les travaux de A.H. Roach et P.L. Davis (1980) sur le poisson-chat et, très récemment, ceux de Chen (1983) chez la truite arc-en-ciel, il n'existe guère de données sur les mécanismes moléculaires de la régulation de la synthèse de cette protéine chez les poissons.

L'objet de ce travail a été de montrer, à l'aide de techniques que nous avons mises au point ou adaptées (dosage de la vitellogénine et de son RNA messager), que les différentes étapes du mécanisme moléculaire d'activation des gènes de la vitellogénine : liaison de l'oestradiol à un récepteur spécifique, induction ou modification de l'expression des gènes conduisant à la synthèse de mRNA et de vitellogénine, étaient également présentes chez la truite arc-en-ciel.

## MATERIEL ET METHODES.

### *Animaux et produits chimiques.*

Les truites arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*) en provenance de la pisciculture de Gournay/Aronde (Oise) sont élevées dans les bassins du Laboratoire de Physiologie des Poissons (I.N.R.A. RENNES) dans un système d'eau recyclée (Petit et Ferron 1975) jusqu'à utilisation pour les expériences.

Les réactifs ont été obtenus chez les fournisseurs ci-après indiqués : 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>), oestrone (E<sub>1</sub>), oestriol (E<sub>3</sub>), diéthylstilbestrol (DES), 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT), 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -diol), bleu de Coomassie, bromure d'éthidium, ficoll, polyvinylpyrrolidone, serum albumin bovine (BSA) ADN de testicule de saumon (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.). Deoxyribonuclease I, ADN polymérase I, les 4 déoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et TTP (Boehringer Mannheim, R.F.A.). Déoxy(1',2',5-<sup>3</sup>H)cytidine 5' triphosphate 50 Ci/mmole, (méthyl 1',2'-<sup>3</sup>H)thymidine 5' triphosphate 109 Ci/mmole, (6,7-<sup>3</sup>H)17 $\beta$ -oestradiol 55 Ci/mmole (Amersham France SA).

### *Préparation du cytosol.*

Le cytosol a été préparé par homogénéisation du foie dans 4 ml de tampon I (20 mM Tris, 1,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) pH 7,4. L'homogénat a été centrifugé à 35 000xg à 0°C pendant 20 minutes et ensuite à 200 000xg à 0°C pendant 90 minutes.

### *Purification partielle des récepteurs.*

La précipitation fractionnée des protéines solubles a été réalisée sur une fraction de cytosol à des concentrations en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (AS) de 30 % et 50 % de sa-



turation. Une solution saturée de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le tampon I a été ajoutée goutte à goutte, avec agitation, à des fractions de cytosol. Après 30 minutes, la suspension a été centrifugée à 3 600xg pendant 10 minutes. Les culots AS 30 % et AS 50 % ont ensuite été dissous dans le tampon I.

#### *Mesure de la liaison de $^3\text{H}-\text{E}_2$ .*

Les constantes de dissociation ont été déterminées en ajoutant des concentrations croissantes ( $7,5 \times 10^{-10}\text{M}$  à  $5 \times 10^{-8}\text{M}$ ) de  $(^3\text{H})-\text{E}_2$  + un excès (100 fois) de  $(^1\text{H})-\text{E}_2$ , à 75  $\mu\text{l}$  de cytosol brut ou de préparation partiellement purifiée de récepteurs. Le volume final de chaque essai a été ajusté à 250  $\mu\text{l}$ .

La spécificité de la liaison a été déterminée par addition de 75  $\mu\text{l}$  de cytosol brut à des fractions de 175  $\mu\text{l}$  de  $(^3\text{H})-\text{E}_2$  ( $3,78 \times 10^{-9}\text{M}$ ) contenant des concentrations croissantes de stéroïdes compétiteurs dans le tampon I.

Après incubation, pendant 3 h à 0°C, l'hormone radioactive liée aux récepteurs a été mesurée par addition de 25  $\mu\text{l}$  de charbon-dextran à 10 % (DCC) dans le tampon I, centrifugation à 3 600xg pendant 10 minutes à 0°C et comptage de 150  $\mu\text{l}$  de surnageant dans 10 ml d'ACS (Amersham). La liaison non spécifique a été déterminée par la quantité de  $(^3\text{H})-\text{E}_2$  liée en présence d'un excès de  $(^1\text{H})-\text{E}_2$ . Elle a été soustraite des autres valeurs pour obtenir la quantité de  $(^3\text{H})-\text{E}_2$  liée spécifiquement.

#### *Extraction des stéroïdes et chromatographie sur couche mince.*

Le cytosol incubé pendant 3 h à 0°C en présence de  $(^3\text{H})-\text{E}_2$  ( $5 \times 10^{-9}\text{M}$ ) a été extrait par 2 fois 5 volumes d'un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (1/1). Après centrifugation à 3 600xg pendant 10 minutes, la phase organique a été évaporée à sec. L'extrait sec a été repris par du méthanol contenant les stéroïdes témoins  $\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$  et  $\text{E}_3$  (1 mg/ml) et déposé sur plaque (20 x 20 cm) de gel de silice. La séparation des stéroïdes a alors été effectuée à température ambiante dans le système de solvants chloroforme-acétate d'éthyle (80/20). Après repérage de la position des stéroïdes témoins à 254 et 366 nm, le gel de silice a été gratté par fraction de 0,5 x 1 cm. Les stéroïdes ont alors été extraits de chaque fraction par 2 x 2 ml d'acétate d'éthyle, évaporés à sec, repris par 200  $\mu\text{l}$  de méthanol, et comptés dans 2 ml d'ACS.

#### *Extraction des ARN.*

Les foies des animaux sont prélevés rapidement, congelés dans l'azote liquide et stockés au congélateur à -80°C jusqu'à utilisation. L'ARN total est extrait par la technique d'Auffray et Rougeon (1980), modifiée par Tenniswood et Simpson (1982). L'ARN poly A<sup>+</sup> a été préparé par chromatographie sur oligo-dT cellulose d'après la technique d'Aviv et Leder (1972), avec un taux de récupération de 10 à 30  $\mu\text{g}$  d'ARN poly A<sup>+</sup> par mg d'ARN total (Valotaire et al 1983). Les préparations d'ARN sont analysées par électrophorèse sur plaque d'agarose à 1,2% dans des conditions dénaturantes (Mc Master et Carmichel 1977) pour s'assurer de la qualité des préparations. La concentration en ARN est déterminée sur une aliquote par mesure de l'absorption à 260 nm.

#### *Hybridation de l'ARN messager vitellogénine.*

Les ARN sont immobilisés par liaison covalente sur des filtres de papier traités à l'amino-thio-phénol et diazotés selon la technique décrite par Seed

(1982). Des aliquotes de 10  $\mu$ l contenant 10  $\mu$ g d'ARN total ou 5 à 10 ng d'ARN poly A<sup>+</sup> sont déposées sur les filtres et incubées 12 h entre 2 feuilles de parafilm scellées. Les hybridations sont ensuite réalisées dans les conditions décrites par Wahl et al (1979) puis les filtres sont brûlés dans un "auto-oxidizer" Packard Tricarb modèle 306, et la radioactivité déterminée par scintillation liquide au moyen d'un appareil Isocap 300 (Nuclear Chicago).

La sonde utilisée, préparée en collaboration avec M. Tenniswood, D. Bailey et J.R. Tata (National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres), est un plasmide PAT 153 dans lequel a été inséré un fragment de 0,6 Kb correspondant à une séquence de l'ARN messager de la vitellogénine (Tenniswood et al 1983). Cette sonde a été marquée par "nick translation" en utilisant les déoxynucléotides triphosphates tritiés. L'activité spécifique est comprise entre 7 et 12  $\mu$ Ci/ $\mu$ g de DNA.

#### *Dosage de la vitellogénine.*

Le sang est prélevé chez les animaux en expérience par ponction dans la veine caudale à l'aide d'une seringue héparinée. Après 24 h de décantation, le sérum est obtenu par centrifugation à 2 000xg. Les échantillons sont ensuite stockés au congélateur à -20°C. Le taux de vitellogénine est déterminé par une technique d'immunoélectrophorèse que nous avons mise au point après préparation d'un anticorps spécifique (Y. Valotaire et al, soumis à publication). Les films de plastique (F.M.C. Gelbond films) sont découpés en carrés de 5 cm de côté. L'anticorps antivitellogénine est dilué au 1/400ème dans la solution d'agarose à 1%. Après refroidissement de l'agarose, on réalise 12 puits de 2 mm de diamètre par succion de l'agarose à l'aide d'une aiguille reliée à une trompe à vide. Neuf échantillons de 2  $\mu$ l peuvent ainsi être analysés par plaque de 5 cm de côté. Après électrophorèse (18 h à température ambiante, voltage constant = 2,3 mvolts/cm) les plaques sont lavées pendant 24 h dans le NaCl à 0,9% et 1 h dans l'eau distillée. Elles sont ensuite séchées sur papier Whatman 3 MM à l'étuve à 40°C et colorées au bleu de Coomassie. La quantité de vitellogénine est déterminée par mesure de la hauteur du pic d'immunoprécipitation par comparaison avec des pics standards obtenus avec des quantités croissantes de vitellogénine purifiée (Valotaire et al, soumis à publication).

#### *Dosage de l'oestradiol.*

Il a été réalisé par Radio Immuno Assay (R.I.A.) au Laboratoire de Physiologie des Poissons (Breton et al 1983).

## R E S U L T A T S.

#### *Détermination des caractéristiques du récepteur soluble du 17 $\beta$ -oestradiol.*

L'incubation de (6,7-<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> ± un excès (100 fois) de (1H)-E<sub>2</sub> et de cytosol, à 0°C, permet de montrer une liaison spécifique du 17 $\beta$ -oestradiol dans le cytosol de foie de truite. Cette liaison est maximale dès 30 minutes et reste stable pendant au moins 24 heures (L. Dolo et L. Mercier, résultats non publiés).

La mesure des paramètres de liaison du 17 $\beta$ -oestradiol dans le cytosol a été effectuée après 3 heures d'incubation à 0°C. Dans ces conditions, on n'observe pas de transformation du (6,7-<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> (figure 1).

La constante de dissociation (K<sub>D</sub>) a été mesurée dans le cytosol brut et dans des préparations partiellement purifiées de récepteurs après précipitation par le sulfate d'ammonium (fractions AS 30% et AS 50%).



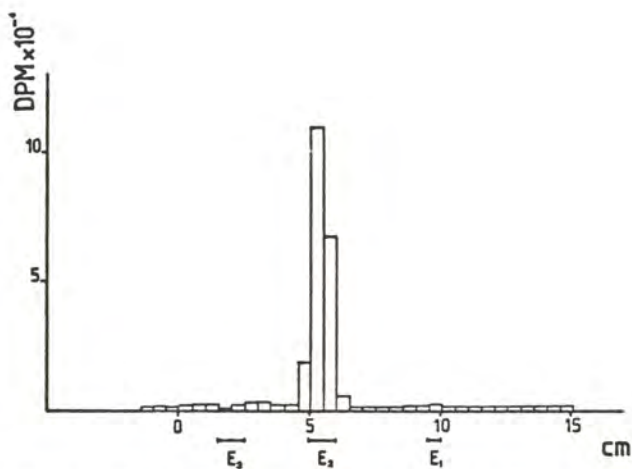


Fig. 1 - Séparation par chromatographie sur gel de silice, dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (80/20), des stéroïdes extraits après incubation du cytosol pendant 3 h à 0°C, et présence de (6,7-<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> (5 x 10<sup>-9</sup>M). La position des stéroïdes témoins est indiquée par un trait plein situé sous l'axe des abscisses (E<sub>3</sub> = oestriol, E<sub>2</sub> = oestradiol, E<sub>1</sub> = oestrone).

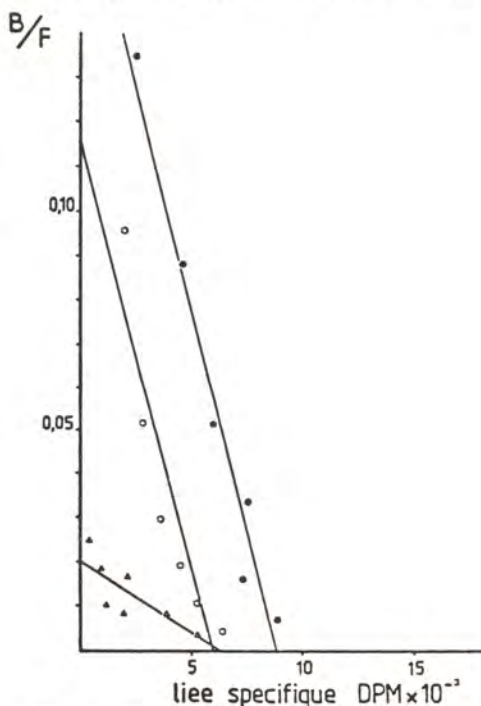


Fig. 2 - Représentation selon Scatchard de la liaison spécifique de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> dans le cytosol. Des fractions aliquotes de cytosol brut (●—●) ou de préparations partiellement purifiées de récepteur cytosolique - après précipitation fractionnée par (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - fraction AS 30 % (○—○) et AS 50 % (△—△) ont été incubées pendant 3 h à 0°C, en présence de concentrations croissantes (7,5 x 10<sup>-10</sup>M à 5 x 10<sup>-8</sup>M) de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> ± un excès (100 fois) (<sup>1</sup>H)-E<sub>2</sub>. L'hormone radioactive liée a été déterminée après élimination de l'hormone libre par le DCC. Dans tous les cas, l'hormone spécifiquement liée a été déterminée par soustraction de l'hormone liée non spécifique à l'hormone liée totale.

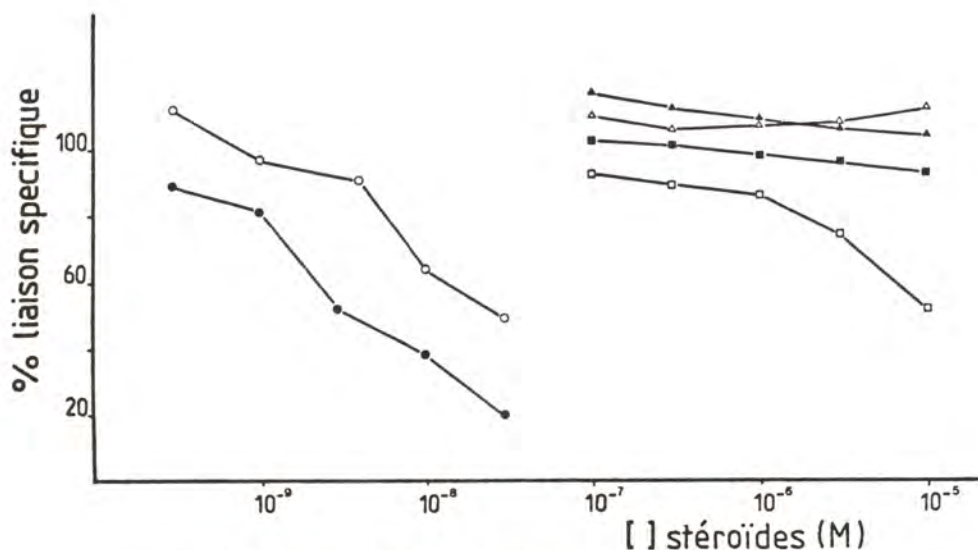


Fig. 3 - Compétition de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> (●), DES (○), 5α-DHT (□), 3β-diol (■), progesterone (▲), dexaméthasone (△) sur la liaison de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> dans le cytosol. Des fractions de cytosol ont été incubées en présence de 3,78 x 10<sup>-9</sup>M de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> et de concentrations croissantes des différents stéroïdes compétiteurs, pendant 3 h à 0°C. L'hormone radioactive liée a été mesurée après traitement des fractions par le DCC. La liaison non spécifique a été évaluée dans les mêmes conditions, en présence d'un excès (800 fois) de (<sup>1</sup>H)-E<sub>2</sub>. La quantité de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> spécifiquement liée en présence des différents stéroïdes est représentée en % du contrôle sans compétiteur.

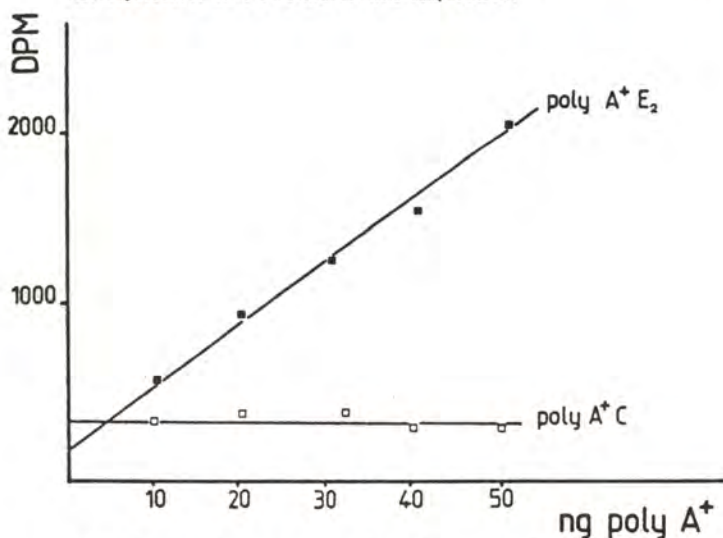


Fig. 4 - Hybridation des ARN poly A<sup>+</sup> de truites mâles stimulées à l'oestradiol et contrôle (Protocole I). Des quantités croissantes de ARN poly A<sup>+</sup> ont été déposées (10 à 50 ng) sur des carrés de papier Whatman 540 activés à l' amino-thio-phénol et diazotés. Après hybridation avec une sonde marquée au tritium, les disques sont brûlés dans un "auto-oxidizer" (Packard Tricarb modèle 306) et la radioactivité déterminée par scintillation liquide dans un compteur Isocap 300 (Nuclear Chicago).  
 ■ ARN poly A<sup>+</sup> d'animaux stimulés.  
 □ ARN poly A<sup>+</sup> d'animaux témoins.



La représentation de Scatchard de la liaison du 17 $\beta$ -oestradiol dans le cytosol (figure 2) n'est pas toujours linéaire, indiquant la présence d'au moins 2 types de sites de liaison. Par contre, après précipitation par (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, i.e. après purification partielle, on retrouve dans la fraction AS 30 % un composant unique de haute affinité K<sub>D</sub> = 1,52 x 10<sup>-9</sup>M. On note également dans la fraction AS 50 % un autre composant d'affinité plus faible K<sub>D</sub> = 9,01 x 10<sup>-9</sup>M, mais en quantité variable d'un cytosol à l'autre, et pouvant affecter la linéarité du graphique de Scatchard dans le cytosol total pour les concentrations les plus élevées en hormone.

La figure 3 montre la spécificité étroite de la liaison du 17 $\beta$ -oestradiol. Parmi les stéroïdes utilisés, seuls les oestrogènes ( (1H)-E<sub>2</sub> et DES) sont des compétiteurs efficaces de (3H)-E<sub>2</sub>. L'affinité relative du DES est toutefois plus faible (3 à 7 fois) que celle de E<sub>2</sub>. La 5 $\alpha$ -DHT est un compétiteur faible, tandis que le 3 $\beta$ -diol, la progestérone et la dexaméthasone ne sont pas compétiteurs.

#### *Induction de l'ARN messager de la vitellogénine.*

Un groupe de 15 truites mâles de 200 g environ a été divisé en 2 lots : le premier lot a reçu par voie intrapéritonéale une solution saline d'oestradiol-17 $\beta$  à raison de 0,5 mg/kg de poids, le second recevant uniquement le solvant. Le même protocole a été répété tous les 2 jours pendant 5 jours et les animaux ont été sacrifiés le septième jour (protocole I). Les injections répétées permettent d'obtenir un pourcentage important de messager spécifique.

La figure 4 représente les résultats de l'hybridation des ARN poly A<sup>+</sup> extraits des foies des 2 lots d'animaux et montre que uniquement les ARN poly A<sup>+</sup> purifiés à partir du groupe d'animaux stimulés sont capables de s'hybrider proportionnellement à la quantité d'ARN déposée sur les filtres. Des estimations semi-quantitatives après électrophorèse sur agarose 1,2 % ou hybridation en phase liquide nous avaient montré que l'ARN poly A<sup>+</sup> des animaux stimulés contenait environ 10 % de ARNm vitellogénine (Valotaire et al 1983). La quantité de ARNm décelable par la technique d'hybridation sur filtre serait donc de l'ordre de 1 ng, ce qui correspond à la sensibilité déterminée précédemment par P.F. Searle et al (1981) pour l'ARNm vitellogénine de Xénope.

#### *Cinétique d'induction de l'ARN messager de la vitellogénine.*

15 truites mâles de 200 g environ reçoivent une seule dose d'oestradiol-17 $\beta$  (Protocole II) dans les mêmes conditions que précédemment. Les animaux sont ensuite sacrifiés en fonction du temps. 10  $\mu$ g de ARN total de chaque échantillon sont déposés sur les filtres et soumis à hybridation avec la sonde spécifique.

La figure 5 montre que l'induction de l'ARN messager vitellogénine se produit après un temps de latence de 5 h et que le taux d'ARN est maximum 48 h après la stimulation. Cette quantité reste alors constante pendant 5 à 6 jours. 15 jours après l'injection, le taux de messager a déjà très nettement diminué : il ne reste plus que 10 % de la quantité maximum induite.

#### *Détermination quantitative de la vitellogénine.*

La figure 6 représente une courbe standard de quantification de la vitellogénine par immunoelectrophorèse. Des quantités croissantes de vitellogénine purifiée (30 à 400 ng) sont déposées dans les puits et soumises à l'électrophorèse en présence d'anticorps. La photographie prise après coloration des pics d'immunoprécipitation montre que la hauteur des pics (exprimée en mm) est directement proportionnelle à la quantité de vitellogénine déposée. La limite inférieure du dosage dans le sérum de truite est de 10  $\mu$ g/ml.

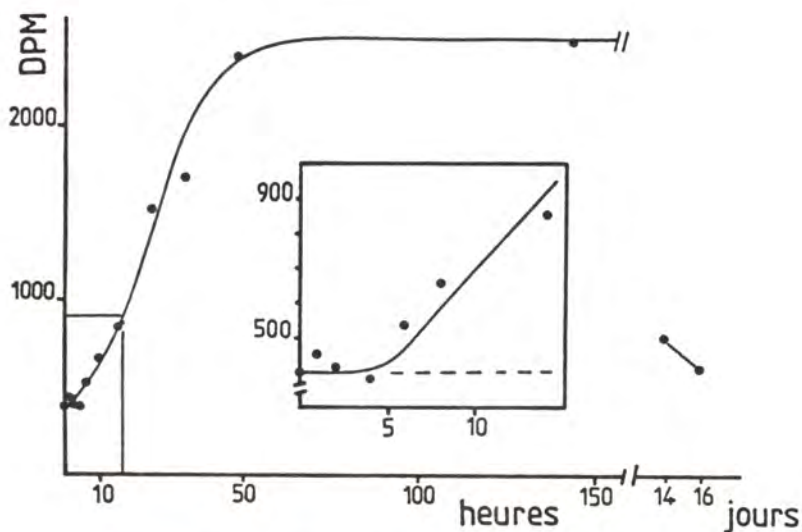


Fig. 5 - Cinétique d'apparition de l'ARN messager de la vitellogénine après stimulation à l'oestradiol-17 $\beta$ .  
 Un lot de 15 truites mâles de 200 g environ a été stimulé par injection intrapéritonéale d'une solution d'oestradiol-17 $\beta$  à raison de 0,5 mg/kg de poids (Protocole II). Les animaux ont été sacrifiés à des temps variables. 10  $\mu$ g de ARN total ont été déposés sur les filtres et la radioactivité correspondant à l'hybridation déterminée comme précédemment. L'encadré correspond aux temps brefs de stimulation.

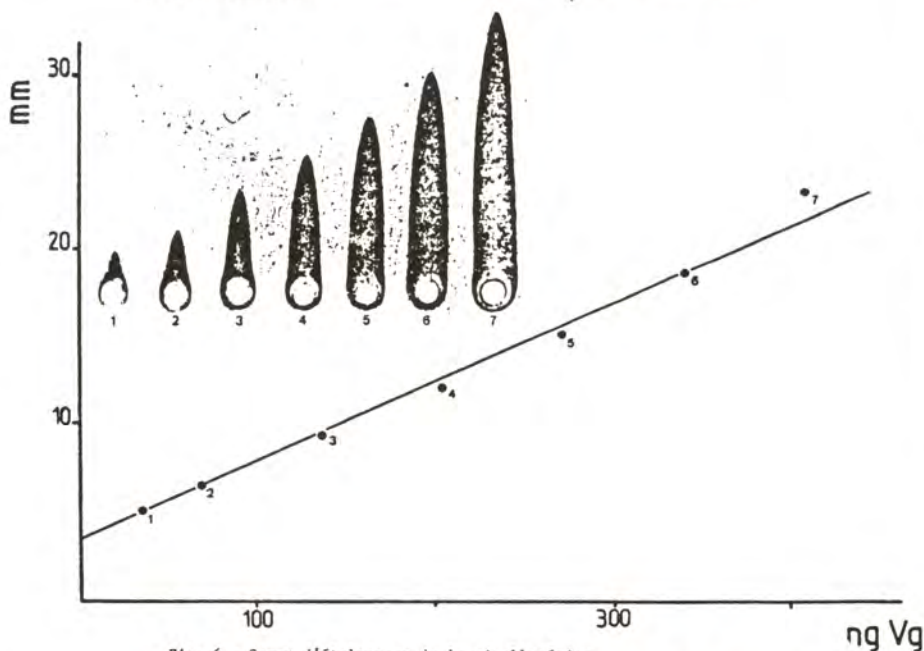


Fig. 6 - Gamme d'étalonnage de la vitellogénine.  
 Des quantités croissantes de vitellogénine de 34 à 408 ng ont été déposées dans les puits du gel d'agarose à 0,1 % contenant l'anticorps antivitellogénine dilué au 1/4000<sup>ème</sup>. La migration s'effectue sous 2,3 mvolts/cm pendant 18 h. Après séchage et coloration des plaques, les pics d'immuno-précipitation sont mesurés et la hauteur en mm est reportée en fonction de la quantité de Vg exprimée en ng.



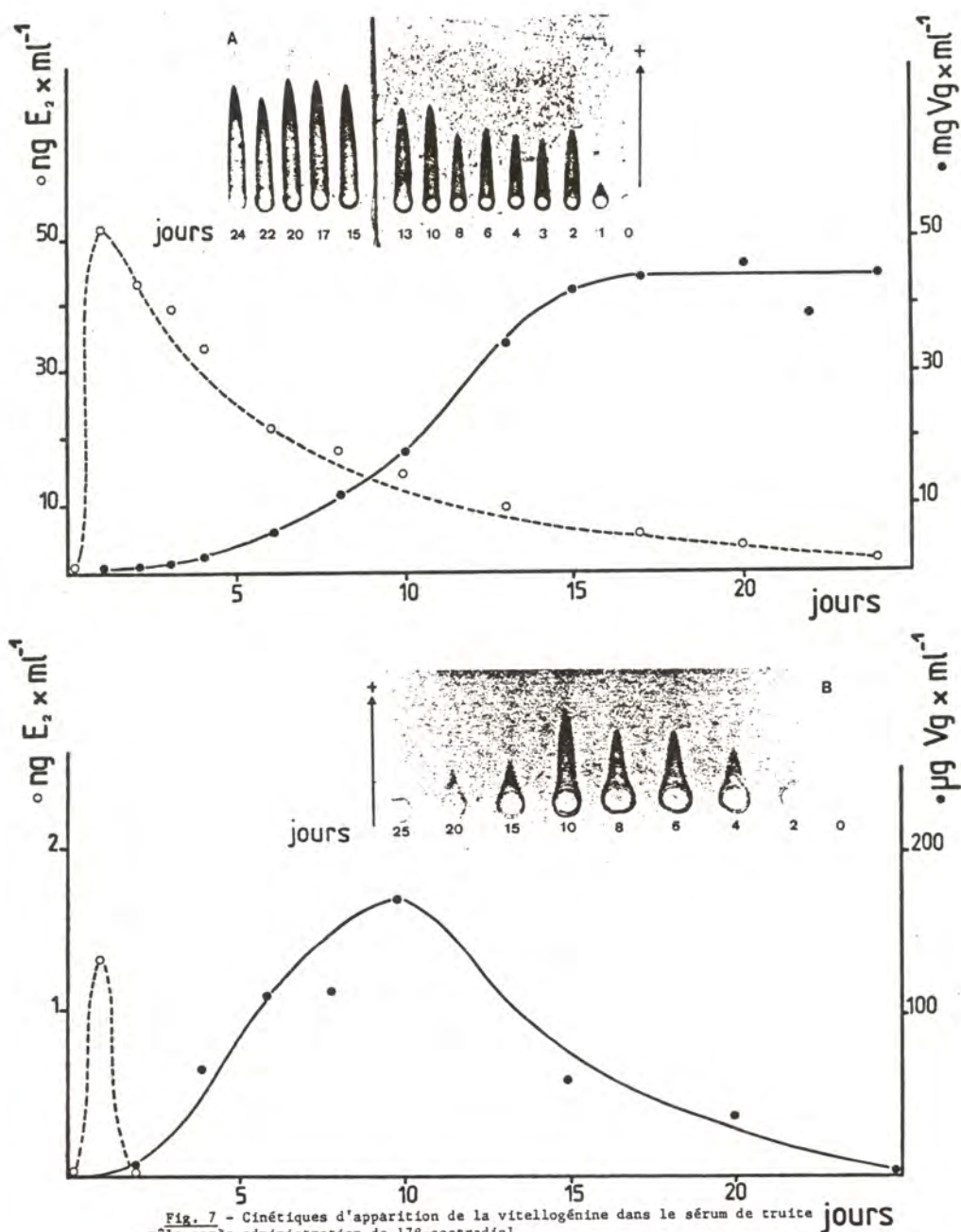


Fig. 7 - Cinétiques d'apparition de la vitellogénine dans le sérum de truite mâle après administration de 17β-oestradiol.

Le taux de vitellogénine dans le sérum a été déterminé par immuno-électrophorèse en utilisant de la vitellogénine purifiée comme étalon (voir fig. 6). Différentes dilutions de sérum ont été utilisées. -○- oestradiol. -●- vitellogénine.

7 A : Stimulation avec un implant d'oestradiol de 3 mg/ml. Aux jours de stimulation indiqués, les dilutions suivantes du sérum ont été effectuées pour le dosage : 0, 1, 2 (1/4) - 3 (1/10) - 4 (1/20) - 6 (1/50) - 8, 10 (1/100) - 13 à 24 (1/200).

7 B : Stimulation avec un implant d'oestradiol de 0,05 mg/ml. Tous les sérums ont été dilués au 1/2 avant dosage.

### *Cinétiques d'induction de la vitellogénine.*

Afin de pouvoir prélever du sang tous les jours au début de l'induction, la stimulation a été effectuée chez des animaux d'un poids voisin de 1 kg (truite A 1,2 kg - truite B 0,8 kg), le  $17\beta$ -oestradiol a été dissous dans le beurre de cacao à 40°C et injecté par voie intrapéritonéale de façon à produire un implant après solidification du beurre de cacao (truite A 3 mg d'oestradiol pour 1 ml de beurre de cacao - truite B 0,05 mg pour 1 ml de beurre de cacao). La concentration du serum en oestradiol a été mesurée par Radio Immuno Assay (R.I.A.). La figure 7 A montre que l'apparition d' $E_2$  dans le sérum est rapide chez la truite A et que sa concentration est du même ordre de grandeur que celle retrouvée chez les femelles en vitellogénèse ( $> 10$  ng/ml, Breton et al 1983). On observe une diminution régulière du taux d'oestradiol pendant une période de 25 jours. Chez la truite B (fig. 7 B) la concentration en oestradiol retrouvée dans le sérum est très faible. La seule mesure positive a été réalisée au lendemain de l'injection. La concentration en  $E_2$  était alors de 1 ng/ml. Cette concentration est inférieure à celle de truite femelle en prévitellogénèse (Breton et al 1983). Les cinétiques d'apparition de la vitellogénine chez les 2 animaux sont quantitativement très différentes. Chez la truite A (fig. 7 A) la vitellogénine est détectable dans le sérum après 24 h de stimulation et la concentration augmente régulièrement pour atteindre un plateau au 15<sup>ème</sup> jour. La vitellogénine représente alors plus de la moitié des protéines totales. On peut également observer que ce plateau est stable au moins jusqu'au 25<sup>ème</sup> jour, bien que la concentration en oestradiol dans le sérum soit considérablement réduite. Chez la truite B (fig. 7 B) la concentration en vitellogénine du sérum est très basse, le maximum étant environ 500 fois plus faible que chez la truite A. La technique d'immuno-électrophorèse utilisée nous permet néanmoins de suivre la cinétique d'apparition de la vitellogénine avec précision et montre que des concentrations d'oestradiol de l'ordre du ng/ml de sérum sont suffisantes pour induire la synthèse de la protéine.

### D I S C U S S I O N.

Nos résultats apportent la preuve de la présence de récepteurs de l'oestradiol dans le foie de truite mâle dans des conditions (incubation du cytosol à 0°C) où l'hormone n'est pas métabolisée.

2 types de sites ont été mis en évidence : les uns de haute affinité  $K_D = 1,55 \times 10^{-9}M$ , les autres d'affinité plus faible  $K_D = 6,79 \times 10^{-9}M$  (moyenne de 2 expériences). Ces 2 composants peuvent être séparés par précipitation fractionnée par  $(NH_4)_2SO_4$ . La présence du 2<sup>nd</sup> composant de faible affinité n'est pas systématique dans toutes les préparations de cytosol : parfois indétectable dans le cytosol brut, comme sur la fig. 2, parfois en quantité telle que les représentations de Scatchard se résolvent en 2 droites. La signification de ce deuxième type de site n'est pas facile à définir. Il pourrait s'agir d'une protéine "inusuelle" liant les stéroïdes sexuels, comme celle décrite par Dickson et al (1978) dans le foie de rat mâle, voire de protéine plasmatique. Il ne faut pas perdre de vue que le foie est le site de synthèse de protéines plasmatiques et que le taux de synthèse est susceptible de varier en fonction de l'état physiologique de l'animal. Les préparations de cytosol utilisées ne provenant pas d'animaux dans le même état physiologique (âge différent, animaux spermiant ou non), on peut penser qu'il y a là une explication à la variation du taux de ce second composant. Quand le cytosol ne contient qu'un seul composant de haute affinité, la constante de dissociation mesurée est identique à celle mesurée dans la fraction AS 30 %.



La spécificité de la liaison hormonale est très étroite puisque seuls les oestrogènes E<sub>2</sub>, DES, E<sub>1</sub> et E<sub>3</sub> (résultats non représentés) sont compétitifs. Contrairement à ce qui a été observé dans d'autres systèmes : foie de mammifère (Chamness et al 1975 ; Duffy and Duffy 1977), hypophyse antérieure de mammifère (Thieulant et Pelletier 1980 ; Thieulant et al 1981) ; foie de poisson (Le Menn et al 1980 ; Turner et al 1981), l'affinité relative du DES est ici en moyenne 3 à 7 fois plus faible que celle de E<sub>2</sub>. Le DES est un composé de synthèse qui ne se lie pas ou avec une faible affinité à la "sex hormone binding globulin" (SHBG) (Raynaud et al 1972). On pourrait donc s'interroger sur la signification de l'affinité plus faible du DES pour les sites de liaison de E<sub>2</sub> dans le cytosol de foie de truite. Ces sites de liaison de haute affinité sont-ils caractéristiques des récepteurs spécifiques ou seraient-ils dus à une contamination par la SHBG ? Cette dernière hypothèse paraît cependant peu vraisemblable. En effet, la SHBG a également été décrite chez la raie, *Raja radiata* (Freeman and Idler 1969 ; Idler et Freeman 1969), chez la roussette *Scyliorhinus canicula* (Martin 1975), chez l'aiguillat commun, *Squalus acanthias* (Ho et al 1980). Ces auteurs la décrivent comme une protéine liant les stéroïdes à 18 (androgènes), à 19 (oestrogènes), 21 (corticostéroïdes et progestérone) atomes de carbone avec une haute affinité. Chez la truite, *Salmo gairdnerii*, Fostier et Breton (1975) ont aussi décrit la présence de protéines plasmatiques liant les stéroïdes sexuels et les corticostéroïdes.

La spécificité étroite des sites de liaison pour les seuls oestrogènes (compétition très faible avec la 5 $\alpha$ -DHT, aucune compétition avec le 3 $\beta$ -diol, la progestérone et la dexaméthasone) semble devoir écarter l'idée que ces sites seraient dus à une contamination par des protéines plasmatiques dont la spécificité est au contraire très large.

En utilisant des préparations d'hépatocytes fraîchement isolés par perfusion du foie à la collagénase, nous avons pu montrer que les caractéristiques des récepteurs de E<sub>2</sub> étaient identiques à celles du foie (K<sub>D</sub> = 1,5 x 10<sup>-9</sup>M) (résultats non publiés). Nous tentons maintenant de démontrer que les caractéristiques des récepteurs sont aussi conservées dans des hépatocytes isolés maintenus en culture primaire et que dans ces conditions où le taux d'E<sub>2</sub> est bien contrôlé, il existe une corrélation étroite entre le nombre de sites de liaison occupés, le taux d'ARN messager de la vitellogénine et le taux de vitellogénine synthétisée.

La présence d'ARN messager spécifique de la vitellogénine n'a pu être mise en évidence chez la truite mâle qu'après stimulation à l'oestradiol. Chez les animaux témoins, même en augmentant les quantités d'ARN poly A<sup>+</sup> de 5 à 50 ng, nous n'avons jamais pu obtenir d'hybridation moléculaire avec la sonde spécifique. Ce résultat consolide les observations précédentes (Valotaire et al 1983 ; Chen 1983). La truite arc-en-ciel peut donc également constituer un excellent modèle pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes sous contrôle hormonal. En effet, l'oestradiol active un gène normalement silencieux chez le mâle, ce qui est assez inhabituel dans la plupart des modèles étudiés actuellement. Nous montrons également que la cinétique d'induction, comme chez d'autres espèces : Xénope, poulet (Ryffel 1978 ; Westley 1979), ne démarre qu'après un temps de latence de 4 à 5 h (encadré fig. 5). Ce temps de latence, plus ou moins long suivant les espèces, pourrait être dû à la synthèse de récepteurs spécifiques qui persisteraient à un niveau élevé, même après disparition de l'oestradiol injecté (Westley et Knowland 1979 ; Wright et al 1983).

En ce qui concerne les cinétiques d'apparition de la vitellogénine, les implants d'oestradiol utilisés délivrent dans le sérum des taux d'hormone comparables à ceux retrouvés chez la femelle au cours du cycle normal. On peut ainsi montrer que des concentrations d'oestradiol aussi faibles que 1 ng/ml de sérum sont capables d'induire la synthèse de vitellogénine chez le mâle, et on peut se demander si, chez la femelle, la synthèse de vitellogénine ne commence pas plus tôt qu'on ne le pense au cours du cycle annuel.

Ces expériences préliminaires avaient surtout pour but de préparer l'arsenal technologique nécessaire à l'étude de l'expression génétique de la vitellogénine chez la truite arc-en-ciel. Nous envisageons maintenant d'aborder des problèmes plus physiologiques. *In vivo* l'étude comparée des cinétiques de vitellogénèse (récepteurs, ARN messenger, vitellogénine), chez les 3 souches de *Salmo gairdnerii* qui pondent à des dates différentes, devrait nous permettre de savoir si le déclenchement du phénomène est synchrone avec modulation ultérieure de la vitesse de synthèse de vitellogénine ou si ces déclenchements sont décalés dans le temps et les vitesses de synthèse identiques.

Au cours du cycle normal, le déclenchement de la vitellogénèse est lié à l'élévation du taux d'oestradiol du sérum (Van Bohemen et al 1982 a, 1982 b ; Breton et al 1983). Parallèlement, il apparaît des taux d'oestrone importants. Le rôle de cette hormone dans la vitellogénèse a été mis en évidence par Van Bohemen (1982 a, 1982 b). Nous espérons obtenir des renseignements plus précis sur son mode d'action en déterminant son impact dans les différentes étapes de la régulation.

Enfin, à l'aide d'un système d'hépatocytes isolés que nous avons mis au point (résultats non publiés), nous espérons pouvoir tester *in vitro* un certain nombre de facteurs endogènes (hormones) et exogènes, antibiotiques, herbicides, pesticides pouvant avoir une influence sur la production de vitellogénine.

Nous remercions le Dr Fostier (Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A. RENNES) pour les dosages d'oestradiol.

- 
- AUFFRAY, Ch. and ROUGEON, F. : Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA.  
Eur. J. Biochem., 1980, 107, 303-314.
- AVIV, M. and LEDER P. : Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1408-1412.
- BRETON, B. ; FOSTIER, A. ; ZOHAR, Y. ; LE BAIL, P.Y. et BILLARD, R. : Gonadotrope glycoprotéique maturante et oestradiol-17 $\beta$  pendant le cycle reproducteur chez la truite Fario (*Salmo trutta*) femelle.  
Gen. Comp. Endocrinol., 1983, 49, 220-231.
- CAMPBELL, C.M. and IDLER, D.R. : Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum).  
Gen. Comp. Endocrinol., 1976, 28, 143-150.
- CHAMNESS, G.C. ; COSTLOW, M.E. and Mc GUIRE, W.L. : Estrogen receptor in rat liver and its dependence on prolactin.  
Steroids, 1975, 26, 363-371.
- CHEN, T.T. : Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout.  
Canad. J. of Biochem. and Cell Biol., 1983, 61, 802-810.
- CLEMENS, M.J. : The regulation of egg yolk protein synthesis by steroid hormones.  
Prog. Biophys. Mol. Biol., 1974, 28, 69-107.



- DICKSON, R.B. ; ATEN, R.F. and EISENFELD, A.J. : An unusual sex steroid binding protein in mature male rat liver cytosol.  
Endocrinology, 1978, 103, 1636-1646.
- DUFFY, M.J. and DUFFY, G.J. : Estradiol receptors in human liver.  
J. Steroid Biochem., 1978, 9, 233-235.
- ELLIOT, J.A.K.; BROMAGE, N.R. and WHITEHEAD, C. : Effects of estradiol-17 $\beta$  on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout.  
J. Endocrinol., 1979, 83, 54-55.
- EMMERSEN, B.K. and PETERSEN, I.M. : Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17 $\beta$  of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus* L.).  
Comp. Biochem. Physiol., 1976, 54B, 443-446.
- FREEMAN, H.C. and IDLER, D.R. : Sex hormone binding proteins. II. Isolation from serum of an elasmobranch (*Raja radiata*).  
Gen. Comp. Endocrinol., 1969, 13, 83-91.
- FOSTIER, A. and BRETON, B. : Binding of steroids by plasma of a Teleost : The rainbow trout, *Salmo gairdnerii*.  
J. Steroid Biochem., 1975, 6, 345-351.
- GRUBER, M. ; BOS, E.S. and AB, G. : Hormonal control of vitellogenin synthesis in avian liver.  
Mol. Cell. Endocrinol., 1976, 5, 41-50.
- HARA, A. and HIRAI, H. : Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*).  
Comp. Biochem. Physiol., 1978, 59B, 339-343.
- HO, S.M. ; TSANG, P. and CALLARD, I.P. : Some properties of a steroid-binding protein in the plasma of an ovoviviparous dogfish, *Squalus acanthius*, at different stages of the life cycle.  
Biol. Reprod., 1980, 23, 281-289.
- HORI, S.M. ; HODAMA, T. and TANAHASHI, K. : Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens.  
Gen. Comp. Endocrinol., 1979, 37, 306-320.
- IDLER, D.R. and FREEMAN, H.C. : Sex hormone binding proteins. I. Binding of steroids by serum of an elasmobranch (*Raja radiata*).  
Gen. Comp. Endocrinol., 1969, 13, 75-82.
- LE MENN, F. : Some aspects of vitellogenin in a teleostean fish : *Gobius niger* L.  
Comp. Gen. Biochem. Physiol., 1979, 62A, 495-500.
- LE MENN, F. ; ROCHEFORT, H. and GARCIA, M. : Effects of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver : vitellogenin accumulation.  
Steroids, 1980, 35, 315-328.
- MAC MASTER, G.K. and CARMICHAEL, G.C. : Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 4835-4838.

- MARTIN, B. : Steroid protein interaction in non mammalian vertebrates. I. Elasmobranch steroids-binding (E. SBP) in dogfish serum (*Scyliorhinus canicula*). Gen. Comp. Endocrinol., 1975, 25, 42-51.
- PETIT, J. et FERRON, J.L. : Les problèmes de l'eau en pisciculture. I. Le recyclage. La Pisciculture française, 1975, 42, 18-23.
- RAYNAUD, J.P. ; MERCIER-BODARD, C. and BAULIEU, E.E. : Rat estradiol binding plasma protein. Steroids, 1972, 18, 767-788.
- ROACH, A.H. and DAVIES, P.L. : Catfish vitellogenin and its messenger RNA are smaller than their chicken and *Xenopus* counterparts. Biochimica Biophysica Acta, 1980, 610, 400-412.
- RYFFEL, G.U. : Synthesis of vitellogenin, and attractive model for investigating hormone-induced gene activation. Mol. and Cell. Endocrinol., 1978, 12, 237-246.
- SEARLE, P.F. and TATA, J.R. : Vitellogenin gene expression in male *Xenopus* hepatocytes during primary and secondary stimulation with estrogen in cell cultures. Cell, 1981, 23, 741-746.
- SEED, B. : Diazotable arylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids. Nucleic Acids Res., 1982, 10, 1799.
- TATA, J.R. and SMITH, D.F. : Vitellogenesis : a versatile model for hormonal regulation of gene expression. Recent Progress in Hormone Research, 1979, 35, 47-90.
- TENNISWOOD, M. ; BAILEY, D. ; VALOTAIRE, Y. and TATA, J.R. : Gene expression in trout (*Salmo gairdnerii*) during vitellogenesis. Communication à Canadian Federation of Biological Society (Juin 1983).
- TENNISWOOD, M. and SIMPSON, A.J.G. : The extraction, characterization and in vitro translation of RNA from adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology, 1982, 27, 84-89.
- THIEULANT, M-L., SAMPEREZ, S. and JOUAN, P. : Evidence for 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol binding to the estrogen receptor in the cytosol from male rat pituitary. Endocrinology, 1981, 108, 1552-1560.
- THIEULANT, M-L. and PELLETIER, J. : Evidence for androgen and estrogen receptors in castrated rat pituitary cytosol : influence of time after castration. J. Steroid Biochem., 1980, 10, 677-687.
- TURNER, R.T. ; DICKHOFF, W.W. and GORBMAN, A. : Estrogen binding to hepatic nuclei of pacific hagfish *Eptatretus stoutii*. Gen. Comp. Endocrinol., 1981, 45, 26-29.
- VALOTAIRE, Y. ; TENNISWOOD, M. ; LE GUELLEC, C. and TATA, J.R. : The preparation and characterization of vitellogenin messenger RNA from rainbow trout. Biochem. J. (sous presse).
- VAN BOHEMEN, Ch.C. ; LAMBERT, J.C.D. ; GOOS, H.J.T. and VAN OORDT, P.G.W.J. : Estrogen and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo Gairdnerii*. Gen. and Comp. Endocrinol., 1982 a, 46, 81-92.



- VAN BOHEMEN, Ch.G. ; LAMBERT, J.G.D. and VAN OORDT, P.G.W.J. : Vitellogenin induction by estradiol in estrone-primed rainbow trout, *Salmo gairdnerii*.  
Gen. and Comp. Endocrinol., 1982 b, 46, 136-139.
- WAHL, G.M. ; STERN, M. and STARK, G.R. : Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 3683-3687.
- WAHLI, W. ; DAWID, I.B. ; RYFFEL, G.U. and WEBER, R. : Vitellogenesis and the vitellogenin gene family.  
Science, 1981, 212, 298-304.
- WESTLEY, B. : The relationship of the estrogen receptor to the induction of vitellogenin in chicken and *Xenopus* liver.  
Differentiation, 1979, 15, 67-72.
- WESTLEY, B. and KNOWLAND, I. : Estrogen causes a rapid, large and prolonged rise in the level of nuclear estrogen receptor in *Xenopus laevis* liver.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, 88, 1167-1172.
- WRIGHT, Ch.V.E. ; WRIGHT, S.C. and KNOWLAND, J. : Partial purification of estradiol receptor from *Xenopus laevis* liver and levels of receptor in relation to estradiol concentration.  
E.M.B.O. J., 1983, 2, 973-977.
- YU, J.Y.L. ; DICKHOFF, W.W. ; SWANSON, P. and GORBMAN, A. : Vitellogenesis and its hormonal regulation in the pacific hagfish *Eptatretus stouti* L.  
Gen. and Comp. Endocrinol., 1981, 43, 492-502.

## ETUDE PRELIMINAIRE DES EQUILIBRES DE DISTRIBUTION DE L'EAU ET DES IONS AU COURS DE L'OVOGENESE DE SOLEA SOLEA L.

J.L. GALLIS, F. LE MENN, A. LEBRUN et J. NUNEZ-RODRIGUEZ.

Laboratoire de Biologie Marine, Université de Bordeaux I,  
avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

### Résumé

Les mécanismes d'évolution de l'eau et des ions  $K^+$  et  $Na^+$  dans l'ovocyte, étudiés chez Solea solea L. au cours de l'ovogenèse, paraissent liés aux processus d'accumulation des réserves vitellines. Dans l'ovocyte, le ralentissement de l'accumulation de l'eau, parallèle à une accélération de son accumulation dans le milieu péricellulaire, est concomitant de l'entrée de vitellogénine. Ces processus sont associés à une baisse de la teneur en  $K^+$  intraovocytaire. La teneur ovocytaire en  $Na^+$  diminue dès la fin de la vitellogenèse exogène lorsque s'amorcent les premiers phénomènes de la maturation. L'accumulation d'eau dans l'espace péricellulaire pendant la vitellogenèse conditionnerait l'hydratation terminale de la maturation, se traduisant par un déplacement rapide et important de l'eau du compartiment péricellulaire dans l'ovocyte, la teneur globale de l'eau dans la gonade restant constante.

### Abstract

During oogenesis of Solea solea L., gonadal changes in water,  $Na^+$  and  $K^+$  ions seem to be related to yolk protein incorporation by the oocyte. The decrease in oocyte water accumulation, associated with an increase in pericellular water accumulation and a decrease in  $K^+$  concentration occurs when vitellogenin enters the oocyte.  $Na^+$  concentration decreases in the oocyte at the end of the exogenous vitellogenesis when the first stages of the oocyte maturation take place. Water accumulation in the pericellular space during vitellogenesis allows the rapid transfer of water from this compartment into the oocyte during the terminal phase of maturation. However the total amount of gonadal water remains stable.

**Mots clefs** : ions, eau, ovogenèse, maturation ovocytaire, Solea.

**Key words** : ions, water, oogenesis, oocyte maturation, Solea.



## INTRODUCTION

L'étude du cycle ovarien et des différents stades ovocytaires a fait l'objet de nombreux travaux histologiques, ultra-structuraux et cytochimiques. Très peu d'études ont été entreprises sur les variations de teneur en eau et en ions dans l'ovaire et dans les ovocytes au cours de l'ovogenèse (Dick and Lea, 1967 ; Ling and Ochsenfeld, 1977).

Nous avons suivi chez Solea solea L., au cours de la gamétogenèse d'individus sauvages, la distribution des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et de l'eau, en parallèle avec les modifications ultrastructurales de l'ovaire.

## MATERIEL ET METHODES

### 1) Capture :

Les poissons sont chalutés par le N/O "Côte d'Aquitaine" (CNRS) sur le plateau continental Sud-Gascogne, au large du Cap Ferret, en traits maximum de 10 minutes. Ils sont conservés en vivier sur le bateau, et stabulés pendant une courte période au laboratoire avant d'effectuer les prélèvements.

### 2) Prélèvements en chambre froide (0-4°C) :

Le poisson est assommé.

Le sang, prélevé dans la chambre cardiaque à l'aide d'une pipette Pasteur, après section du bulbe aortique, est recueilli dans des tubes héparinés (héparine lithium) et centrifugé. Le plasma est conservé à -20°C pour dosages ultérieurs des ions.

Des fragments d'ovaires sont prélevés pour dosages des ions et de l'eau, un autre fragment pour fixation en microscopie photonique. Le reste de la gonade est très rapidement perfusé pour la fixation en microscopie électronique.

### 3) Dosages de l'eau et des ions (Gallis, 1980) :

Chaque morceau d'ovaire prélevé est emballé dans un fragment de nylon accompagné de papier filtre. Le tout est entouré de parafilm et de papier aluminium et centrifugé à 1000g pendant 5 minutes.

Le liquide retenu lors de la centrifugation sur l'ensemble nylon et papier filtre correspond au liquide extractible que nous assimilons au liquide péricellulaire. Cet ensemble est placé dans un tube contenant 4ml d'eau désionisée pendant 2 jours, période nécessaire à la diffusion des ions dans l'eau.

L'organe centrifugé est récupéré et placé pendant au moins 2 jours à l'étuve à 110°C dans des tubes en Pyrex. La perte d'eau consécutive à la dessiccation correspond au liquide intracellulaire. L'organe déshydraté est alors mis à digérer pendant 3 jours à 20°C dans 40 volumes d'acide nitrique 0,1N.

#### 4) Techniques microscopiques :

Nous avons utilisé les techniques précédemment mises au point pour ce matériel (Nunez-Rodriguez, 1982 ; Nunez-Rodriguez et al., 1983).

### RESULTATS

#### 1) Evolution de la natriémie et de la kaliémie :

Le plasma représente un compartiment intermédiaire entre le milieu péricellulaire et le milieu extérieur. Chez de nombreux téléostéens, la composition du plasma est souvent influencée par la salinité du milieu extérieur.

Nous avons dosé les ions  $K^+$  et  $Na^+$  du plasma au cours de l'ovogenèse. Les deux teneurs sont constantes, celle du  $Na^+$  (137 à 3,2mEq/l) étant 25 fois plus grande que celle du  $K^+$  (5,4 à 0,4mEq/l).

#### 2) Les ions du compartiment intracellulaire ovocytaire

(Fig. 1 A et B) :

Au cours de l'ovogenèse la teneur en  $Na^+$  reste relativement stable (8 à 25mEq pour 100g de poids sec d'ovaire) par rapport à la grande variabilité de celle du  $K^+$  (5 à 110mEq pour 100g de poids sec) (Fig. 1 A).

L'analyse de l'évolution de la teneur de ces ions en fonction des stades ovocytaires montre une décroissance continue du  $K^+$  au cours de la gamétogenèse. A l'inverse, l'évolution du  $Na^+$  est biphasique, la teneur maximale étant observée en fin de vitellogenèse exogène (stade IV des femelles en premier cycle de ponte ou des femelles en cycles de ponte ultérieurs) (Nunez-Rodriguez, 1982).

#### 3) Evolution de l'eau dans l'ovaire (Fig.2 et 3) :

La teneur en eau (87,51 à 0,9g/100g de poids frais ovarien) et en matière sèche (12,49 à 1,1g/100g de poids frais ovarien) reste constante pendant les premiers stades de l'ovogenèse (individus immatures) et au cours de la vitellogenèse (Fig. 2).

L'analyse compartimentale permet de préciser la dynamique des processus d'accumulation d'eau dans la gonade (Fig. 3). Dans chacun des compartiments intra et péricellulaire, l'accumulation d'eau est biphasique et complémentaire. Elle se fait plus rapidement dans le compartiment intracellulaire que dans le compartiment pericellulaire lors des premiers stades de l'ovogenèse et jusqu'au début de la vitellogenèse exogène. Dès le début de l'accumulation intense des réserves vitellines, on constate un phénomène inverse avec accumulation préférentielle d'eau dans le compartiment pericellulaire au dépens du compartiment intracellulaire.



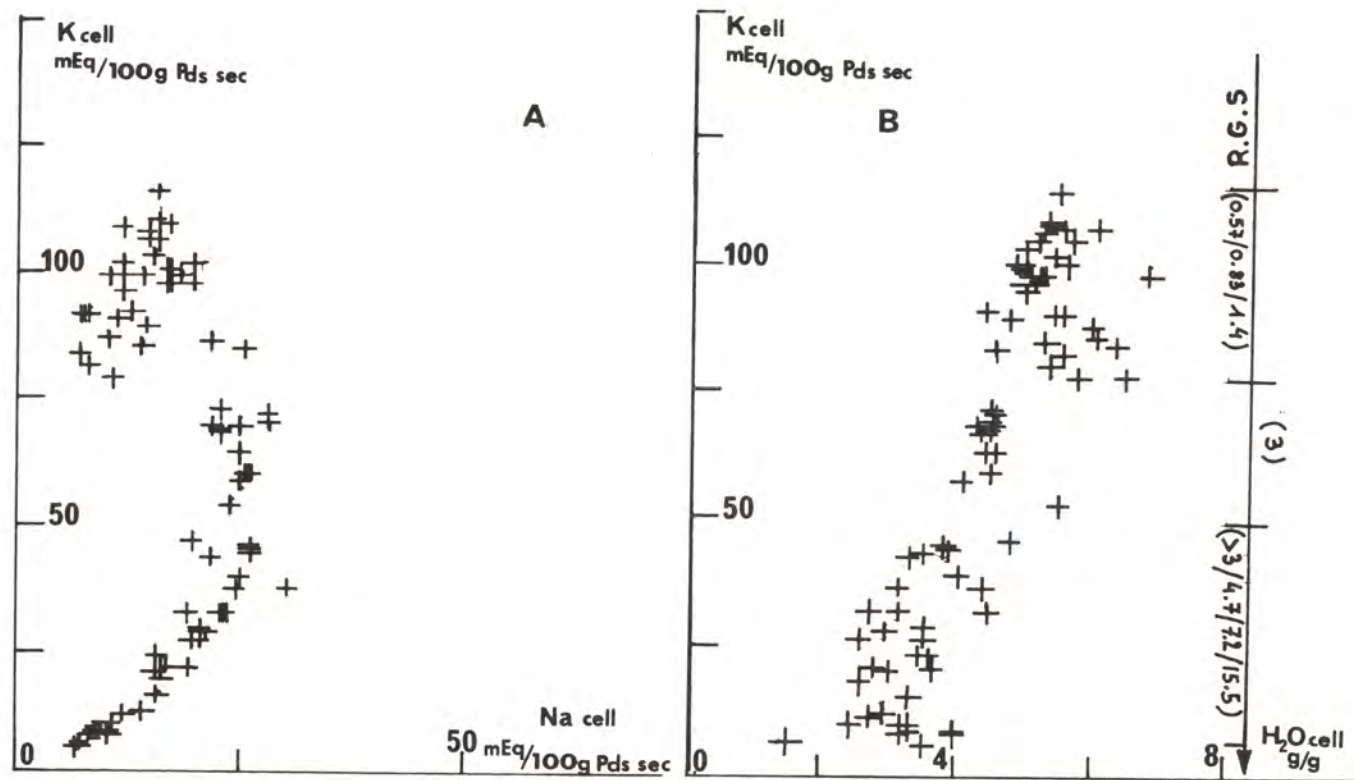
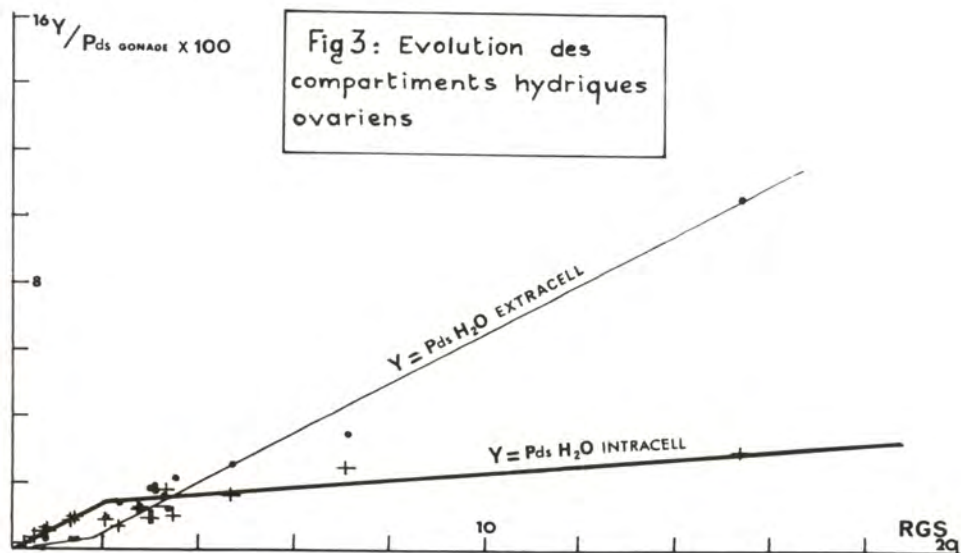
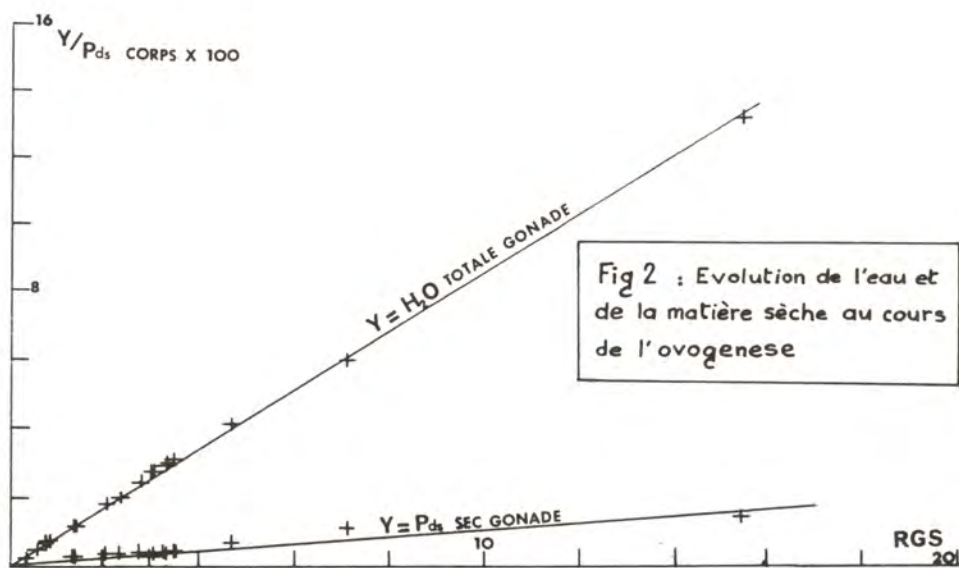


Fig 1 : Evolution des teneurs en eau, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> intracellulaires





## DISCUSSION

Les mécanismes d'évolution de l'eau et des ions au cours de l'ovogenèse pourraient être liés au processus d'accumulation des réserves vitellines.

Le ralentissement de l'accumulation de l'eau, associé aux variations de la teneur en  $K^+$  est concomitant d'une entrée du matériel exogène dans l'ovocyte dès le stade III (dont les premières phases ne sont décelables qu'en étude ultrastructurale).

La teneur en  $Na^+$  diminue dès la fin de la vitellogenèse exogène alors que s'amorce les premiers phénomènes de la maturation ovocytaire au stade V (début de migration de la vésicule germinative et rétraction des microvillosités ovocytaires).

A titre d'hypothèse de travail, il est possible de considérer que l'accumulation d'eau dans l'espace péricellulaire pendant la vitellogenèse constitue une étape préalable et indispensable aux processus de maturation ovocytaire. L'hydratation à la fin de la maturation pourrait correspondre à un déplacement brutal et important du liquide du compartiment péricellulaire vers l'intérieur de l'ovocyte, la teneur globale de l'eau dans la gonade restant constante.

Nous remercions l'Institut Universitaire de Biologie Marine de l'Université de Bordeaux I, Arcachon, pour les facilités de stabulation du matériel biologique.

---

Dick D.A.T. and Lea E.J.A., 1967 - The partition of sodium fluxes in isolated toad oocytes. J. Physiol., 191(2), p. 289-308.

Gallis J.L., 1980 - Recherches sur un épithélium transporteur à fonction réversible : le tissu ionosécréteur de la branchie d'un téléostéen amphihalien Chelon labrosus (Risso 1826). Aspects biochimiques, biophysiques et morphologiques. Modélisation. Thèse d'Etat, Bordeaux, AO 665, 183 p.

Ling G.N. and Ochsenfeld M.M., 1977 - Experimental verification of an expected relation between time of incubation and magnitude of the fast and slow fractions of the sodium efflux from Amphibian eggs. Physiol. Chem. and Physics, 9, p. 427-431.

Nunez-Rodriguez J., 1982 - Etude de la croissance et de la reproduction de la sole Solea solea L. dans le golfe de Gascogne. D.E.A. de Biologie et Physiologie animales, Bordeaux.

Nunez-Rodriguez J., Taverny Ph., Le Menn F., 1983 - Some ultrastructural aspects of the oocyte and surrounding layers during oogenesis of Solea solea L. XIIth Conference of European Comparative Endocrinologists Sheffield, England.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA DIFFERENCIATION SEXUELLE DES GONADES  
CHEZ LA TORTUE LUTH (*DERMOCHELYS CORIACEA*);  
ETUDE EN INCUBATION ARTIFICIELLE ET NATURELLE

Frédérique RIMBLLOT<sup>(1)</sup>, Jacques FRETEY<sup>(1)</sup>, Jean LESCURE<sup>(1)</sup> et Claude PIEAU<sup>(2)</sup>

RESUME

La différenciation sexuelle de la Tortue Luth est sensible à la température d'incubation des oeufs : au-dessous de 29° C, les gonades se différencient en testicules chez tous les individus; au-dessus de 30° C, les gonades présentent, à l'éclosion, plusieurs indices de féminisation et peuvent être considérées comme des ovaires potentiels. La température critique se situe donc entre 29 et 30° C comme chez les autres espèces de tortues marines (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas*) déjà étudiées. Des nouveau-nées furent prélevées à l'émergence de nids naturels en Guyane française. 10 % présentaient un phénotype mâle, 20 % un phénotype femelle potentiel et 70 % un phénotype intermédiaire. L'enregistrement de la température du sable à 60 cm de profondeur, juste à côté d'un nid, montra que pendant la période thermosensible présumée, la température oscilla entre 29 et 30° C. Ces résultats doivent être pris en considération pour maîtriser le phénotype sexuel des nouveau-nées dans les écloséries de tortues marines.

ABSTRACT

Sexual differentiation of the marine leatherback turtle is sensitive to temperature. Incubation of eggs below 29° C results in 100 % males, whereas incubation above 30° C results in 100 % potential females at hatching. Therefore, the threshold temperature lies between 29 and 30° C as has been found for other marine turtles (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas*). Among hatchlings from natural nests in French Guiana, 10 % were males, 20 % were potential females and 70 % had an intermediate phenotype. The sand temperature at 60 cm of depth, near one nest, was recorded and was found to vary between 29 and 30° C during the presumed thermosensitive period. These results will be useful to marine turtle hatcheries which seek to manipulate sex ratios among their neonates.

MOTS-CLES : Tortues marines, différenciation sexuelle, température, écloséries.

KEY WORDS : Marine turtles, sexual differentiation, temperature, hatcheries.

(1) Laboratoire de Zoologie (Reptiles et Amphibiens), Muséum National d'Histoire Naturelle, 25 rue Cuvier, 75005 PARIS.

(2) Laboratoire de Biochimie du Développement, Institut Jacques Monod, C.N.R.S. et Université Paris 7, 2 place Jussieu, 75251 PARIS Cedex 05.



## INTRODUCTION

L'influence de la température sur la différenciation sexuelle des gonades a été démontrée chez de nombreux Reptiles : deux Lézards (Charnier, 1966; Wagner in Bull, 1980), un Crocodile (Ferguson and Joanen, 1982) et une vingtaine d'espèces de Tortues (Pieau, 1972; revue de Bull, 1980). En ce qui concerne les Tortues, d'une façon générale, les oeufs incubés à des températures élevées (30-33° C) donnent naissance à 100 % de femelles, tandis que les oeufs incubés à des températures basses (23-27° C) donnent naissance à 100 % de mâles. Pour chaque espèce, il existe une température intermédiaire (appelée température critique ou température seuil) à laquelle, à partir d'oeufs d'une même ponte, des mâles, des femelles et aussi, quelquefois, des intersexués peuvent être obtenus (Pieau, 1976). La détermination de cette température est particulièrement importante dans le cas des Tortues marines car, dans un but de protection ou d'élevage, leurs oeufs sont mis à incuber artificiellement dans des boîtes en polystyrène placées sur les plages de ponte ou dans des écloséries. La température à l'intérieur des boîtes est souvent inférieure à la température des nids; il peut donc en résulter un surnombre de mâles à l'éclosion (Mrosovsky and Yntema, 1980).

Parmi les sept espèces de Tortues marines, trois ont été étudiées jusqu'à présent et se sont révélées thermosensibles. Il s'agit de : *Caretta caretta* (Yntema and Mrosovsky, 1980), *Chelonia mydas* (Miller and Limpus, 1980; Mrosovsky, 1982; Wood and Wood, 1982; Morreale et al., 1982) et *Lepidochelys olivacea* (Morreale et al., 1982). Nous apportons ici quelques données sur la Tortue Luth (*Dermochelys coriacea*). Cette espèce nidifie en zone tropicale et Pritchard (1982) estime à 115.000 la population mondiale de femelles matures. La Guyane française possède le site de nidification le plus important de l'Atlantique. Au cours d'une même saison (de mars à juillet), plusieurs milliers de femelles viennent déposer leurs oeufs dans le sable des plages, à raison de 80 à 120 oeufs par ponte. Une éclosérie d'oeufs de Tortues marines a été créée en 1981, à l'initiative de l'un de nous, sur une de ces plages, au lieu dit "les Hattes". Une grande partie des oeufs et la totalité des nouveau-nées utilisées pour notre travail ont été prélevés sur ce site; de plus, des oeufs ont été prélevés au Surinam (collaboration avec le Professeur Mrosovsky de l'Université de Toronto). Nous avons examiné les effets de la température sur la différenciation sexuelle des gonades, d'une part, chez des nouveau-nées issues d'oeufs incubés artificiellement au laboratoire, à diverses températures constantes et, d'autre part, chez des nouveau-nées provenant de nids naturels.

## RESULTATS

### 1°) Incubation artificielle

Ce travail a été effectué en collaboration avec le Professeur Mrosovsky. Il a fait l'objet d'un article original qui a été soumis pour publication.

Mentionnons ici que des oeufs de Tortue Luth ont été incubés à huit températures constantes, comprises entre 27 et 32° C. Le phénotype sexuel de 72 nouveau-nées et de 11 embryons proches du terme a été déterminé à partir de l'examen macroscopique de l'appareil génital (avant et après fixation) et de la structure histologique des gonades et des canaux de Müller.

Aux températures inférieures ou égales à 28,75° C, tous les individus présentent un phénotype mâle. Les gonades, relativement grosses, creusées de sillons transversaux, possèdent une médulla dense, composée de nombreux cordons épithéliaux et un épithélium de surface aminci. Les canaux de Müller sont, généralement, en cours de dégénérescence et présentent un diamètre irrégulier.

Aux températures supérieures ou égales à 29,75° C, chez tous les individus, les gonades sont fines et les canaux de Müller sont complets et de diamètre régulier. La médulla gonadique est très réduite par rapport à celle des testicules. Elle est aussi constituée par des cordons épithéliaux, mais ceux-ci sont beaucoup moins nombreux que les cordons testiculaires. De plus, certains cordons se transforment en lacunes (par acquisition d'une lumière et aplatissement de l'épithélium) et l'épithélium germinatif est épaissi, pseudostratifié. Ces caractères témoignent d'un début de différenciation ovarienne. Cependant, les cellules germinales sont relativement peu nombreuses dans l'épithélium germinatif et ne sont pas entrées en prophase méiotique. Il n'y a donc pas encore de véritable cortex ovarien. Aussi avons-nous considéré ces gonades comme des ovaires potentiels, une évolution mâle postnatale restant toutefois possible. Ces résultats sont schématisés sur la figure 1. Ils montrent que chez la Tortue Luth, la température critique pour la différenciation sexuelle gonadique doit se situer entre 29 et 30° C.

## 2°) Incubation naturelle

Pour cette étude des nouveau-nées ont été capturées à l'émergence, sur la plage des Hattes, en 1981 et 1983.

En 1981, 91 individus ont été prélevés à la sortie de 10 nids, à raison de 8 à 10 par nid, pendant les périodes du 14 au 21 juin (6 nids) et du 15 au 24 juillet (4 nids).

En 1983, 178 individus ont été prélevés : 88 à l'émergence de 4 nids (respectivement 20, 20, 8 et 40) entre le 15 et le 24 juin et 90 à l'émergence de 3 nids (30 par nid) entre le 9 et le 17 août. Les animaux ont tous été sacrifiés, disséqués et fixés (dans le liquide de Bouin) sur place, dans les 4 jours qui ont suivi leur capture. Au laboratoire, l'examen macroscopique de l'appareil génital des 91 nouveau-nées sacrifiées en 1981 et des 88 nouveau-nées sacrifiées en juin 1983 a été actuellement réalisé. Dans quelques cas, il a été complété par une étude histologique des gonades et des canaux de Müller.

Les résultats sont comparables dans les deux séries :

a) Près de 10 % des individus présentent un phénotype mâle caractéristique (Fig. 2a). Les gonades ont la même forme et la même structure histologique que les testicules obtenus en incubation artificielle, aux températures inférieures ou égales à 28,75° C; cependant, des lambeaux de l'épithélium germinatif peuvent persister. Les canaux de Müller sont fins mais de diamètre assez régulier, montrant seulement un début de dégénérescence dans les cellules conjonctives qui les entourent.

b) 20 % possèdent un appareil génital semblable à celui des individus qui se sont développés aux températures supérieures ou égales à 29,75° C : les gonades sont minces et les canaux de Müller sont complets, sensiblement plus larges que chez les mâles phénotypiques; on peut considérer ces animaux comme des femelles potentielles (Fig. 2c).

c) Chez la majorité des individus (70 %), les gonades ont une forme et des dimensions intermédiaires aux deux types précédemment décrits et les canaux de Müller sont complets et de diamètre régulier (Fig. 2b). L'étude histologique des gonades révèle une médulla dense, moins développée que celle des testicules mais possédant également de nombreux cordons épithéliaux; certains de ces cordons commencent à se creuser d'une lumière et à former des lacunes; l'épithélium germinatif est plus ou moins épaissi, mais comme chez les femelles potentielles, les cellules germinales y sont relativement peu nombreuses et ne montrent pas d'image de prophase méiotique. Malgré quelques indices de féminisation, ces gonades gar-



dent des potentialités testiculaires et on ne peut préjuger de leur évolution ultérieure.

Si on compare la structure des gonades de *Dermochelys coriacea* à celle qui a été décrite, à l'éclosion, chez d'autres espèces de Tortue (*Emys orbicularis*, Pieau, 1974; *Chelydra serpentina*, Yntema, 1981; *Caretta caretta*, Yntema and Mrosovsky, 1980; *Chelonia mydas*, Miller and Limpus, 1980), il apparaît clairement que chez *Dermochelys coriacea*, la différenciation sexuelle gonadique est moins avancée. Il est donc probable que la période thermosensible soit plus tardive. On peut ainsi estimer que cette période a dû se situer au mois de mai pour les tortues nées en juin et au mois de juin pour les tortues nées en juillet. Un enregistrement de la température du sable a été effectué à 60 cm de profondeur, juste à côté d'un nid, de la fin du mois d'avril au début du mois de juillet 1983. Il montre que pendant les mois de mai et de juin, la température a été stable, oscillant seulement entre 29 et 30° C. Or, d'après nos résultats en incubation artificielle, la température critique se situe précisément entre ces températures. Cette observation permet d'expliquer que dans les nids, un fort pourcentage d'individus présente un phénotype sexuel intermédiaire entre le phénotype mâle et ce que nous avons défini comme phénotype femelle potentiel. Des incubations artificielles au laboratoire, entre 29 et 30° C, seront réalisées pour vérifier cette hypothèse.

#### DISCUSSION

Notre étude de la différenciation sexuelle des gonades en fonction de la température d'incubation des oeufs chez la Tortue Luth apporte des données présentant un intérêt fondamental et appliqué.

Du point de vue fondamental, l'originalité de cette espèce réside dans la structure des gonades à l'éclosion. La différenciation histologique gonadique est en effet nettement moins avancée que chez les autres espèces de tortues : dans les testicules, les cordons épithéliaux médullaires sont relativement minces; les ovaires ne sont pas encore différenciés, quelques caractères (formation de lacunes médullaires, épaissement de l'épithélium germinatif) indiquent cependant le début de la féminisation des gonades. Le caractère le plus frappant est la réduction du nombre de cordons épithéliaux et, par conséquent, du volume de la médulla au fur et à mesure que la température s'élève : très volumineuse au-dessous de 29° C, la médulla est plus ou moins réduite chez la majorité des individus issus d'oeufs incubés entre 29 et 30° C (cas des nids naturels) et toujours très réduite au-dessus de 30° C (en incubation artificielle). Ce phénomène témoigne d'une inhibition de la prolifération des cordons qui est proportionnelle à l'élévation de la température. Il est probable que le développement du cortex ovarien requiert cette action inhibitrice de la température. Nous ignorons tout des mécanismes de cette action. Un des points d'impact possible de la température est la synthèse d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse (Pieau, 1974; Pieau et al., 1982). Des études sur la synthèse d'hormones stéroïdes (dosages radioimmunologiques, voies de synthèse) et sur les synthèses protéiques (électrophorèse bidimensionnelle) dans les gonades embryonnaires ont été entreprises chez la Tortue aquatique indigène, *Emys orbicularis*. A priori, la Tortue Luth fournit un modèle beaucoup plus favorable pour ces études, car les embryons et les nouveau-nés sont beaucoup plus gros (le poids est environ 8 fois plus élevé à l'éclosion) et permettent des investigations sur un seul individu.

Du point de vue appliqué, l'influence de la température sur la différenciation sexuelle des gonades des tortues marines doit être prise en considération dans les incubations artificielles en écloserie visant à produire des nouveau-nés, soit pour les élever, soit pour renforcer les populations naturelles. Pour toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, la température critique est sensiblement la

même. Elle se situe entre 29 et 30° C. Qu'il s'agisse de protection ou d'élevage, il est préférable de produire plus de femelles que de mâles, donc d'incuber les oeufs à des températures égales ou légèrement supérieures à 30° C. Or, la température à l'intérieur des boîtes en polystyrène utilisées pour l'incubation artificielle des oeufs était, jusqu'à présent, généralement inférieure à la température critique et aboutissait probablement à une forte déviation du *sex ratio* en faveur des mâles (Mrosovsky, 1982). Il est donc nécessaire d'aménager les écloseries en vue d'obtenir une régulation de la température au voisinage de 30° C. Un tel aménagement est en cours à l'écloserie des Hattes, en Guyane française; il est fondé sur l'utilisation de capteurs solaires. En plus de la température, toutes les autres conditions (qualité du substrat, humidité, aération...) sont aussi examinées afin d'améliorer l'incubation artificielle des oeufs et d'obtenir, au moindre coût, le maximum d'éclosion. Ce travail porte sur les trois espèces de Tortues marines qui pondent sur les plages guyanaises : *Dermochelys coriacea*, *Lepidochelys olivacea* et *Chelonia mydas*. Il est complété par une étude éco-éthologique de la reproduction et devrait permettre une protection plus efficace de ces espèces tout en établissant, au niveau de la phase écloserie, les bases scientifiques nécessaires à la mise en oeuvre éventuelle d'élevages; cela, en tenant compte de la réglementation internationale concernant les espèces menacées (Convention de Washington sur le commerce international des espèces menacées d'extinction).

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme S. Renous qui nous a aidés pour l'incubation artificielle des oeufs au laboratoire et MM. J.M. Bretnacher et D. Williams pour leur collaboration technique, en particulier pour leur contribution à l'aménagement de l'écloserie et à l'amélioration des conditions d'incubation des oeufs en Guyane française. Le financement de ce travail a été assuré par le CNEXO et le C.N.R.S. dans le cadre de l'ATP "Bases biologiques de l'aquaculture", contrat n° 82/2780.

- 
- Bull J.J., 1980 - Sex determination in reptiles. Quart. Rev. Biol., 55, p. 3-21.
- Charnier M., 1966 - Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). C.R. Soc. Biol. Paris, 160, p. 620-622.
- Ferguson M.W.J. and Joanen T., 1982 - Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. Nature, 296, p. 850-853.
- Miller J.D. and Limpus C.J., 1980 - Incubation period and sexual differentiation in the green turtle, *Chelonia mydas* L. Proc. Melbourne Herpetological Symposium. C.B. Banks and A.A. Martin eds., p. 66-73.
- Morreale S.J., Ruiz G.J., Spotila J.R. and Standora E.A., 1982 - Temperature-dependent sex determination : current practices threaten conservation of sea-turtles. Science, 216, p. 1245-1247.
- Mrosovsky N., 1982 - Sex ratio bias in hatchling sea-turtles from artificially incubated eggs. Biol. Conserv., 23, p. 309-314.
- Mrosovsky N. and Yntema C.L., 1980 - Temperature dependence of sexual differentiation in sea-turtles : implications for conservation practices. Biol. Conserv., 18, p. 271-280.
- Pieau C., 1972 - Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. C.R. Acad. Sci. Paris, 274, série D, p. 719-722.



- Pieau C., 1974 - Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien); effets des hormones sexuelles. Ann. Embryol. Morphog., 7, p. 365-394.
- Pieau C., 1976 - Données récentes sur la différenciation sexuelle en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). Bull. Soc. Zool. France, 101, suppl. n° 4, p. 46-53.
- Pieau C., Mignot Th.-M., Dorizzi M. and Guichard A., 1982 - Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L. : a preliminary study in embryos, hatchlings, and young as a function of the incubation temperature of eggs. Gen. Compar. Endocrinol., 47, p. 392-398.
- Pritchard P.C.H., 1982 - Nesting of the leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* in Pacific Mexico, with a new estimate of the world population status. Copeia, 1982, p. 741-747.
- Wood F.E. and Wood J.R., 1982 - Sex ratios in captive-reared green turtles, *Chelonia mydas*. Copeia, 1982, p. 482-485.
- Yntema C.L., 1981 - Characteristics of gonads and oviducts in hatchlings and young of *Chelydra serpentina* resulting from three incubation temperatures. J. Morph., 167, p. 297-304.
- Yntema C.L. and Mrosovsky N., 1980 - Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. Herpetologica, 36, p. 33-36.

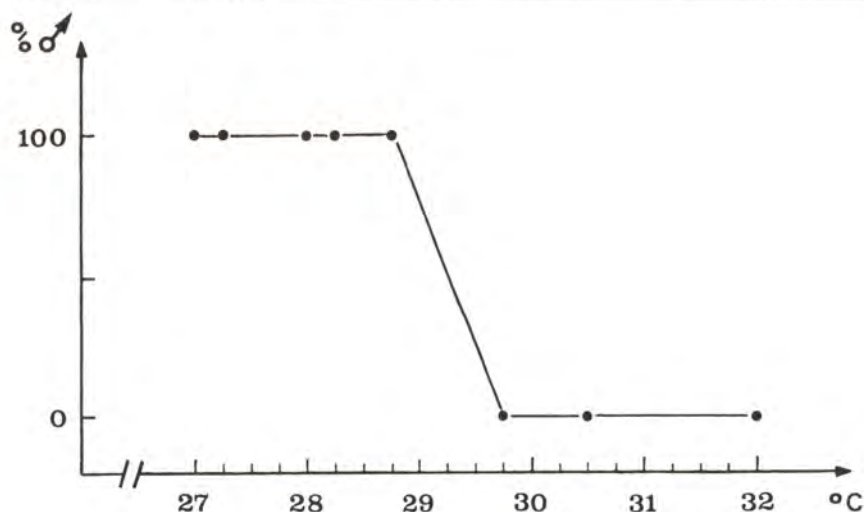


Figure 1 - Pourcentage de mâles en fonction de la température d'incubation des oeufs chez la Tortue Luth, *Dermochelys coriacea*.

Figure 2 - Appareil génital de nouveau-nées de Tortue Luth prélevées à l'émergence de nids naturels sur la plage des Hattes, en Guyane française.

- Phénotype mâle. Noter la taille des testicules et la présence de sillons transversaux à leur surface. Les canaux de Müller sont minces.
- Phénotype intermédiaire. Les gonades sont sensiblement moins volumineuses et les canaux de Müller sont un peu plus larges que chez les mâles.
- Phénotype femelle potentiel. Les gonades sont fines et légèrement plus longues que les testicules. Les canaux de Müller sont plus larges que chez les mâles.

(G : gonade; C.M. : canal de Müller; MES : mésonéphros; MET : métanéphros).

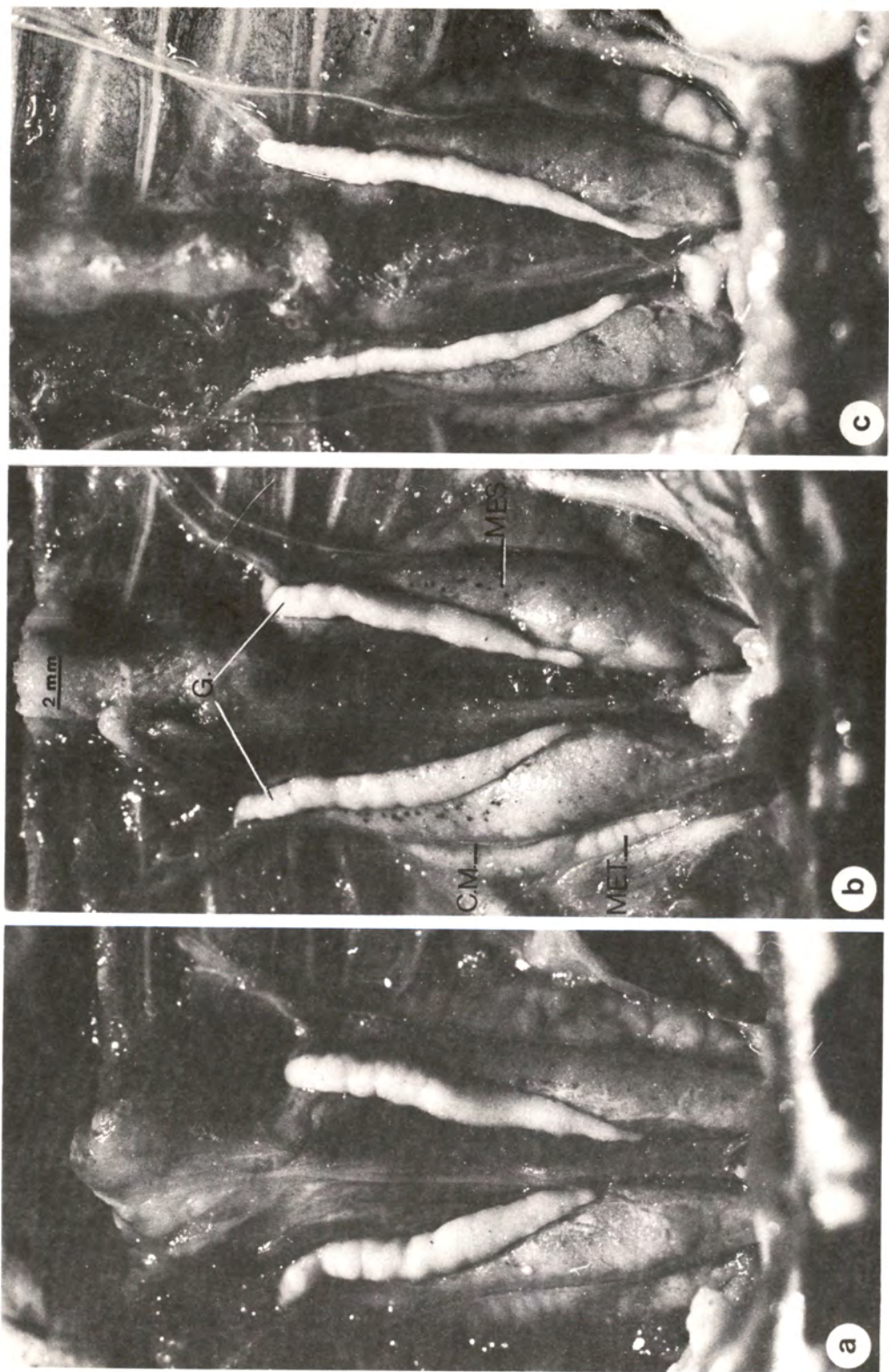


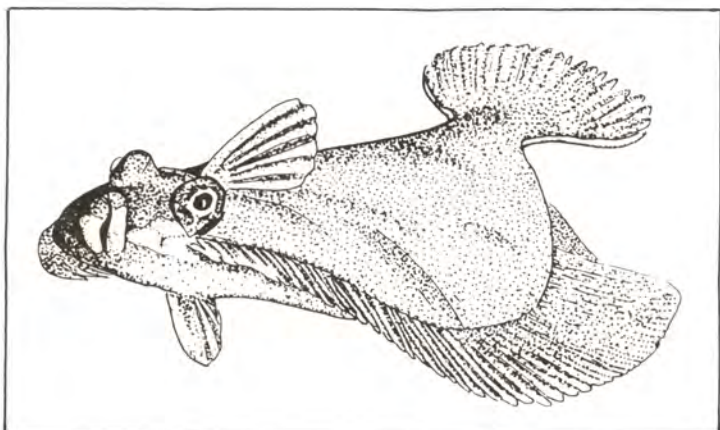
Figure 2



STRUCTURE GENETIQUE DES FLETS

(*Platichthys flesus*, Téléostéen, *Pleuronectidae*)

P. BERREBI<sup>1</sup>, J.F. AGNESE<sup>1</sup> et R. VIANET<sup>2</sup>



Résumé :

Six populations de flets des côtes méditerranéennes et atlantiques françaises ont été étudiées par électrophorèses enzymatiques portant sur 21 locus. Ces résultats confirment la division de l'espèce en trois sous-unités. Des distinctions à l'intérieur de ces grands groupes ont également été dégagées.

Summary :

Six populations of flounder from the Mediterranean and Atlantic coasts were analysed by enzymatic electrophoresis at 21 loci. The results confirm the separation of the species in three genetic groups. Differences between these genetic groups have also been observed.

---

1 - Institut des Sciences de l'évolution (LA 327), laboratoire de Génétique, et,

2 - Laboratoire d'Ichthyologie, U.S.T.L., Place E.-Bataillon, 34060 Montpellier-Cedex.

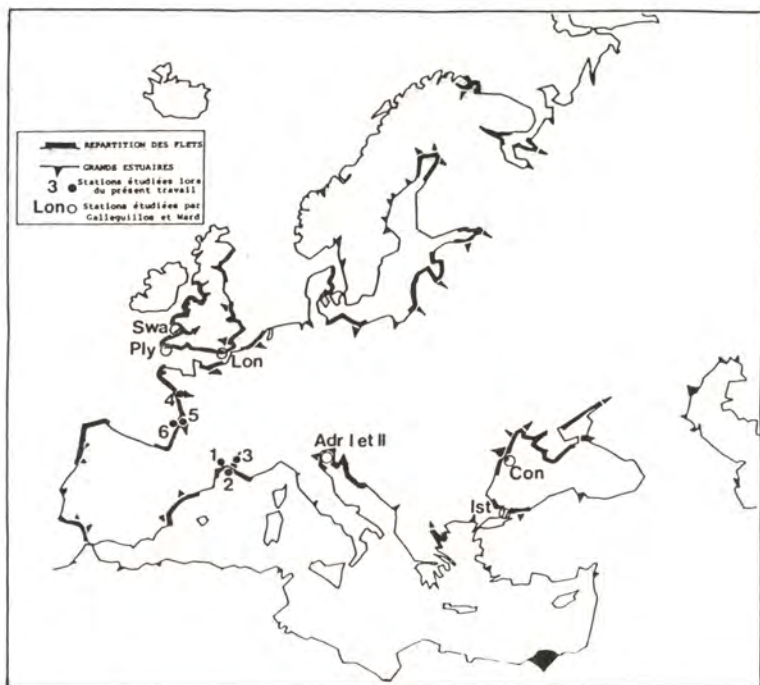


Figure 1 : Répartition des fleets le long des côtes et localisation des stations prospectées.

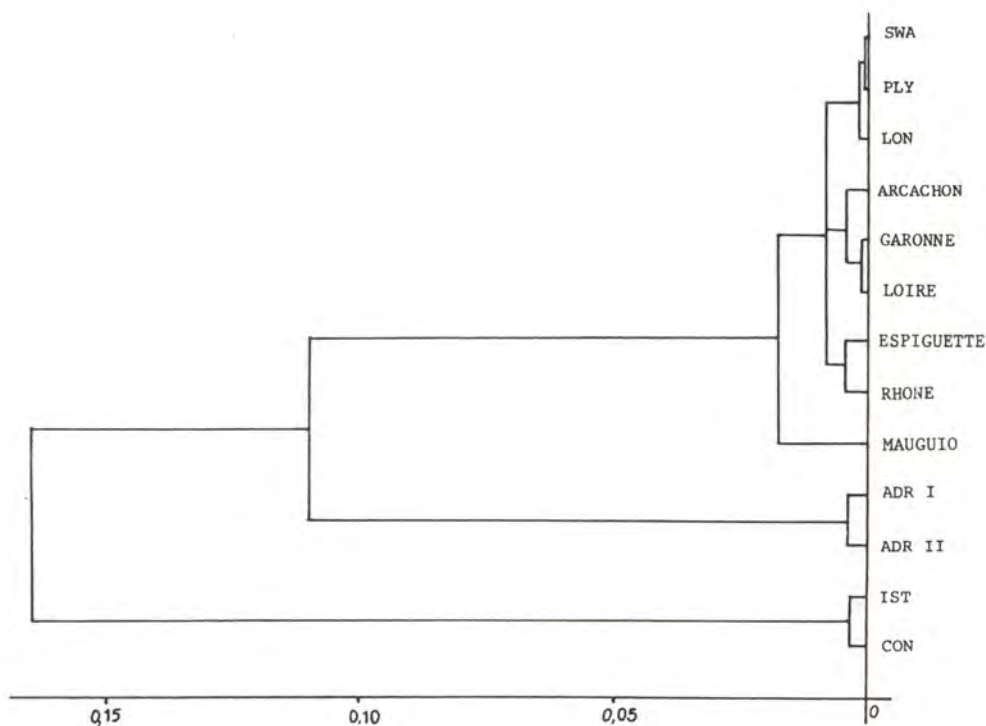


Figure 2 : Dendrogramme basé sur la comparaison du polymorphisme de 13 Locus des populations étudiées lors du présent travail et par GALLEGUILLOS et WARD (1982). (D'après AGNESE, 1983).



## INTRODUCTION

Le flet est un poisson plat de la famille des *Pleuronectidae*.

L'Institut des Sciences de l'Evolution, en collaboration avec le laboratoire d'Ichthyologie, a entrepris l'étude fine de la structure des populations de cette espèce, au moyen de la génétique des populations.

Où réside l'intérêt que l'on porte à cette espèce ? Surtout dans la complexité de sa biologie qui en fait un bon support pour ce type de recherche fondamentale. Mais ce thème de recherche n'est pas dépourvu d'arrière pensées appliquées. En effet, ce poisson robuste (pouvant supporter de fortes variations de salinités et l'émersion prolongée), à fécondation artificielle facile (obtenue sans difficulté jusqu'au stade de la métamorphose), à croissance assez rapide et à chair fine, a de fortes potentialités aquacoles.

Quelle est sa biologie ?

- La répartition géographique est vaste, de l'Océan Glacial Arctique à Gibraltar, en Méditerranée occidentale, Adriatique et Mer Noire. La figure 1 représente les zones où il a été signalé. On peut remarquer que cette répartition est discontinue et coïncide avec les estuaires des grands fleuves. Les côtes dépourvues de grands estuaires n'hébergent pas de flets. La suite du texte en donne une explication.

- La reproduction se fait en mer, sans doute dans la zone côtière, à la fin de l'hiver. Dans la région de Montpellier, les alevins pénètrent en lagune côtière en juin. Ces milieux constituent des "nurseries" où les jeunes poissons trouvent facilement une nourriture abondante. Simultanément les adultes semblent remonter les cours d'eau sur de grandes distances, mais ces migrations sont mal connues (VIANET, 1981).

Ces quelques points particuliers de la biologie du flet montrent que l'espèce est probablement morcelée en sous-unités dont le statut est à définir :

- fractionnement au niveau mondial entre mers nordiques (Mer Baltique, Mer Blanche et Mer de Barents), Atlantique (dont la Mer du Nord et la Manche), Méditerranée occidentale, Adriatique ou Mer Noire ;

- fractionnement régional entre les différentes zones d'influence des grands fleuves ;

- fractionnement local où par exemple, dans la zone dépendant du Rhône, on ignore les relations entre les habitants de chaque étang ou estuaire, des adultes vivant en mer et en cours d'eau.

Ces différents fractionnements possibles peuvent correspondre à des différences génétiques plus ou moins marquées et donc plus ou moins aisées à mettre en évidence. Le but de cet exposé se limite au premier type de morcellement, à l'échelle mondiale.

### M E T H O D E S

Six populations atteignant un total de 167 flets ont été testées. La figure 1 montre leur emplacement : trois en Méditerranée, trois en Atlantique français.

En Méditerranée :

- "Mauguio" est une lagune côtière au sud de Montpellier. La population prélevée est composée de jeunes de moins de 2 ans, vivant en "nursérie" ;

- "Espiguettes" est une zone marine côtière à proximité de l'estuaire du Rhône. Y sont pêchés des adultes venus pondre en hiver ;

- "Rhône" est une station située à quelques kilomètres en amont de l'embouchure. Ce sont des poissons adultes capturés en dehors des périodes de pêche.

Sur la côte atlantique française :

- "Garonne" est une population d'estuaire saumâtre (nursérie) ;

- "Arcachon" est une station marine côtière ;

- "Loire" est une station d'eau douce, à quelques kilomètres de l'embouchure.

Récoltés auprès des pêcheurs professionnels, ces flets, fraîchement capturés, sont immédiatement disséqués (ou congelés à  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Les organes désirés sont retirés (muscle, foie, rein, rate, coeur, globes oculaires...). Ces tissus sont broyés et centrifugés en présence de solution tampon, afin d'en faire des extraits contenant des protéines enzymatiques solubles.



Les électrophorèses sur gel d'amidon permettent de séparer les différentes molécules. Les enzymes sont ensuite colorées par des révélateurs spécifiques. Leur position sur le gel est relevée, et la fréquence de chaque allèle est la base de toute comparaison génétique.

#### R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

La totalité des résultats est résumée dans le tableau I où ne sont représentés que les 11 locus polymorphes dont la lecture est sûre. En effet, 20 catégories d'enzymes ont été explorées, correspondant à 35 locus, mais 21 d'entre eux ont été quantitativement étudiés et 11 se sont révélés polymorphes.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus sur la même espèce par GALLEGUILLOS et WARD (1982), il a été possible, à partir de l'indice de distance génétique de NEI (1971), de tracer un dendrogramme global, basé sur 12 locus communs aux deux travaux (figure 2).

Tout en prenant une telle représentation avec précaution, il est clair que trois grands groupes se distinguent, séparés par des distances comprises entre 0,12 et 0,16 unités :

- un groupe comprenant les 9 populations récoltées le plus à l'Ouest (Méditerranée et Atlantique français, côtes anglaises). Ce grand ensemble correspond à ce que les systématiciens ont appelé la sous-espèce *flesus* ;
- les populations d'Adriatique correspondent à la sous-espèce *italicus* ;
- les populations de Mer Noire correspondent à la sous-espèce *luscus* (NORMAN, 1934).

Le rapprochement de deux sous-espèces (*flesus* et *italicus*) est un artifice mathématique compte tenu de l'imprécision des calculs. Il faut considérer que ces trois groupes présentent entre eux une divergence génétique équivalente.

Le but de ces recherches préliminaires était d'intégrer les populations des côtes françaises, qui vont être plus finement étudiées, dans un contexte mondial. Les flets français appartiennent bien au groupe qui s'étend au moins jusqu'en Grande-Bretagne. A l'intérieur de ce groupe, certaines divergences ont déjà été décelées et permettent d'être optimiste pour la suite des recherches. Sans en tirer de conclusions définitives, les quelques points suivant méritent d'être signalés dans l'état actuel des recherches :

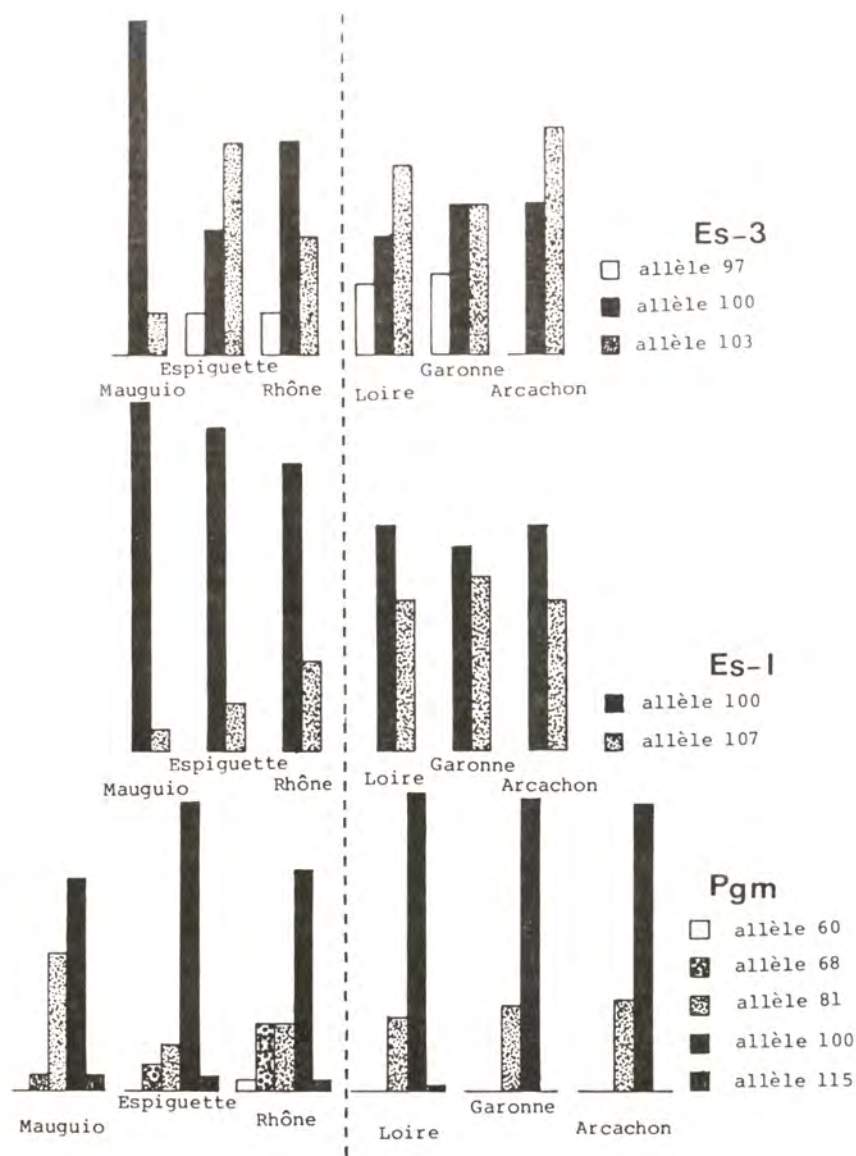


Figure 3 : Histogrammes de fréquences alléliques de trois locus pour les six stations prospectées.



#### \* distinction entre Méditerranée et Atlantique français

- en groupant les stations de Méditerranée et d'Atlantique français et en les opposant, il apparaît que 4 des 11 locus polymorphes sont différents de façon hautement significative après test  $K\chi^2-2$ . Par contre, à l'intérieur de ces deux groupes, le test est rarement significatif ( $P_{gm}$  seulement), mais les effectifs sont trop faibles pour être exploités ;

- en observant la figure 3 qui compare les histogrammes des fréquences alléliques en fonction des stations, on remarque qu'en Atlantique, les proportions des différents allèles restent comparables dans les trois stations pour  $P_{gm}$  et  $Es-3$ , ce n'est pas le cas de  $Es-1$  mais l'ordre d'importance des trois allèles reste cependant le même. En Méditerranée par contre, les proportions des différents allèles varient beaucoup pour  $P_{gm}$  et  $Es-3$  ; pour  $Es-1$ , on assiste à des inversions de prépondérance, l'allèle  $Es-3^{100}$  n'étant plus dominant en mer. Sans essayer d'expliquer ce phénomène, il est clair que les fréquences alléliques sont beaucoup plus stables en Atlantique qu'en Méditerranée, bien que les stations comparées sont de même type : la nurserie, le cours d'eau et la zone marine côtière ;

- enfin, dans le tableau II, les deux indices utilisés montrent que l'Atlantique renferme des flets nettement plus polymorphes que la Méditerranée.

#### \* variation à l'intérieur des grandes sous-unités

Si les flets de l'Atlantique semblent peu différents quel que soit leur lieu de capture, nous avons vu qu'en Méditerranée il en est tout autrement. En particulier, les étangs semblent se distinguer des autres stations :

- aux locus  $Es-1$  et  $Es-3$ , l'allèle 100 tend à être exclusif (figure 3) :

- le dendrogramme (figure 1) montre que la station "Mauguio" se distingue globalement (pour 13 locus) de toutes les autres.

Ces remarques nous permettent de penser que, au moins en Méditerranée, les étangs constituent des milieux très particuliers. Le programme sur le flet prévoit leur étude approfondie.

LOCUS	ALLELES	MAUGUIO	ESPI- -GUETTE	RHONE	LOIRE	GARONNE	ARCACHON
Aat-2	57	-	0,01	0,00	0,12	0,14	0,08
	78	-	0,03	0,06	0,05	0,09	0,08
	100	-	0,96	0,94	0,83	0,77	0,84
		(0)	(76)	(34)	(60)	(36)	(12)
Gpd-F	100	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	0,78
	130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,22
		(48)	(44)	(24)	(20)	(14)	(16)
Pgm	60	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
	68	0,04	0,07	0,18	0,00	0,00	0,00
	81	0,36	0,12	0,18	0,19	0,22	0,24
	100	0,56	0,77	0,58	0,79	0,78	0,76
	115	0,04	0,04	0,04	0,02	0,00	0,00
	(50)	(100)	(36)	(60)	(40)	(26)	
Pgi-1	70	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
	100	1,00	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00
		(52)	(100)	(36)	(60)	(40)	(28)
Es-3	97	0,00	0,11	0,11	0,18	0,21	0,00
	100	0,89	0,33	0,57	0,32	0,39	0,40
	103	0,11	0,56	0,32	0,50	0,40	0,60
		((56)	(68)	(36)	(60)	(38)	(10)
Es-1	100	0,94	0,87	0,76	0,60	0,54	0,60
	107	0,06	0,13	0,24	0,40	0,46	0,40
		(50)	(78)	(34)	(50)	(36)	(10)
Idh-M	71	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
	100	0,98	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00
		(32)	(100)	(34)	(46)	(34)	(4)
Idh-F	65	0,04	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00
	100	0,96	0,98	1,00	0,98	1,00	1,00
		(48)	(82)	(36)	(58)	(36)	(12)
Mdh-2	100	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00
	140	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
		(52)	(100)	(36)	(58)	(38)	(16)
Adh	90	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
	100	0,98	0,98	0,97	0,87	0,92	1,00
	105	0,00	0,02	0,00	0,13	0,08	0,00
		(52)	(100)	(34)	(60)	(38)	(12)
Sdh-2	70	0,94	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00
	100	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
		(54)	(96)	(34)	(54)	(22)	(6)

Tableau I : Fréquences alléliques observées dans les six populations de flets étudiées. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de gènes considérés



STATIONS	H (%)	H' (%)
MAUGUIO	5,9	8,3
ESPIQUETTE	8,4	8,6
RHÔNE	6,6	6,0
total Méditerranée	-	7,6
LOIRE	10,7	10,7
ARCACHON	10,2	12,5
GARONNE	9,3	11,2
total Atlantique	-	11,2

Tableau II : Taux d'hétérozygotie calculé à partir des fréquences alléliques (H) et taux de locus hétérozygotes par individu (H').

#### C O N C L U S I O N

Ce travail a permis de préciser le cadre dans lequel des études plus détaillées peuvent être envisagées :

- les flets de France appartiennent à la sous-espèce la plus abondante : *Platichthys flesus flesus* dont la répartition s'étend au moins de Marseille à Gibraltar et de Gibraltar à la Manche et aux côtes anglaises ;
- des différences nettes existent à l'intérieur de cette sous-espèce, et en particulier entre les côtes méditerranéennes et atlantiques françaises ;
- des différences existent également entre les flets habitant les différents biotopes des côtes méditerranéennes. Ce type de divergence est beaucoup plus réduit en Atlantique.

Ces recherches fondamentales sont nécessaires pour distinguer les clivages à l'intérieur d'une même espèce et dans une même région. Elles trouveront un intérêt pratique quand cette espèce sera mise en élevage c'est-à-dire quand il sera nécessaire de connaître la nature génétique des géniteurs.

---

AGNESE J.F., 1983 - Variabilité génétique du poisson *Platichthys flesus* (L.) (Pleuronectidae). D.E.A. Université Montpellier II : 36 p.

GALLEGUILLOS R.A. et WARD R.D., 1982 - Genetic and morphological divergence between populations of the flat-fish *Platichthys flesus* (L.). Biol. J. Linn. Soc., 17 : 395-408.

NEI M., 1971 - Genetic distance between populations. Am. Nat., 106 : 283-292.

NORMAN J.R., 1934 - A systematic monograph of the flat fishes (*Heterosomata*) British Mus., Hist. Nat., 1 : 459 p.

VIANET R., 1981 -Le flet du Golfe du Lion : *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758). Etude systématique et bio-écologique préliminaire. D.E.A. Université Montpellier II : 37 p.

STATIONS	H (%)	H' (%)
MAUGUIO	5,9	8,3
ESPIQUETTE	8,4	8,6
RHÔNE	6,6	6,0
total Méditerranée	-	7,6
LOIRE	10,7	10,7
ARCACHON	10,2	12,5
GARONNE	9,3	11,2
total Atlantique	-	11,2

Tableau II : Taux d'hétérozygotie calculé à partir des fréquences alléliques (H) et taux de locus hétérozygotes par individu (H').

#### C O N C L U S I O N

Ce travail a permis de préciser le cadre dans lequel des études plus détaillées peuvent être envisagées :

- les flets de France appartiennent à la sous-espèce la plus abondante : *Platichthys flesus flesus* dont la répartition s'étend au moins de Marseille à Gibraltar et de Gibraltar à la Manche et aux côtes anglaises ;
- des différences nettes existent à l'intérieur de cette sous-espèce, et en particulier entre les côtes méditerranéennes et atlantiques françaises ;
- des différences existent également entre les flets habitant les différents biotopes des côtes méditerranéennes. Ce type de divergence est beaucoup plus réduit en Atlantique.

Ces recherches fondamentales sont nécessaires pour distinguer les clivages à l'intérieur d'une même espèce et dans une même région. Elles trouveront un intérêt pratique quand cette espèce sera mise en élevage c'est-à-dire quand il sera nécessaire de connaître la nature génétique des géniteurs.

---

AGNESE J.F., 1983 - Variabilité génétique du poisson *Platichthys flesus* (L.) (Pleuronectidae). D.E.A. Université Montpellier II : 36 p.

GALLEGUILLOS R.A. et WARD R.D., 1982 - Genetic and morphological divergence between populations of the flat-fish *Platichthys flesus* (L.). Biol. J. Linn. Soc., 17 : 395-408.

NEI M., 1971 - Genetic distance between populations. Am. Nat., 106 : 283-292.

NORMAN J.R., 1934 - A systematic monograph of the flat fishes (*Heterosomata*) British Mus., Hist. Nat., 1 : 459 p.

VIANET R., 1981 - Le flet du Golfe du Lion : *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758). Etude systématique et bio-écologique préliminaire. D.E.A. Université Montpellier II : 37 p.



- ETUDE DU POLYMORPHISME BIOCHIMIQUE DE DEUX POPULATIONS NATURELLES (MAROC ATLANTIQUE ET ROUSSILLON) DE CIVELLES ET ANGUILLETES D'ANGUILLA ANGUILLA L. 1758 ET DE DEUX ECHANTILLONS D'ELEVAGE.

A. YAHYAOUI (1), J. BRUSLÉ (2) et N. PASTEUR (3)

RESUME : 15 systèmes enzymatiques ont été analysés afin de juger du polymorphisme de 24 gènes. Aucune différence génétique entre civelles atlantiques et méditerranéennes n'a été décelée par électrophorèse, une telle identité plaidant en faveur d'une origine sargassienne commune.

Les gènes enzymatiques paraissent également semblables entre différents lots d'élevage, les variations de taux de croissance étant plutôt imputables à des troubles comportementaux (surpopulation) qu'à des différences génétiques.

ABSTRACT : 15 types of allozymes were electrophoretically studied and variability of 24 genes analyzed and compared between atlantic and mediterranean elvers. No genetic difference was observed. The genetic homogeneity agrees with a similar origin, the Sargasso Sea.

Identity of enzymatic genes as found between different lots in culture and variation in growth was rather due to comportemental patternlike overcrowding than to genetic differences.

MOTS-CLES : *Anguilla anguilla*, Maroc, France, civelles, polymorphisme enzymatique, élevage  
KEY WORDS : *Anguilla anguilla*, Marocco, France, elvers, biochemical polymorphism, eel culture.

(1) Laboratoire de Biologie animale - Faculté des Sciences de Rabat

(2) Laboratoire de Biologie marine, Université de Perpignan

(3) Institut des Sciences de l'Evolution, USTL, Montpellier.

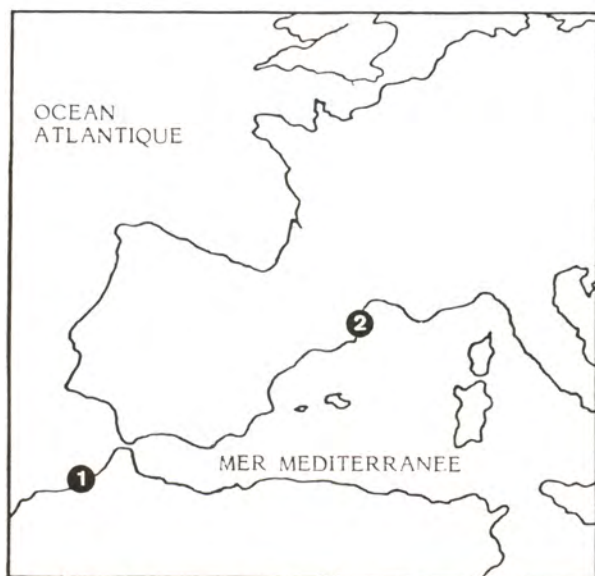


Planche I Stations de pêche :

- ① Estuaire du Sébou
- ② Grau de Port-la-Nouvelle

Zymogramme :

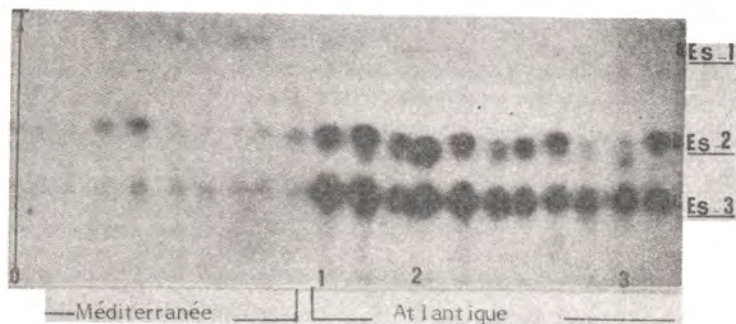


Planche 2



## INTRODUCTION

Cette étude aborde le problème de la différenciation génétique des populations naturelles et d'élevage de civelles d'Anguilles (*Anguilla anguilla* L. 1758), par des techniques d'électrophorèse enzymatique qui permettent d'analyser une partie du génome en fonction des variations de mobilité électrophorétique des protéines à fonction enzymatique (polymorphisme enzymatique).

L'étude comparée du recrutement en civelles des littoraux atlantiques et méditerranéens a jusqu'à présent été essentiellement abordée sous un angle morphologique, pondéral et méristique (nombre moyen de vertèbres) (Gandolfi-Hornyold, 1927 a et b, 1928; Heldt et heldt, 1929, Lecomte-Finiger, 1978 et 1983; Yahyaoui, 1983). Une approche moderne, visant à préciser la structure génétique des populations (Rodino et Comparini, 1978), a été appliquée aux larves leptocéphales (Comparini et Rodino, 1980 ; Comparini et Schoth (1982) et aux civelles d'*Anguilla anguilla* (Comparini et al., 1975) et d'*Anguilla rostrata* (Williams et al., 1973 ; Koehn et Williams, 1978).

Il convenait toutefois de reprendre ces recherches sur un échantillon de gènes plus vaste que celui des auteurs italiens limités aux systèmes enzymatiques (Mdh, Ldh, Pgi) utilisés pour différencier *A. anguilla* d'*A. rostrata*. Le polymorphisme enzymatique (15 systèmes enzymatiques) a d'abord été analysé sur **deux populations naturelles** pêchées à une même date au cours de leur migration anadrome dans deux milieux, l'un **atlantique** (Oued Sebou), l'autre **méditerranéen** (Port-La-Nouvelle), situés de part et d'autre du détroit de Gibraltar (Planche 1). Cette investigation visait à préciser l'**origine** de ces civelles.

Par ailleurs, les **élevages** de civelles montrent généralement (cf. revue sur l'anguilliculture : Vassal et Bruslé, 1983) de grandes disharmonies de croissance, l'arrêt ou le retard de développement pouvant concerner 2/3 de individus (Querellou, 1975), de sorte qu'après tri sélectif 30 % seulement d'entre eux peuvent être conservés en élevage (Kuhlmann et Koops, 1981). La recherche d'une explication à cette hétérogénéité de croissance et à ces importantes différences de développement individuel, particulièrement marquées chez l'anguille et responsables d'un important gaspillage du potentiel halieutique ainsi que d'un accroissement sensible des coûts d'exploitation des installations d'anguilliculture (Foulquier et Descamps, 1979), est demeurée sans solution jusqu'à présent. S'agit-il d'une nourriture artificielle inadaptée, d'une trop forte compétition intraspécifique (stress social : Peters et al, 1980 ; Peters, 1982

et 1983) ou de caractéristiques génétiques associées au retard de développement des anguilletes dénommées "boudeuses" ? Leur analyse a été entreprise par comparaison de divers lots (de tête, moyen et queue) issus de recrutement précoces (novembre) et plus tardif (février).

## MATERIEL ET METHODES

I - L'étude des populations naturelles a porté sur :

- un échantillon atlantique : 84 civelles transparentes capturées le 19/11/1982 dans l'Oued Sebou (LT = 6,93 cm  $\pm$  0,38 et Pf = 0,2795 gr  $\pm$  0,05116)

- + un échantillon méditerranéen de 72 civelles transparentes pêchées dans le grau de Port La Nouvelle le 16/11/1982 (LT = 6,40 mm  $\pm$  0,36 ; Pf = 0,3896 gr  $\pm$  0,0679)

II - Les anguilletes d'élevage correspondent à deux séries :

- "élevage I" de 58 anguilletes issues de 200 civelles capturées à Port La Nouvelle le 2/2/1982 puis triées par tamisage après 80 jours d'élevage et réparties en 3 lots (lot de tête : 16,5 %, lot moyen : 44,5 %, lot de queue : 27,5%) qui ont été maintenus chacun séparément en élevage pendant 140 jours.

- "élevage II" de 62 anguilletes à partir de 150 civelles pêchées à Port La Nouvelle le 16/12/1982 et maintenues en élevage, après tri et répartition en 3 lots, pendant 108 jours.

- L'analyse électrophorétique a alors porté sur les lots obtenus par ségrégation rapide des anguilletes en 3 catégories dans chaque élevage : Lots I1 et I2 correspondent aux plus petits individus ayant manifesté, tant dans les lots de queue que dans les lots moyens, la plus faible croissance, lots I2 et I12 regroupant les anguilles intermédiaires et lots I3 et I13 concernant les plus grands individus, ceux des lots de tête et moyen ayant présenté la croissance la plus rapide .

III - On prépare les homogénats par broyage soit des civelles in toto (échantillons Atlantiques et Méditerranée) soit de divers organes isolés (muscle, foie, coeur, rein) d'anguilletes (élevage I, élevage II). On procède ensuite à une centrifugation différentielle (20 minutes à 15000 tours/minute = 20 000g).

Les électrophorèses se pratiquent sur **gel d'amidon**. On trouvera dans YAHYAOUÏ (1983) les renseignements techniques relatifs aux solutions de broyage, à la préparation des gels, à l'électrophorèse et à la révélation enzymatique par coloration.



## RESULTATS

L'analyse générale a porté sur 26 catégories d'enzymes ou autres protéines ; 10 d'entre elles ont montré soit une activité trop diffuse pour permettre une interprétation génétique, soit une activité nulle. Ce sont : l'adénylatekinase (AK), la leucine-amino-peptidase (Lap), la sorbitol-déshydrogénase (Sdh), la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal), les estérases dégradant le 4-méthyl-umbelliféryl-acétate (Est-4MU), la phosphatase alcaline (Akp), la pyruvate-kinase (Pk), l'hexokinase (Hk), la créatine-kinase (Ck) et l'amylase (Amy). 16 catégories d'enzymes donnent au contraire des zymogrammes qui peuvent être génétiquement interprétés ; leur liste, celle des locus identifiés et des tissus donnant la meilleure résolution électrophorétique, sont réunis dans le tableau I. L' $\alpha$ -glycérophosphate deshydrogénase ( $\alpha$ -Gpd) n'ayant pas été analysée dans la totalité des échantillons pour des raisons techniques (arrêt de la production du substrat par SIGMA), un total de 15 systèmes enzymatiques ont été étudiés et ont permis de juger du polymorphisme de 24 gènes (Yahyaoui, 1983).

### 1 - Comparaison des civelles de Méditerranée et de l'Atlantique

Les civelles des trois échantillons de Méditerranée (population sauvage et les deux élevages) ont été comparées (Tableau II). Aucune différence statistiquement significative n'ayant été observée, il est donc possible de regrouper l'ensemble de ces trois échantillons et de les comparer à ceux provenant de l'Atlantique.

Ainsi, parmi les 22 gènes étudiés dans les deux types d'échantillons, 10 se sont révélés homozygotes pour le même allèle chez tous les individus (locus Acp, Es-1, Glo, Ldh-1, Mdh-1, Me-1, Pgm, Pt-1, Pt-2 et Pt3), et 3 (locus Aat-3, G-6-PD et Idh-1) ont montré un ou parfois deux allèles rares, c'est-à-dire présents chez un seul des individus étudiés. Les fréquences alléliques observées aux 9 autres locus sont présentées Tableau II. On constate qu'à l'exception du gène Es-2, les fréquences alléliques des autres locus sont très comparables (il n'existe pas de différence statistiquement significative.)

Le gène Es-2 mérite un examen particulier. En effet, l'allèle ES-2<sup>95</sup> est absent en Méditerranée et atteint une fréquence de 0,07 en Atlantique. Cette différence est légèrement significative ( $X^2 = 4,966$  pour 1 ddl,  $P < 0,05$ ). Toutefois, il faut noter que deux problèmes se posent. Le premier concerne l'activité générale des estérases qui, chez les civelles de Méditerranée comme on peut le voir planche II, est beaucoup plus faible qu'en Atlantique, d'où les difficultés de "lire" les zymogrammes. Le second concerne les différences qui apparaissent lorsque l'on change le système de tampon d'électrophorèse pour étudier ces estérases. Ainsi, lors d'une manifestation récente (décembre 1983) avec Mme LECOMTE, nous avons comparé les résultats d'électrophorèse obtenus sur des foies (organes où le locus Es-2 est très actif) chez des anguil-

jettes de Méditerranée : le locus **Est-2** qui semble présenter un seul allèle quand on utilise un système de tampon Tris HCl (celui qui a été utilisé dans la présente étude) se révèle comporter 3 ou 4 allèles quand on utilise un système de tampon TC 8,0. Nous considérons donc que l'étude de locus **Es-2** doit être reprise et que pour le moment aucune conclusion définitive ne peut être avancée.

Pour chaque locus et chaque échantillon, les fréquences phénotypiques se répartissent selon la loi de Hardy-Weinberg (il n'existe pas de différence statistiquement significative entre la répartition des génotypes observés et attendus, Yahyaoui 1983). Deux paramètres estimant le degré de polymorphisme ont été calculés (Tableau III). Les **taux de polymorphisme** ( $P = 0,95$  et  $P = 0,01$ ) et les **taux d'hétérozygotie** sont **équivalents** dans les populations de Méditerranée et d'Atlantique. Enfin, l'indice d'identité génétique de Nei (Nei, 1972) est élevé ( $I = 0,9598$ ), ce qui confirme que les **deux populations sont très semblables**.

## 2 - Comparaison des civelles maintenues en élevage

Nous avons cherché à savoir s'il existait des différences génétiques détectables entre les lots de civelles ayant révélé des vitesses différentes de croissance au niveau de 8 locus polymorphes pour l'élevage I et de 7 pour l'élevage II (dans ce dernier élevage le locus **Sod-1** n'a pas pu être étudié du fait de la petite taille des foies). Cette étude a été réalisée indépendamment sur chaque élevage et a porté : a) sur les trois lots considérés séparément, b) sur la comparaison des lots 1 et 2 (Tête + moyen) et du lot 3 (queue) et c) des lots 2 et 3 et du lot 1.

Deux types d'analyses ont été entrepris. Le premier, qui a considéré chaque locus pris indépendamment, a consisté à comparer la distribution des génotypes, la distribution des allèles, la distribution de l'ensemble des homozygotes et des hétérozygotes. Aucune de ces analyses n'a révélé de différence statistiquement significative (la comparaison de la distribution des génotypes en considérant les trois lots est présentée à titre d'exemple, Tableau IV pour l'élevage I et Tableau V pour l'élevage II).

Le deuxième type d'analyse a porté sur ce que nous appellerons "l'hétérozygotie individuelle" et a consisté à déterminer si la probabilité d'observer des individus hétérozygotes à 0, 1, 2, 3 etc... locus était différente dans les divers lots des deux élevages. Avant d'effectuer cette étude, nous avons vérifié que, pour un individu donné, la probabilité d'être hétérozygote à un locus particulier était bien indépendante de celle d'être hétérozygote à un autre locus (le tableau VI donne les résultats obtenus pour l'élevage I). Les comparaisons de l'hétérozygotie individuelle



ont été effectuées en considérant l'ensemble des niveaux d'hétérozygotie individuelle, puis en effectuant divers regroupements. Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée, quelle que soit la comparaison considérée (le tableau VII donne les résultats observés dans les élevages I et II quand on considère l'ensemble des 3 lots et l'ensemble des niveaux d'hétérozygotie individuelle).

## DISCUSSION

### I - Comparaison Atlantique-Méditerranée

Le problème de l'origine des anguilles méditerranéennes a donné lieu à controverse. Une origine sargassienne leur a été attribuée par Schmidt (1922), hypothèse qui a reçu différentes confirmations récentes (Tesch, 1974, 1977, 1978, 1979). A l'opposé, un certain nombre d'auteurs, surtout italiens, ont mis en doute cette interprétation et proposé une origine méditerranéenne (Grassi, 1914 et 1919; Mazzarelli, 1914; Sanzo, 1928; Ekman, 1932; Tucker, 1959).

L'étude des différentes formes électrophorétiques des enzymes (alléomorphes ou allozymes) s'est révélée à de nombreuses reprises une technique extrêmement utile pour confirmer ou mettre en évidence des isolements sexuels entre formes considérées comme appartenant à la même espèce par les systématiciens n'ayant accès qu'aux caractères morphologiques (cf. Pasteur et Pasteur, 1979). Ainsi, si une partie ou la totalité des anguilles de la Méditerranée étaient autochtones, on devrait pouvoir les identifier par la présence d'allozymes particulières, absentes dans les populations de l'Atlantique.

Il a d'ailleurs été fait appel à de telles études, en particulier sur les leptocéphales de la mer des Sargasses, pour établir que les anguilles des côtes européennes et américaines de l'Atlantique appartiennent en fait à des espèces distinctes, *A. anguilla* et *A. rostrata* (Comparini et Rodino, 1980 puis Comparino et Schoth, 1982).

Quelques investigations tentant de comparer les anguilles des côtes européennes de l'Atlantique et de la Méditerranée ont également été entreprises. Fine et al., (1966) ont observé quelques différences dans le polymorphisme des transferrines chez des adultes et Comparini et al. (1977) n'ont noté aucune différence aux locus Pgi-1 et Pgi-2 (=Gpi-1 et Gpi-2 de la présente étude) entre des populations de civelles et d'anguillettes de la Manche (Swansea) et de la Méditerranée (Pise).

Notre propre étude a permis d'une part d'augmenter considérablement le nombre de locus examinés jusqu'à présent par les différents auteurs, et d'autre part, du fait qu'elle s'est adressée à des civelles, de s'affranchir dans une certaine mesure des problèmes liés à d'éventuelles sélections différentielles susceptibles d'être rencontrées avec des individus plus âgés, ayant vécu dans divers milieux. Nous avons ainsi montré que les civelles capturées dans l'Océan Atlantique, à l'embouchure du Sebou, et en Méditerranée, près de Port La Nouvelle, sont **génétiqument très semblables** puisqu'aucune différence statistiquement significative n'a été révélée dans les fréquences alléliques de 21 des 22 locus étudiés. La seule différence faiblement significative ( $P < 0,05$ ) au locus Es-2, résultant de l'absence de l'allèle Es-2<sup>95</sup> en Méditerranée, demande à être confirmée du fait des problèmes évoqués dans le chapitre "Résultats".

Ce travail n'apporte donc **aucune donnée nouvelle en faveur de l'existence d'aires de reproduction propres à la Méditerranée**, comme avancée par les auteurs italiens. Les données morphométrique et méristiques (comptage vertébraux par microradiographie) acquises sur ce même matériel (Yahyaoui, 1983) confirment d'ailleurs cette absence de différence significative entre civelles atlantiques et civelles méditerranéennes. Tous ces résultats plaident finalement, sous réserve d'analyses complémentaires de nouveaux gènes, **en faveur de l'hypothèse sargassienne** de Schmidt (1922) selon laquelle les anguilles européennes, aussi bien atlantiques que méditerranéennes, sont toutes originaires d'une même aire de reproduction, la Mer des Sargasses.

## 2 - Élevage

Nous avons tenté de savoir si les civelles ayant atteint en élevage des tailles inégales présentaient des différences détectables au niveau des gènes codant des enzymes ("gènes enzymatiques"). La condition préalable **indispensable** pour qu'il existe une liaison entre les variations génotypiques et tous les autres caractères phénotypiques (caractères non-enzymatiques ou caractères N-E) est que la variation du caractère N-E ne dépende pas uniquement (ou essentiellement) des conditions environnementales) mais possède une composante génétique. Toutefois, le fait que le caractère N-E soit partiellement héritable n'est pas suffisant : la probabilité de détecter des associations entre les variations du caractère N-E et celle d'un ou plusieurs gènes enzymatiques dépend, entre autres, de la nature du contrôle génétique de ce caractère. La meilleure chance de réussite concernera un caractère contrôlé par un seul gène ; elle diminuera en fonction du nombre de gènes impliqués et deviendra quasi nulle si le caractère N-E dépend d'un grand nombre de gènes à effets réduits et dispersés dans l'ensemble du génome.

Le caractère "taille" des civelles maintenues en élevage dépend de l'action conjuguée de nombreux facteurs. Actuellement, seuls ont été analysés les facteurs environnementaux (milieu physique, régime alimentaire, densité de population).



On peut également raisonnablement supposer que ce caractère subit l'influence de mécanismes physiologiques (âge, métabolisme...) ainsi que de facteurs génétiques puisque l'action de ces derniers a été démontrée chez d'autres poissons (Chevassus 1982).

Les expériences d'élevage des civelles ont montré que le retard de croissance est probablement lié à un stress social induit par la surpopulation, un tel phénomène comportemental ayant été décrit chez l'Anguille par Peters et al., (1980) et Peters (1982). Ainsi, quand le nombre d'individus par bac d'élevage diminue, en faveur d'une population de taille plus homogène, les civelles les plus petites présentent une croissance accélérée de sorte qu'elles peuvent rattraper et même dépasser les individus qui, à des densités plus fortes, avaient atteint des tailles plus élevées (Yahyaoui (1983). De tels résultats sont susceptibles d'être utilement pris en compte en anguilliculture où la pratique de tri sélectif et de calibrage des anguillettes est très répandue (Koops et Kuhlmann, 1979).

Il convient d'ailleurs, finalement de noter que même si l'un des gènes enzymatiques étudié est localisé près d'un gène majeur contrôlant la taille des civelles, nous avons toute chance de ne pas observer de liaison, les effets du milieu "noyant" les effets génétiques.

---

Chevassus B., 1982 - Facteurs génétiques et sociaux influençant la croissance chez les poissons. Oceanis, 7 : 579-598.

Comparini A.; Rodino E., 1980 - Electrophoretic evidence for 2 species of *Anguilla leptocephali* in the Sargasso Sea. Nature Lond. : 287 (5781) : 435-437.

Comparini A., Schoth M., 1982 - Comparison of electrophoretic and meristic characters of O-group eel larvae from the Sargasso Sea. Helgolander Meeresunters. 35 (3): 289-299.

Comparini A.; Rizzotti M., Nardella M., Rodino E., 1975 - Ricerche elettroforetiche sulla variabilità genetica di *Anguilla anguilla*. Boll. Zool., 42 : 283-288.

Comparini A., Rizzotti M., Rodino E., 1977 - Genetic control and variability of phosphoglucose isomerase (PGI) in eels from the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. Mar. Biol., 43 : 109-116.

Ekman S., 1932 - Prinzipielles über die Wanderungen und die tiergeographische Stellung des Europäischen Aales *Anguilla anguilla* L. Zoogeografica, 1 : 85-106.

Fine J.M., Boffa G.A., Drilhon A., 1966 - Les groupes de transferrines chez l'Anguille. Rev. Pathol. comp. 3, 3, 229-233.

- Foulquier L., Descamps B., 1979 - Données sur l'utilisation des eaux de réfrigération industrielle. Bull. Cent. et rech. sci. Biarritz, 12, 3, 409-432.
- Gandolfi-Hornyold A., 1927a - Observations sur la longueur de la civelle du Bassin d'Arcachon pendant l'hiver 1925-1926, Bull. stn. biol., Arcachon, 24 (1), 91-94.
- Gandolfi-Hornyold A., 1927b - Observations sur des civelles de l'Adour à Bayonne, Bull. soc. Hist. nat. Toulouse, 56, 483-490.
- Gandolfi-Hornyold A., 1928 - Mensurations de civelles de la Loire. Bull. soc. Cent. Aquic. Pêche, 35, 24-25.
- Gandolfi-Hornyold A., 1937 - La taille maximum de la civelle du golfe de Gascogne. Revue Suisse Zool. 44 (23), 381-382.
- Grassi N., 1914 - Quel che si sa e quel che non si sa intorno alla storia naturale dell'anguilla. Mem. R. com. Talassogr. ital., 37 : 1-50.
- Grassi B., 1919 - Nuove ricerche sulla storia naturale dell'anguilla. Mem. R. Com. Talassogr. ital., 67 : 1-141.
- Heldt H., Heldt H., 1929 - Les civelles du Lac de Tunis. Considérations sur les époques de présence, la taille et le poids. Bull. stn. océanogr. Salammbô, (14) : 1-40.
- Koops H., Kuhlmann H., 1979 - Grading of farmed eels by means of meshwire boxes. Mariculture Committee. Int. Conn. Expl. Sea, CM/F5, 15 pp.
- Kuhlmann H., Koops H., 1981 - New technology for rearing elvers in Heated waters. From Proc. world symp. on Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation systems, Stavanger 28-29 May, 1980. Vol. I. Berlin 1981.
- Lecomte-Finiger R., 1978 - Contribution à l'étude biologique et écologique (*Anguilla anguilla*) entrant dans un étang méditerranéen. Thèse 3ème cycle Université P. et M. Curie, 66 pp.
- Lecomte-Finiger R., 1983 - Contribution à la connaissance de l'écobiologie de l'Anguille *Anguilla anguilla* L. 1758, des milieux lagunaires méditerranéens du Golfe du Lion : Narbonnais et Roussillon. Thèse de doctorat d'Etat es-sciences nat. Univ. de Perpignan, 203 pp.
- Mazarelli G., 1914 - Note critiche sulla biologia dell'anguilla Riv. Pesca Idrob., nno lx2 : 49-59.
- Nei H., 1972 - Genetic distance between population. Ann. Nat. 106 (949) : 283-292.
- Pasteur G. et Pasteur N., 1979. Les critères biochimiques de l'espèce animale : un aperçu. Les problèmes de l'espèce dans le règne animal, III, Mem. Soc. zool. Fr. (suppl.), 99-150.
- Peters G., 1982 - The effects of stress on the stomach of the European eel *Anguilla anguilla* L. J. Fish. Biol. 21 : 497-512.
- Peters G., Delventhal H., Klinger H., 1980 - Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla* L) Arch. Fish. Wiss., 30 (2/3) : 157-180.
- Querellou J., 1975 - Facteurs limitants de l'élevage des anguilles en France. Techniques japonaises correspondantes et adaptabilité. Publ. Assoc. Dév. Aquacult., Cestas, 1, 17 pp.
- Rodino E., Comparini A., 1978 - Biochemical polymorphism in Teleosts. The eel problem. Bull. Zool. 45 (sup. 2) 47-61.



- Sanzo L., 1928 - Biologia dell'anguilla. Att. convegno biol. mar. appli. pesca., 1-16.
- Schmidt J., 1922 - The breeding places of the eel. Phil. Trans. R. Soc., 211 (B) 179-208.
- Tesch F. W., 1974 - Speed and direction of silver and yellow eels *A. anguilla*, released and tracked in the open North Sea. Ber. dt. wiss. Komm. Meresforsch : 23 (2) : 181-227.
- Tesch F.W., 1977 - The eel Biology and managements of anguillid eels. Chapman et Hall eds., 435 p.
- Tesch F. W. 1978 - Telemetric observations of the spawning migration of the eel *A. anguilla* west of the European Shelf. Environ. Biol. Fishes, 3 (2) : 203-210.
- Tesch F. W. 1979 - Tracking of silver eels (*A. anguilla* L.) in different shelf areas of the Northeast Atlantic. Rapp. P. V. Réun. Cons. int. Explor. Mer., 174 : 104-114.
- Tucker D. W., 1959 - A new solution to the atlantic eel problem Nature, Lond., 183, 495-501.
- Vassal D., Bruslé J., 1983 - Anguilliculture : comparaison de deux types d'alimentation (naturelle et artificielle) en conditions d'élevage intensif. Compte-rendus des travaux du GIS. ARM. Vol. 1 (sous presse).
- Williams G. C., Koehn R. K., Mitton J. B., 1973 - Genetic differentiation without isolation in the american eel *Anguilla rostrata*. Evolution, 27 : 192-204.
- Yahyaoui A., 1983 - Etude comparée (recrutement, croissance et polymorphisme enzymatique) des populations Atlantiques et Méditerranéennes (Maroc-France) de civelles d'*Anguilla anguilla* L. 1758). Thèse 3ème cycle océanologie Université de Perpignan, 177 p.
- Koehn R. K., Williams G. C., 1977 - Genetic differentiation without isolation in the american eel, *Anguilla rostrata*. II Temporal stability of geographic patterns Evolution, 32, 3, 614-37.

TABLEAU 1 : Systèmes enzymatiques analysés, tissus d'activité et tampons d'électrophorèses utilisés

ENZYMES	LOCUS	TISSUS à activité enzymatique	Tampon électrophorèse
Aspartate-amino-transferase (E. C. 2-6-1-1)	Aat-1 Aat-2 Aat-3	foie, muscle, broyat de civelle entières	TC 8,0
Acide-phosphatase (E. C. 3. 1. 3. 2)	Acp	foie, muscle, coeur, rein, broyat de civelles entières	TC 6,7
Esterases (E. C. 3. 1. 1. )	ES-1 ES-2 ES-3	foie, muscle, coeur, broyat de civelles entières	Tris HCl 8,5 TC 8,0
Glyoxalase (E. C. 4. 4. 1. 5)	Glo	broyat de civelles entières, foie	TEB 8,6
Glucose - phosphate - isomérases (E. C. 5. 3. 1. 9)	Gpi-1 Gpi-2	foie, coeur, muscle et broyat de civelles entières	TCB 8,7
Glucose 6 - phosphate déshydrogenase (E.C.1.1.1.49)	G6pd	foie, rein, muscle, broyat de civelles entières	TC 8,0
$\alpha$ - Glycerophosphate - deshydrogénases (E.C.1.1.1.8)	Gpd	foie, broyat de civelles entières muscle	TC 8,0
Isocitrate - deshydrogenases (E.C.1.1.1.42)	ldh	broyat de civelles entières, foie	TC 6,7
Lactate - deshydrogenases (E. C. 1. 1. 1. 27)	Ldh-1 Ldh-2	broyat de civelles entières, foie	TC 6,7
Malate - deshydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 37)	Mdh-1 Mdh-2	foie, rein, muscle, broyats de civelles entières	TC 8,0
Malico - Enzyme (E. C. 1. 1. 1. 40)	Me-1 Me-2	broyat de civelles entières, foie	TC 6,7
Mannose - phosphate - Isomerase (E. C. 5. 3. 1. 8. )	Mpi	foie, coeur, muscle, broyat de civelles entières	TEB 8,6
6 - Phosphogluconate - deshydrogenase (E.C.1.1.1.44)	6-PGD	broyat de civelles entières, foie	TC 8,0
Phosphoglucomutases (E. C. 2. 7. 5. 1.)	Pgm	broyat de civelles entières, foie	TCB 8,7
Protéines totales	Pt- 1 à Pt-3	broyat de civelles entières	Tris HCl 8,5
Superoxide - dismutases (E. C. 1. 15. 1. 1.)	Sod-1 Sod-2	foie	TC 8,0



Tableau II. Fréquences alléliques relatives observées aux locus polymorphes dans les divers échantillons d'anguilles. (n indique le nombre de genes étudiés pour chaque locus ; les anguilles étant diploïdes  $n = 2N$ , N représente le nombre d'individus examinés).

Locus	Allèles	ATLANTI-QUE	MEDITERRANEE			
		Civelles	Civelles	Elevage I	Elevage II	Total
Aat-1	110	0,006	0	0,009	0,027	0,011
	100	0,957	0,938	0,955	0,964	0,952
	90	0,037	0,038	0,027	0,009	0,025
	80	0	0,023	0,009	0	0,011
	(n)	(164)	(130)	(112)	(112)	(354)
Aat-2	110	0,012	0,014	0,019	0	0,011
	100	0,976	0,965	0,972	1,000	0,977
	90	0,006	0,021	0,009	0	0,011
	80	0,006	0	0	0	0
	(n)	(168)	(144)	(108)	(98)	(350)
Es-2	100	0,931	1,000	-	-	1,000
	95	0,069	0	-	-	0
	(n)	(102)	(96)	-	-	(96)
Gpi-1	120	0,071	0,062	0,095	0,081	0,078
	100	0,887	0,882	0,862	0,814	0,854
	80	0,042	0,056	0,043	0,105	0,068
	(n)	(168)	(144)	(116)	(124)	(384)
Gp-2	100	0,940	0,937	0,931	0,952	0,940
	80	0,054	0,049	0,069	0,048	0,055
	60	0,006	0,014	0	0	0,005
	(n)	(168)	(144)	(116)	(124)	(384)
Ldh-2	100	0,899	0,935	0,890	0,911	0,914
	90	0,101	0,065	0,110	0,089	0,086
	(n)	(168)	(138)	(100)	(124)	(362)
Mdh-2	110	0,043	0,063	0,069	0,032	0,055
	100	0,877	0,826	0,853	0,839	0,839
	90	0,080	0,111	0,078	0,129	0,106
	(n)	(162)	(144)	(116)	(124)	(384)
Me-2	110	0,042	0	0	0,031	0,017
	100	0,958	1,000	1,000	0,906	0,948
	90	0	0	0	0,063	0,034
	(n)	(24)	(24)	(2)	(32)	(58)
Mpi	110	0	0	0	0,008	0,003
	100	0,952	0,965	0,902	0,968	0,945
	90	0,042	0,035	0,080	0,024	0,045
	80	0,006	0	0,018	0,008	0,007
	(n)	(168)	(144)	(112)	(124)	(380)
Sod-1 <sup>a)</sup>	100	-	-	0,637	0,625	0,636
	80	-	-	0,098	0	0,091
	60	-	-	0,265	0,375	0,273
	(n)	-	-	(102)	(8)	(110)

a) le locus sod-1 ne peut être étudié que sur des extraits de foie, cf. tableau I

TABLEAU III. Degré de polymorphisme et taux d'hétérozygotie

PARAMETRES	ATLANTIQUE		MEDITERRANEE (1)	
Taux de polymorphisme				
P 0,95	5/22 = 22,7 %		6/22 = 27,3 %	
P 0,01	9/22 = 40,9 %		9/22 = 40,9 %	
Taux d'hétérozygotie	<u>observée</u>	<u>calculée</u>	<u>observée</u>	<u>calculée</u>
Aat-1	0,061	0,085	0,090	0,093
Aat-2	0,048	0,065	0,046	0,045
Aat-3	0	-	0,011	0,010
Acp	0	-	0	-
Es-1	0	-	0	-
Es-2	0,098	0,128	0	-
Glo	0	-	0	-
Gpi-1	0,190	0,206	0,266	0,260
Gpi-2	0,119	0,114	0,109	0,113
Gépd	0,024	0,024	0,011	0,016
ldh	0	-	0,071	0,037
Ldh-1	0	-	0	-
Ldh-2	0,254	0,182	0,149	0,157
Mdh-1	0	-	0	-
Mdh-2	0,185	0,223	0,281	0,282
Me-1	0	-	0	-
Me-2	0,083	0,080	0,103	0,100
Mpi	0,095	0,092	0,105	0,105
Pgm	0	-	0	-
Pt-1	0	-	0	-
Pt-2	0	-	0	-
Pt-3	0	-	0	-
MOYENNE	0,053	0,055	0,056	0,055

(1) Sans tenir compte des gènes Sod-1 et Sod-2 étudiés seulement dans l'échantillon de Méditerranée ("Elevage I").



TABLEAU IV: Répartition des génotypes dans les différents lots et dans l'ensemble de l'"élevage I".

Génotypes	Lot-I-1 (1)		Lot-I-2		Lot-I-3		Total	
	obs.	Théor.	obs.	Théor.	obs.	Théor.	obs.	Relat.
Aat-1	18	17,309	15	15,487	18	18,22	51	0,911
100	0	0,342	0	0,306	1	0,36	1	0,018
100-110	1	1,026	1	0,918	1	1,08	3	0,054
100-90	0	0,342	1	0,306	0	0,36	1	0,018
(n)	(19)		(17)		(20)		(56)	
	$X^2 = 0,712$ NS		$X^2 = 1,902$ NS		$X^2 = 1,507$ NS		$X^2$ total = 4,121 NS	
Aat-2	14	14,16	18	17,936	19	18,88	51	0,944
100	0	0,555	1	0,703	1	0,74	2	0,037
100-110	1	0,285	0	0,361	0	0,38	1	0,019
(n)	(15)		(19)		(20)		(54)	
	$X^2 = 2,351$ NS		$X^2 = 0,487$ NS		$X^2 = 0,472$ NS		$X^2$ total = 3,309 NS	
Gpi-1	16	16,701	13	14,421	15	15,180	44	0,759
100	3	2,945	4	2,945	2	3,100	9	0,155
100-120	0	0,988	2	0,988	1	1,040	3	0,052
100-80	0	0,646	0	0,646	2	0,680	2	0,034
(n)	(19)		(19)		(20)		(58)	
	$X^2 = 1,664$ NS		$X^2 = 2,200$ NS		$X^2 = 2,956$ NS		$X^2$ total = 6,820 NS	
Gpi-2	16	16,701	19	16,701	16	17,58	51	0,879
100	1	0,323	0	0,323	0	0,34	1	0,017
80	2	1,957	0	1,957	4	2,06	6	0,103
(n)	(19)		(19)		(20)		(58)	
	$X^2 = 1,449$ NS		$X^2 = 2,596$ NS		$X^2 = 2,309$ NS		$X^2$ total = 6,354 NS	
Ldh-2	14	14,82	12	12,48	13	11,70	39	0,78
100	5	4,18	4	3,52	2	3,30	11	0,22
100-90	(n)	(19)	(16)	(15)	(15)	(50)		
	$X^2 = 0,206$ NS		$X^2 = 0,084$ NS		$X^2 = 0,656$ NS		$X^2$ total = 0,941 NS	
Mdh-2	16	13,43	12	13,43	13	14,14	41	0,707
100	1	2,62	3	2,62	4	2,76	8	0,138
110-100	2	2,95	4	2,95	3	3,10	9	0,155
100-90	(n)	(19)	(19)	(20)	(20)	(58)		
	$X^2 = 1,799$ NS		$X^2 = 0,581$ NS		$X^2 = 0,652$ NS		$X^2$ total = 3,022 NS	
Mpi	15	13,96	14	15,61	17	16,43	46	0,821
100	2	2,43	5	2,71	1	2,86	8	0,143
100-90	0	0,30	0	0,34	1	0,36	1	0,018
100-80	0	0,30	0	0,34	1	0,36	1	0,018
90-80	(n)	(17)	(19)	(20)	(20)	(56)		
	$X^2 = 0,679$ NS		$X^2 = 2,781$ NS		$X^2 = 3,506$ NS		$X^2$ total = 6,966 NS	
Sod-1	9	6,90	3	6,90	10	8,17	22	0,430
100	0	0,31	0	0,31	1	0,37	1	0,020
80	1	1,57	2	1,57	2	1,86	5	0,098
60	1	3,76	8	3,76	3	4,47	12	0,235
100-80	4	2,82	2	2,82	3	3,34	9	0,176
100-60	1	0,63	1	0,63	0	0,75	2	0,039
80-60	(n)	(16)	(16)	(19)	(19)	(51)		
	$X^2 = 3,893$ NS		$X^2 = 7,868$ NS		$X^2 = 2,761$ NS		$X^2$ total = 14,522 NS	

(1) Fréquence absolue attendue si chaque lot est identique à l'ensemble de l'élevage.

(NS : non significatif,  $P > 0,05$ )

TARLEAU V: Répartition des géotypes dans les différents lots et dans l'ensemble de l'élevage II.

Géotypes	Lot-II-1		Lot-II-2		Lot-II-3		Total	
	obs.	théor.	obs.	théor.	obs.	théor.	obs.	relative
Gen-1								
100	16	15,219	24	23,275	18	18,580	57	0,929
100-110	0	0,194	1	1,350	2	1,580	3	0,051
100-90	1	0,198	0	0,450	0	0,360	1	0,018
(n)	(11)		(25)		(22)		(56)	
	$\chi^2 = 3,847$		$\chi^2 = 0,567$		$\chi^2 = 1,162$		$\chi^2$ total = 5,576 (4 ddl), NS	
Gen-1								
100	12	10,965	15	16,125	13	12,900	40	0,645
100-80	0	0,272	0	0,400	1	0,320	1	0,016
100-100	2	2,465	4	3,625	3	2,950	9	0,145
100-80	3	3,298	6	4,850	3	3,550	12	0,194
(n)	(17)		(25)		(20)		(62)	
	$\chi^2 = 0,484$		$\chi^2 = 0,790$		$\chi^2 = 1,649$		$\chi^2$ total = 2,923 (6 ddl), NS	
Gen-2								
100	16	15,351	22	22,575	18	18,06	56	0,903
100-80	1	1,649	3	2,425	2	1,94	6	0,097
(n)	(17)		(25)		(20)		(62)	
	$\chi^2 = 0,282$		$\chi^2 = 0,151$		$\chi^2 = 0,002$		$\chi^2$ total = 0,435 (2 ddl), NS	
Lcn-2								
100	15	14,535	21	21,375	17	17,1	53	0,855
100-90	1	1,866	4	2,825	2	2,260	7	0,113
90	1	0,544	0	0,800	1	0,640	2	0,032
(n)	(17)		(25)		(20)		(62)	
	$\chi^2 = 0,799$		$\chi^2 = 1,295$		$\chi^2 = 0,233$		$\chi^2$ total = 2,327 (4 ddl), NS	
Mdh-2								
100	14	11,798	17	17,350	12	13,880	43	0,694
100-110	0	1,105	2	1,625	2	1,300	4	0,065
100-90	3	3,842	6	5,65	5	4,520	14	0,226
90	0	0,272	0	0,400	1	0,320	1	0,016
(n)	(17)		(25)		(20)		(62)	
	$\chi^2 = 1,973$		$\chi^2 = 0,512$		$\chi^2 = 2,128$		$\chi^2$ total = 4,613 (6 ddl), NS	
Mpi								
100	15	15,623	24	22,975	18	18,380	57	0,919
100-110	1	0,272	0	0,400	0	0,320	1	0,016
100-90	0	0,272	1	0,400	0	0,320	1	0,016
100-80	1	0,816	0	1,200	2	0,960	3	0,048
(n)	(17)		(25)		(20)		(62)	
	$\chi^2 = 2,286$		$\chi^2 = 2,546$		$\chi^2 = 1,775$		$\chi^2$ total = 6,607 (6 ddl), NS	

(1) Fréquence absolue attendue si chaque lot est identique à l'ensemble de l'élevage.  
(NS : non significatif :  $P \geq 0,05$ ).



TABLEAU VI. Comparaison de la distribution des gènes hétérozygotes dans chaque individu, en supposant que le polymorphisme de chaque gène est indépendant.

Nombre de gènes hétérozygotes à	Probabilité (1) d'observation	FREQUENCES ABSOLUES	
		Théoriques	observés
0 locus	0,2610	15,14	17
1 locus	0,3957	23,12	23
2 locus	0,2276	13,17	15
3 locus	0,0504	4,44	3
4 à 7 locus	0,0329	1,91	0
		58,77	58
		$\chi^2 = 2,985$ (4 ddl), NS	

(1) La probabilité exacte de chaque classe a été calculée à partir des fréquences génotypiques observées à chaque locus.

Tableau VII. Distribution de l'hétérozygotie individuelle dans les différents lots des deux élevages. (Theor. = fréquences absolues dans l'hypothèse que chaque lot pris individuellement est semblable à l'échantillon total de chaque élevage ; NS = non significatif statistiquement. Les chiffres entre parenthèses de la dernière colonne donnent les effectifs théoriques de chaque degré d'hétérozygotie individuelle calculés à partir des fréquences génotypiques dans l'hypothèse où le polymorphisme de chaque gène est indépendant.

Nombre de gène hétérozygotes par individu		Lot de queue (3) obs. théor.	Lot moyen (2) obs. théor.	Lot de tête (1) obs. théor.	Total
Elevage I	0	3 5,567	7 5,860	7 5,567	17 (15,14)
	1	10 7,543	4 7,94	9 7,543	23 (23,12)
	2	6 4,921	6 5,18	3 4,921	15 (13,17)
	3	0 0,988	3 1,04	0 0,988	3 (4,66)
	4 à 7	0 0	0 0	0 0	0 (1,91)
		19 $\chi^2 = 3,209$ (3 ddl), NS	20 $\chi^2 = 6,001$ (3 ddl), NS	19 $\chi^2 = 2,388$ (3 ddl), NS	58 $\chi^2 = \text{Total} = 11,598$ (8 ddl), NS
Elevage II	0	6 7,1	7 8,875	9 6,035	22 (16,18)
	1	9 7,42	9 9,275	5 6,307	23 (24,71)
	2	3 4,52	9 5,650	2 3,842	14 (14,07)
	3	1 0,64	0 0,800	1 0,544	2 (4,98)
	4 à 7	1 0,32	0 0,400	0 0,270	1 (2,03)
		20 $\chi^2 = 2,666$ (4 ddl), NS	25 $\chi^2 = 3,591$ (4 ddl), NS	17 $\chi^2 = 3,263$ (4 ddl), NS	62 $\chi^2 = \text{Total} = 9,520$ (8 ddl), NS

# **POISSONS**

II

Croissance - Nutrition

Pathologie - Métabolisme

Ecoethologie





## MÉTHODE DE PRODUCTION DES JUVÉNILES CHEZ TROIS POISSONS MARINS

### LE BAR, LA SOLE ET LE TURBOT

Michel GIRIN

Rapports Scientifiques et Techniques n° 39

202 p. - 100 F

ISSN 0339-2899

Cet ouvrage analyse un ensemble d'expériences réalisées de 1971 à 1976, pour mettre au point des techniques de production fiables de juvéniles chez le bar, la sole et le turbot. Cette mise au point impliquait l'aménagement d'un ensemble d'installations, et l'acquisition d'une somme de connaissances, nécessaires à la maîtrise de la ponte des adultes, de l'incubation des œufs, de l'élevage des larves, et de l'accoutumance des juvéniles à un aliment inerte susceptible d'assurer leur grossissement jusqu'à une taille convenable pour la commercialisation. Afin de faciliter les comparaisons, tous les élevages larvaires ont été réalisés à des températures voisines de 18° C. Dans ces conditions, l'accoutumance à l'aliment inerte pouvait être achevée avant la fin du 3ème mois suivant l'éclosion. Le travail décrit ici s'arrête donc à cet âge.

## L'ÉLEVAGE DU THON ROUGE

Expériences Japonaises  
par Patrick VINCENT

Rapports Scientifiques et Techniques n° 47

1 volume 21 x 29,7, broché, 71 pages, 1 carte, 50 fig., 25 tabl.

Prix : 30 F. - 6 \$

ISSN 0339-2899

Les efforts de recherche déployés par les Japonais pour l'élevage du thon rouge sont importants. Seule la pêche assure l'approvisionnement en juvéniles. Des essais de croissance de ces juvéniles, capturés à la ligne ou au filet, ont été menés. Un effort important a été consacré à la technologie des cages flottantes. Les résultats de ces expériences sont tels que les Japonais disposent désormais d'éléments pour estimer les possibilités d'élevage du thon rouge dans leurs eaux. Ce rapport, résultat d'une mission d'étude, dresse un bilan nuancé des connaissances acquises ces dernières années dans quelques laboratoires.

Service de la Documentation et des Publications (SDP)

IFREMER - Centre de Brest

B.P. 337 - 29273 BREST CEDEX

Tél. (98) 45.80.55 - Télèx 940 627 F

L'ABSORPTION INTESTINALE DES LIPIDES CHEZ  
LA TRUITE ARC-EN-CIEL (SALMO GAIRDNERI).

Jean-Marie VERNIER et Marie-France SIRE  
Groupe Cytophysiologie de la Nutrition des Poissons  
Bat 441, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex

RESUME

Bien que l'absorption des lipides alimentaires soit plus lente que chez les Mammifères, les mécanismes ne diffèrent pas fondamentalement. Les acides gras à chaîne longue provenant de l'hydrolyse intraluminal des lipides sont estérifiés par les cellules épithéliales intestinales et transférés à la lymphe dans des VLDL ou des chylomicrons. La taille des lipoprotéines dépend de la nature des acides gras ingérés. Les étapes intracellulaires de cette synthèse de lipoprotéines sont définies.

ABSTRACT

Though the absorption of dietary lipids is much slower than in mammals, the mechanism does not differ fundamentally. The long chain fatty acids resulting from intraluminal hydrolysis are esterified by the epithelial cells and transferred as VLDL-like particles and chylomicrons to lymph. The size of granules depends on the nature of the ingested fatty acids. The intracellular stages of this lipoprotein synthesis are defined.

L'absence admise de chylomicrons dans la lymphe ou le sang des Poissons Téléostéens permettait de supposer un mécanisme original de l'absorption intestinale des lipides. Pour Robinson et Mead (1973) la Truite est incapable de délivrer les triglycérides à la circulation selon le mode habituel (dans des chylomicrons), et reçoit les lipides sous forme d'acides gras non estérifiés, probablement via le système porte. Pour Kayama et Iijima (1976), chez la Carpe, les acides gras s'associent à une protéine vectrice de type albumine et sont transportés directement aux tissus, et, bien que les chylomicrons soient absents, les cellules épithéliales intestinales peuvent former des triglycérides qui seront pris en charge par les lipoprotéines plasmatiques. Pour Skinner et Youssef (1982), le système de transport des lipides chez les Poissons Téléostéens serait, comme chez les Mammifères, celui des lipoprotéines plasmatiques. Les lipides quitteraient l'intestin sous forme d'acides gras non estérifiés, fixés à une protéine vectrice, lesquels seraient alors captés par le foie où aurait lieu la synthèse de lipoprotéines.



Nous avons montré chez la Truite arc-en-ciel (Sire et al., 1981), que le processus de l'absorption des lipides ne diffère pas fondamentalement de celui des Mammifères. Les acides gras à chaîne longue sont, dans leur quasi-totalité, estérifiés par les cellules épithéliales intestinales et transférés à l'espace interstitiel de la lamina propria dans des lipoprotéines de très basse densité ou VLDL ("very low density lipoproteins"), (fig. 1,2).

Les lipides de la ration standard contenant environ 60% d'acides gras insaturés de C16 à C22, la synthèse entérocytaire de particules lipoprotéiques de petites dimensions est très surprenante.

Chez la Truite au cours de l'absorption intestinale des lipides, qui s'étend au-delà de 24 heures, l'étude ultrastructurale de l'épithélium nous a révélé la synthèse, durant la phase maximale d'absorption (entre 18 et 24 h), de particules pouvant atteindre un diamètre de 1500 Å (fig. 2). Bauermeister et al. (1979) démontrent que les constituants des cires du zooplancton (alcools primaires à longue chaîne et acides gras) sont transformés en triacylglycérols par les épithéliocytes intestinaux de la Truite où l'on peut alors mettre en évidence des particules lipoprotéiques pouvant atteindre 4000 Å de diamètre.

Nous nous sommes demandés si l'absence de chylomicrons de taille supérieure à 1500 Å n'était pas circonstancielle, liée à la composition de la fraction lipidique du régime. Nous avons donc tenté d'obtenir la formation de chylomicrons de taille comparable à celle obtenue chez les Mammifères en modifiant la charge en lipides de la ration et la composition de ceux-ci et en prolongeant les observations pour tenir compte de la longue durée de la période d'absorption chez la Truite. Nous avons mené de pair une étude ultrastructurale systématique de l'épithélium intestinal et, sur les lipoprotéines plasmatiques isolées au moment du pic d'absorption, une étude ultrastructurale et biochimique. L'étude biochimique des lipoprotéines plasmatiques n'est pas l'objet de la présente communication.

#### \* Influence de la charge en lipides.

Pour un apport lipidique accru (régime S<sup>†</sup>) les animaux sont mis au jeûne pendant 8 jours et réalimentés. La prise de nourriture est très importante ce qui accroît l'apport lipidique et allonge la période d'absorption), et jusque 18 heures après le repas, les granules de lipoprotéines observées augmentent progressivement de diamètre pour atteindre 800 et même 1000 Å de diamètre et entrent donc dans la gamme de taille des VLDL. A ce moment l'absorption devient très importante, les espaces cellulaires proches de la basale se dilatent et se remplissent de granules de VLDL, innombrables également dans l'espace interstitiel de la lamina propria (fig. 3). Pendant la phase d'absorption maximale (aux environs de 24 h) cer-



tains granules atteignent 2600 Å et le hyaloplasme supranucléaire contient des gouttelettes lipidiques non incluses dans un système membranaire (fig. 4). Au-delà du pic d'absorption (vers 28 heures), les cellules situées à l'apex des villosités présentent un aspect voisin de celui observé à 24 heures, les granules présents au niveau du réticulum et de l'appareil de Golgi diminuant cependant de diamètre (fig. 5), tandis que les cellules situées à la base des villosités, synthétisent à nouveau des granules de lipoprotéines de petit diamètre alors que les espaces intercellulaires qui les séparent sont encore encombrés par les granules de plus grande taille de la phase de synthèse intracellulaire précédente. La vidange des cellules ne sera pas achevée avant trois jours.

Une augmentation de la charge en lipides s'accompagne donc d'une augmentation de la taille des lipoprotéines, la taille des chylomicrons ne dépasse pas toutefois 2600 Å.

\* Influence du degré d'insaturation des acides gras.

- 6, 12 et 18 heures après ingestion d'acide palmitique (hexadécanoïque) par des animaux à jeûn depuis 4 jours, les images obtenues sont très semblables entre elles. L'absorption de l'acide gras se traduit par la formation de granules de lipoprotéines dont le diamètre demeure compris entre 400 et 700 Å de diamètre c'est-à-dire dans la gamme de taille admise pour les VLDL (fig. 6, 7). Aucune gouttelette lipidique "libre" n'est visualisable dans le hyaloplasme. Il n'existe pas de chylomicrons dans le plasma et l'étude ultrastructurale de la fraction VLDL révèle des granules qui s'inscrivent entre 250 et 700 Å de diamètre (fig. 8).

- Dès 3 heures après l'ingestion d'acide linoléique (9,12-octadiénoïque) par des animaux à jeun depuis 4 jours, des granules de lipoprotéines de 400 à 600 Å sont synthétisés par les cellules apicales des villosités. Après 6 heures, l'ensemble des entérocytes assure l'absorption de l'acide gras. Dès ce moment, certains granules peuvent atteindre 1800 Å de diamètre. Le phénomène s'amplifie et à 12 heures, les cellules, en particulier apicales, sont caractérisées par la présence dans tout le hyaloplasme de très nombreuses gouttelettes lipidiques qui peuvent atteindre 5 µm de diamètre (fig. 9). Dans le réticulum endoplasmique, les vésicules réticulaires ou golgiennes, les structures lamellaires, les espaces intercellulaires et l'espace interstitiel de la lamina propria, certains granules peuvent atteindre 2600 Å de diamètre (fig. 10). A 18 heures, les gouttelettes lipidiques sont beaucoup moins nombreuses et la taille des granules de lipoprotéines a diminué; le pic d'absorption est dépassé.

La comparaison avec les résultats obtenus chez les Mammifères apporte un élément capital. Chez le Rat, en effet, l'absorption intestinale de l'acide palmitique se traduit par la formation de particules dont la taille moyenne est de 700 Å de diamètre et celle des acides linoléique ou oléique (octadécanoïque) par la synthèse de particules de 1800 Å de diamètre, les plus grosses atteignant 3000 Å (Ockner et Jones, 1970; Ockner et Isselbacher, 1974; Gangl et Ockner, 1975). La

situation chez la Truite semble donc très semblable. Chez le Rat, par contre, l'ingestion d'huile de Maïs qui comporte plus de 86% d'acides gras insaturés en C18 (oléique et linoléique essentiellement) entraîne la formation de chylomicrons de grande taille allant jusqu'à 10 000 Å (Friedman et Cardell, 1977; Sabesin et Frase, 1977; Caselli et al., 1979; Sire et Vernier, 1980). Les résultats sont donc très différents selon que les acides gras sont fournis sous forme libre ou sous forme estérifiée. Qu'en est-il chez la Truite ?

Pour notre expérimentation, nous avons choisi l'huile de Raisin, dont la composition en acides gras se rapproche de celle de l'huile de Maïs, la teneur en acide linoléique étant encore plus importante (plus de 70%), administrée pure ou incorporée à un régime dont les composants non lipidiques sont ceux du régime standard.

Les images obtenues (fig. 11) sont très comparables à celles observées après ingestion d'acide linoléique pur. En ce qui concerne les lipoprotéines plasmatiques, la fraction chylomicrons est quasi-inexistante; après 18 heures, la fraction VLDL, importante, est surtout formée de particules inférieures à 400 Å (fig. 12 et 13), vraisemblablement d'origine hépatique (Vernier, 1975).

Le volume de la particule de lipoprotéines synthétisée par l'entérocyte dépend donc en fait, non seulement du degré d'insaturation des acides gras et de la charge en lipides, mais également de la voie métabolique suivie pour l'estérification des acides gras et donc de l'hydrolyse intraluminale des triacylglycérols. Chez les Poissons Téléostéens, du fait soit de la non-spécificité de la lipase pancréatique (Patton et al., 1975) soit de l'action complémentaire d'une  $\beta$ -mono-glycéride lipase (Léger et Bauchart, 1972), l'hydrolyse intraluminale des triacylglycérols alimentaires permet la libération de la presque totalité des acides gras constitutifs. La voie majeure de l'estérification intracellulaire est donc celle du glycérol-3-phosphate. Elle conduit à la biosynthèse de glycérophospholipides et de triacylglycérols. Chez les Mammifères, l'un des produits majeurs de l'hydrolyse est formé par les 2-monoacylglycérols dont l'estérification conduit uniquement à la synthèse de triacylglycérols. Pour un même apport de triacylglycérols, la synthèse de matériel de surface (phospholipides) est plus importante chez les Poissons et donc les lipoprotéines plus petites. Si chez la Truite, il est à peu près indifférent de fournir des acides gras ou des triacylglycérols (cf. acide linoléique ou huile de Raisin), ce n'est pas le cas pour les Mammifères; en fournissant directement un acide gras comme l'acide linoléique, la voie exclusive de l'estérification est celle du glycérol-3-phosphate et la situation devient comparable à celle des Téléostéens.



Dans les conditions naturelles de vie, les Truites sont essentiellement carnivores, mais leur régime est très varié. Dans les cours d'eau alpins par exemple, la nourriture des juvéniles, durant la première année, est essentiellement constituée de larves de Chironomides, Copépodes et Ostracodes du fond, jeunes larves de Névroptères. A cette première période succède le régime définitif des juvéniles et des adultes. Ce régime comporte des Poissons, des Crustacés, des Vers, des larves diverses... La digestion des cires se traduit par la formation de chylomicrons (Bauermeister et al., 1979). L'ichtyophagie, compte tenu de la composition des triacylglycérols des tissus des Poissons (Kinsella et al., 1975), correspond à l'ingestion d'un aliment riche en lipides à très forte teneur en acides gras hautement polyinsaturés, en particulier en acide eicosapentaénoïque (C20:5 n-3) et en acide docosapentaénoïque (C22:6 n-3).

Pour étudier l'effet de l'ingestion en quantité importante de tels acides, nous avons fourni à nos animaux soit de l'huile de foie de Morue, soit un régime pour lequel l'huile de foie de Morue est incorporée à un aliment dont les composants non lipidiques sont ceux du régime standard.

Dès 6 heures après l'ingestion, l'étude ultrastructurale de l'épithélium intestinal révèle la présence, dans le réticulum lisse situé immédiatement sous le "terminal web", dans les éléments réticulaires lisses ou granulaires supra et infra-nucléaires (fig. 14 et 15), dans les vésicules probablement d'origine golgienne (fig. 15), dans les espaces intercellulaires et dans l'espace interstitiel de la lamina propria (fig. 16), dans la lumière des capillaires lymphatiques, de granules entrant dans la gamme de taille habituelle des chylomicrons des Mammifères, dépassant souvent 6000 Å de diamètre, atteignant parfois 8000 Å. L'aspect de l'épithélium est alors proche de celui des entérocytes de Rat, 1 ou 2 heures après ingestion d'huile de Maïs. Le pic d'absorption est dépassé après 18 heures mais de nombreux granules synthétisés entrent encore dans la gamme de taille des chylomicrons (fig. 17). L'isolement des lipoprotéines plasmatiques permet pour la première fois de recueillir une très importante fraction chylomicrons (fig. 19), en plus de l'habituelle fraction VLDL (fig. 18).

En plus des acides gras hautement polyinsaturés, l'huile de foie de Morue ou le régime "Morue" contiennent une quantité importante d'acide oléique comparable à celle de l'huile de Maïs. Il conviendrait donc de déterminer le rôle éventuel de cet acide dans l'obtention des chylomicrons.

Chez les Poissons, juvéniles et adultes, les acides gras essentiels appartiennent à la famille du 18:3 n-3 (linoléique). Chez la Truite, le C22:6 n-3 peut à lui seul prévenir tous les symptômes de carence en acides gras essentiels et assu-



rer une croissance optimale. L'acide linoléique aurait la même efficacité, liée à la capacité de l'animal à convertir cet acide gras en acides gras plus longs et plus insaturés. Lorsqu'on ne fournit que le C18:3 comme acides gras en n-3, les besoins seraient de 20% des lipides du régime. Sellner et Hazel (1982) ont démontré la capacité des hépatocytes de la Truite à effectuer désaturation et élongation de l'acide linoléique; cette capacité est supposée pour les entérocytes chez la même espèce (Léger et al., 1981). Pour notre expérimentation nous avons choisi l'huile de Lin, dont les acides gras sont pour l'essentiel en C18, le C18:3 n-3 comptant pour près de 60%, administrée pure ou incorporée à un régime dont les composants non lipidiques sont ceux du régime standard. Les résultats (fig. 20 à 22) sont très voisins de ceux obtenus avec l'huile de Raisin, qui ne contient pas d'acide linoléique. Une élongation-désaturation du C18:3 n-3 aurait dû se traduire par la synthèse d'acides gras hautement polyinsaturés et éventuellement alors par la synthèse de particules de lipoprotéines de grande taille, comme après l'ingestion d'huile de foie de Morue par exemple. Ce n'est pas le cas. L'élongation-désaturation du C18:3 n-3 est donc absente ou faible.

Par le biais de la composition de la fraction lipidique du régime alimentaire, nous pouvons contrôler la synthèse par l'entérocyte de lipoprotéines de différentes tailles dont le turn-over au niveau du plasma sera plus ou moins rapide.

+  
+     +

	Régime Standard S ou S <sup>+</sup>	Huile de Raisin	Régime Raisin	Huile de Foie de Morue	Régime Morue	Huile de Lin	Régime Lin																																						
C14	-	-	-	4	4,6	-	-																																						
C16	37,5	5,2	11	12,8	14,6	5,2	11																																						
C16:1 n-7	-	-	1	9,5	8,7	-	1																																						
C18	-	6,8	3,7	2,7	2,2	4,3	3																																						
C18:1 n-9	17,9	17,6	8,5	27	20,3	16,5	10																																						
C18:2 n-6	21,4	70,4	67,6	2	3,5	16,9	15																																						
C18:3 n-3	1,8	-	-	1,3	1	57,1	55																																						
C18:4 n-3	-	-	-	2,9	2,7	-	-																																						
C20:1 n-9	-	-	-	10,2	12,8	-	-																																						
C20:4 n-6	7,1	-	8,2	1	-	-	4																																						
C20:5 n-3	5,4	-	-	16,1	9,8	-	1																																						
C22:6 n-3	8,9	-	-	10,5	11	-	-																																						
saturés	37,5	12	14,7	19,5	21,4	9,5	14																																						
insaturés	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>n-3</td><td>16,1</td></tr> <tr><td>n-6</td><td>28,5</td></tr> <tr><td>n-7</td><td>-</td></tr> <tr><td>n-9</td><td>17,9</td></tr> </table>	n-3	16,1	n-6	28,5	n-7	-	n-9	17,9	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>-</td><td>70,4</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>88</td><td>17,6</td></tr> </table>	-	70,4	-	-	88	17,6	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>-</td><td>75,8</td></tr> <tr><td>1</td><td>85,3</td></tr> <tr><td>8,5</td><td>-</td></tr> </table>	-	75,8	1	85,3	8,5	-	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>30,8</td><td>3</td></tr> <tr><td>9,5</td><td>37,2</td></tr> </table>	30,8	3	9,5	37,2	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>33,3</td><td>3,5</td></tr> <tr><td>8,7</td><td>33,1</td></tr> </table>	33,3	3,5	8,7	33,1	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>57,1</td><td>16,9</td></tr> <tr><td>-</td><td>90,5</td></tr> <tr><td>16,5</td><td>10</td></tr> </table>	57,1	16,9	-	90,5	16,5	10	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>56</td><td>19</td></tr> <tr><td>1</td><td>10</td></tr> </table>	56	19	1	10
n-3	16,1																																												
n-6	28,5																																												
n-7	-																																												
n-9	17,9																																												
-	70,4																																												
-	-																																												
88	17,6																																												
-	75,8																																												
1	85,3																																												
8,5	-																																												
30,8	3																																												
9,5	37,2																																												
33,3	3,5																																												
8,7	33,1																																												
57,1	16,9																																												
-	90,5																																												
16,5	10																																												
56	19																																												
1	10																																												
Lipides	8		10		14		10																																						



Notre étude ultrastructurale systématique sur le modèle Truite nous permet de prendre position sur le problème de la compartimentation fonctionnelle de l'entérocyte, en particulier sur les rôles dévolus au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi dans la synthèse des lipoprotéines. Quelles sont, chez les Mammifères, les étapes intraentérocytaires admises de cette synthèse ? (schéma 1). La première étape, au niveau du réticulum endoplasmique lisse (REL) consiste en la resynthèse de triacylglycérols à partir des 2-monoacylglycérols estérifiés grâce à des acides gras "activés" (Acyl-CoA). La totalité du système enzymatique nécessaire à cette synthèse leur est inféodée. Ainsi se constitue dans les cavités du REL un coeur "apolaire" de triacylglycérols auxquels s'ajoutent des esters de cholestérol, l'enzyme qui contrôle l'estérification du cholestérol qui a pénétré sous forme libre étant également liée au réticulum lisse. Au niveau du réticulum rugueux (RER), seraient synthétisés des glycérophospholipides par la voie du glycérol-3-phosphate et des apoprotéines spécifiques AI, AII et surtout apoprotéine B. La fusion RER-REL entraînerait la formation dans le REL de chylomicrons naissants formés d'un coeur apolaire et d'une enveloppe polaire constituée de phospholipides, cholestérol et apoprotéines. L'élément essentiel supportant ce point est d'ordre morphologique: les lipoprotéines n'ont jamais été décrites dans les citernes du RER (point 1).

Le passage de ces chylomicrons naissants par l'appareil de Golgi est ensuite considéré comme une étape obligatoire (Sabesin et Frase, 1977). Il serait le site de la glycosylation terminale (addition de N-acétylglucosamine, galactose et acide sialique) des apoprotéines, en particulier de l'apo B, glycosylation qui permet de fournir aux lipoprotéines circulantes des sites de reconnaissance pour les récepteurs membranaires des cellules endothéliales des capillaires tissulaires. Il fournirait également le système membranaire transporteur permettant l'exocytose dans l'espace intercellulaire. Ce double rôle admis du Golgi n'est qu'une extrapolation des résultats obtenus pour la formation des VLDL par les hépatocytes. Compte tenu de la polarisation fonctionnelle de l'entérocyte, les seuls arguments sont d'ordre morphologique. En coupes fines, les chylomicrons perdent, au niveau de l'appareil de Golgi, la disposition monolinéaire qu'ils sont censés posséder dans les éléments du REL. Ce critère morphologique est utilisé pour vérifier la pureté des fractions golgiennes (point 2).

Aucune figure de fusion d'éléments du réticulum, contenant ou non des chylomicrons, avec la membrane plasmique n'a pu être observée (point 3). Les chylomicrons sont toujours observés dans l'espace intercellulaire au niveau des complexes golgiens ou en-dessous d'eux vers la base de la cellule, jamais dans l'espace intercellulaire au niveau du cytoplasme apical (point 4).

Le réticulum endoplasmique du cytoplasme infranucléaire ne renferme jamais de particules lipoprotéiques (point 5).



Sur notre modèle Truite, Chapman et al. (1978) ont montré qu'une apoprotéine représentant 60% des apoprotéines des VLDL sériques possède des propriétés physiques et chimiques semblables à celles qui caractérisent l'apo-B humaine. L'existence d'une composante glucidique de cette apoprotéine n'est toutefois pas encore établie. L'entérocyte absorbant de Truite, deux fois plus élevé (70  $\mu\text{m}$ ) et plus étroit (7-10  $\mu\text{m}$ ) que l'entérocyte de Mammifère, constitue un bien meilleur modèle pour l'approche ultrastructurale de l'absorption des lipides, en particulier du fait de la très nette compartimentation du hyaloplasme supranucléaire, qui peut s'étendre sur une quarantaine de  $\mu\text{m}$  de hauteur (schéma 2). Pendant la phase d'absorption des lipides, les saccules golgiens s'emplissent de granules de lipoprotéines (VLDL ou chylomicrons) et constituent autant de grandes vésicules (fig. 23 et 24) qui, comme en témoignent certaines images, peuvent déverser leur contenu dans l'espace intercellulaire (fig. 24). L'exocytose de lipoprotéines légères par le biais de l'appareil de Golgi est donc indéniable. Cependant, sur notre modèle, nous apportons des preuves morphologiques qui sont le contre-pied des cinq points développés plus haut, en particulier de tous ceux qui permettent d'affirmer l'obligation de l'étape golgienne dans la synthèse et le transport des lipoprotéines (points 3, 4 et 5).

La figure 25 montre que les lipoprotéines peuvent être observées dans l'espace intercellulaire immédiatement en-dessous du niveau du "terminal-web" sousmicrovillaire c'est à dire plus de 30  $\mu\text{m}$  au-dessus du niveau golgien (point 4). La figure 26 correspond à une portion de hyaloplasme située immédiatement au-dessus de la membrane basale et montre divers éléments du réticulum renfermant des granules de lipoprotéines (point 5), ici surtout des éléments du réticulum granulaire (point 1). La présence de lipoprotéines au niveau du réticulum granulaire est également visible sur les figures 29, 30, 31 et 32. La disposition non-monolinéaire des lipoprotéines au niveau du réticulum est extrêmement banale (point 2; figures 26, 28, 29, 30 et 31). Enfin, point capital, les figures de fusion d'éléments du réticulum, contenant ou non des chylomicrons ou des VLDL, avec les structures lamellaires (invaginations de la membrane plasmique latérale ou basale, caractéristique des entérocytes des Poissons Téléostéens) ou la membrane plasmique latérale elle-même sont également banales (figures 27 à 32).

En résumé nous pensons que VLDL et chylomicrons peuvent être transportés vers l'espace intercellulaire, soit directement par le réticulum endoplasmique soit par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi (schéma 2). Ceci ne signifie pas que celui-ci n'effectue pas la glycosylation terminale éventuelle de l'apo-B.

+ +



Les granules de lipoprotéines libérés dans l'espace intercellulaire s'y accumulent temporairement au-dessus de la basale provoquant son élargissement, facilité par l'absence de desmosomes. VLDL et chylomicrons gagnent alors l'espace interstitiel de la lamina propria, innombrables entre fibroblastes et fibres de collagène (fig. 33 à 36). Quelle est la voie d'exportation des lipoprotéines? Pour distinguer à l'échelle ultrastructurale capillaires sanguins et capillaires lymphatiques nous avons adopté la classification de Bennett et al. (1955). Les capillaires sanguins (fig 33 et 35) présentent un revêtement endothélial d'épaisseur variable, perforé dans les régions les plus minces (capillaires "fenestrés") et une membrane basale mince continue. Ils peuvent être rattachés au type A2  $\propto$  de Bennet et al.. Les capillaires lymphatiques (fig. 34), de forme plus irrégulière possèdent une paroi endothéliale très mince, non perforée, dépourvue de membrane basale et peuvent être rapportés au type B1  $\propto$  de Bennet et al.. Si les cellules endothéliales des capillaires sanguins manifestent une intense activité pinocytotique, la présence de VLDL ou de chylomicrons dans leur lumière demeure exceptionnelle et il est possible que des lipoprotéines proviennent de la circulation générale. Au contraire, la lumière des capillaires renferme toujours de nombreux granules qui parfois la couvrent entièrement. Le passage des lipoprotéines se fait par l'espace intercellulaire des cellules endothéliales. La voie d'exportation est donc la voie lymphatique.

---

Bauermeister A.E.M. and Sargent J.R., 1979 - Biosynthesis of triacylglycerols in the intestine of rainbow trout (Salmo gairdneri) fed marine zooplankton rich in wax esters. Bioch. Bioph. Acta, 575, p. 358-364.

Bauermeister A.E.M., Pirie B.J.S. and Sargent J.R., 1979 - An electron microscopic study of lipid absorption in the pyloric coeca of rainbow trout (Salmo gairdneri) fed wax ester-rich zooplankton. Cell Tissue Res., 200, p. 475-486.

Bennett H.S., Luft J.H. and Hampton J.C., 1959 - Morphological classification of vertebrate blood capillaries. Amer. J. Physiol., 196, p. 381-390.

- Caselli C., Carlier H. and Bezard J., 1979 - Size of lipoprotein particles in the intestinal lymph of rats fed on corn oil, peanut oil, rapeseed oil or canbra oil. Nutr. Metab., 23, p. 73-87.
- Chapman J., Goldstein S., Mills G.L. and Léger C., 1978 - Distribution and characterization of the serum lipoproteins and their apoproteins in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Biochem., 17, p. 4455-4464.
- Friedman H.I. and Cardell R.R. Jr., 1977 - Alterations in the endoplasmic reticulum and golgi complex of intestinal epithelial cells during fat absorption and after termination of this process: a morphological and morphometric study. Anat. Rec., 188, p. 77-102.
- Gangl A. and Ockner R.K., 1975 - Intestinal metabolism of lipids and lipoproteins. Gastroenterology, 68, p. 167-187.
- Kayama M. and Iijima N., 1976. Studies on lipid transport mechanism in the fish. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 42, p. 987-996.
- Kinsella J.E., Shimp J.L. and Weihrauch J., 1977 - Fatty acid content and composition of freshwater finfish. J. Am. Oil Chem. Soc., 54, p. 424-429.
- Léger C. and Bauchart D., 1972 - Hydrolase des triglycérides par le système lipasique du pancréas de truite. Mise en évidence d'un nouveau type de spécificité d'action. C.R. Acad. Sci. (D) (Paris), 275, p. 2419-2422.
- Léger C., Frémont L. and Boudon M., 1981 - Fatty acid composition of lipids in the trout. I.- Influence of dietary fatty acids on the triglyceride fatty acid desaturation in serum, adipose tissue, liver, white and red muscle. Comp. Biochem. Physiol., 69B, p. 99-105.
- Ockner R.K. and Jones A.L., 1970 - An electron microscopic and functional study of very low density lipoproteins in intestinal lymph. J. Lipid Res., 11, p. 284-292.
- Ockner R.K. and Isselbacher K.J., 1974 - Recent concepts of intestinal fat absorption. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 71, p. 107-146.

- Patton J.S., Nevenzel J.C. and Benson A.A., 1975 - Specificity of digestive lipases in hydrolysis of wax esters and triglycerides studied in anchovy and other selected fish. Lipids, 10, p. 575-583.
- Robinson J.S. and Mead J.F., 1973 - Lipid absorption and deposition in rainbow trout (Salmo gairdneri). Can. J. Biochem., 51, p. 1050-1058.
- Sabesin S.M. and Frase S., 1977 - Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. J. Lipid Res., 18, p. 496-511.
- Sellner P.A. and Hazel J.R., 1982 - Desaturation and elongation of unsaturated fatty acids in hepatocytes from thermally acclimated rainbow trout. Arch. Bioch. Biophys., 213, p. 58-66.
- Skinner E.R. and Youssef A.M., 1982 - The characterization of lipoprotein lipase isolated from the post-heparin plasma of the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. Biochem J., 203, p. 727-734.
- Sire M.F. and Vernier J.M., 1980 - Lipid staining on semithin sections with Sudan black B or Nile blue sulphate. Application to intestinal fat absorption. Acta Histochem. Cytochem., 13, p. 193-201.
- Sire M.F., Lutton C. and Vernier J.M., 1981 - New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. J. Lipid Res., 22, p. 81-94.
- Vernier J.M., 1975 - Etude ultrastructurale des lipoprotéines hépatiques de très basse densité au cours du développement de la Truite arc-en-ciel Salmo gairdneri Rich.. J. Microscopie Biol. Cell., 23, p. 39-50.



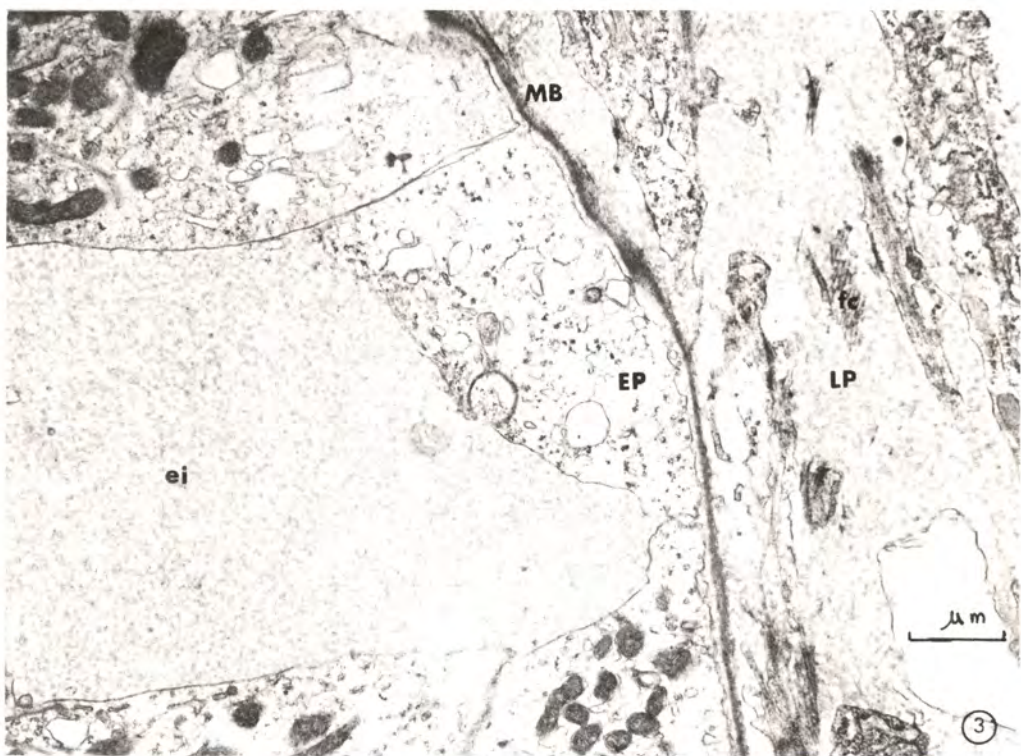
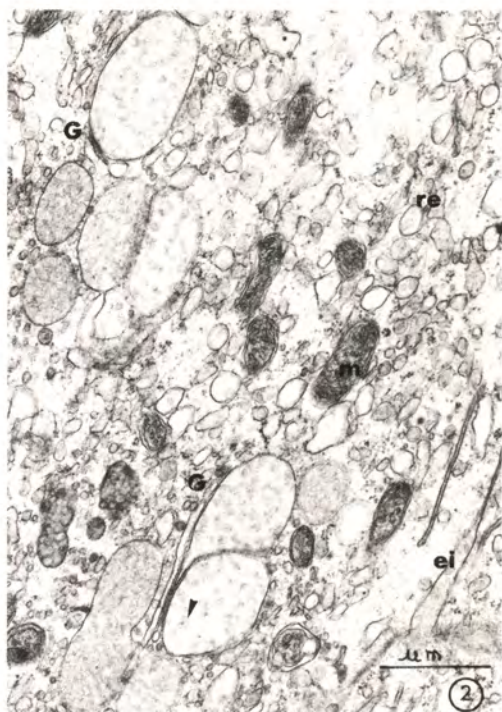
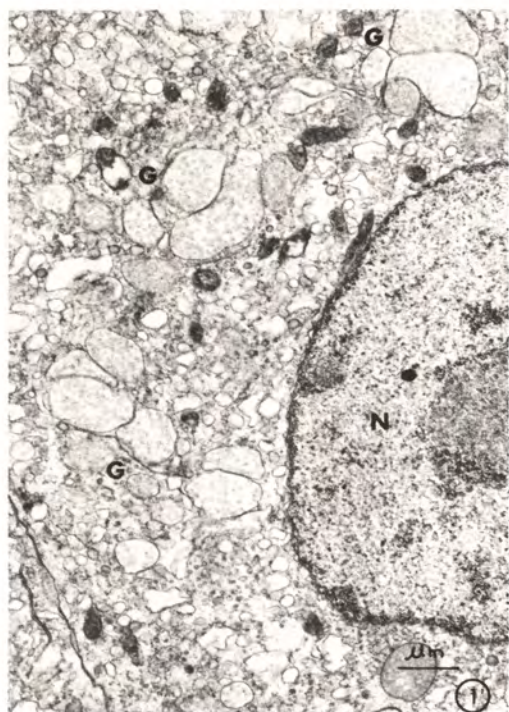
PLANCHE I.

Figures 1 et 2. - Régime standard.

Figure 1. - Jusque vers 18 heures après la prise de nourriture, l'absorption des lipides alimentaires se traduit par la synthèse de granules de lipoprotéines dont la taille n'excède que très exceptionnellement 1000 Å. Ces granules sont présents dans tous les éléments réticulaires et golgiens. G: dictyosome; N: noyau;  
x 11 000.

Figure 2. - Au-delà de 18 heures, au moment de la phase maximale d'absorption la taille moyenne des granules augmente, certains atteignant 1500 Å (tête de flèche). Ils encombrant les divers éléments du réticulum endoplasmique (re), les dictyosomes (G) et l'espace intercellulaire (ei).  
x 20 000.

Figure 3. - Régime S<sup>+</sup>, 18 heures après le repas, juste avant la phase maximale d'absorption. Les granules de VLDL (la plupart de moins de 1000 Å de diamètre) s'accumulent dans l'espace intercellulaire (ei) au-dessus de la membrane basale (MB). Ils encombrant l'espace interstitiel de la lamina propria (LP). EP: épithélio-cyte; fc: fibre de collagène; m: mitochondrie.  
x 17 000.





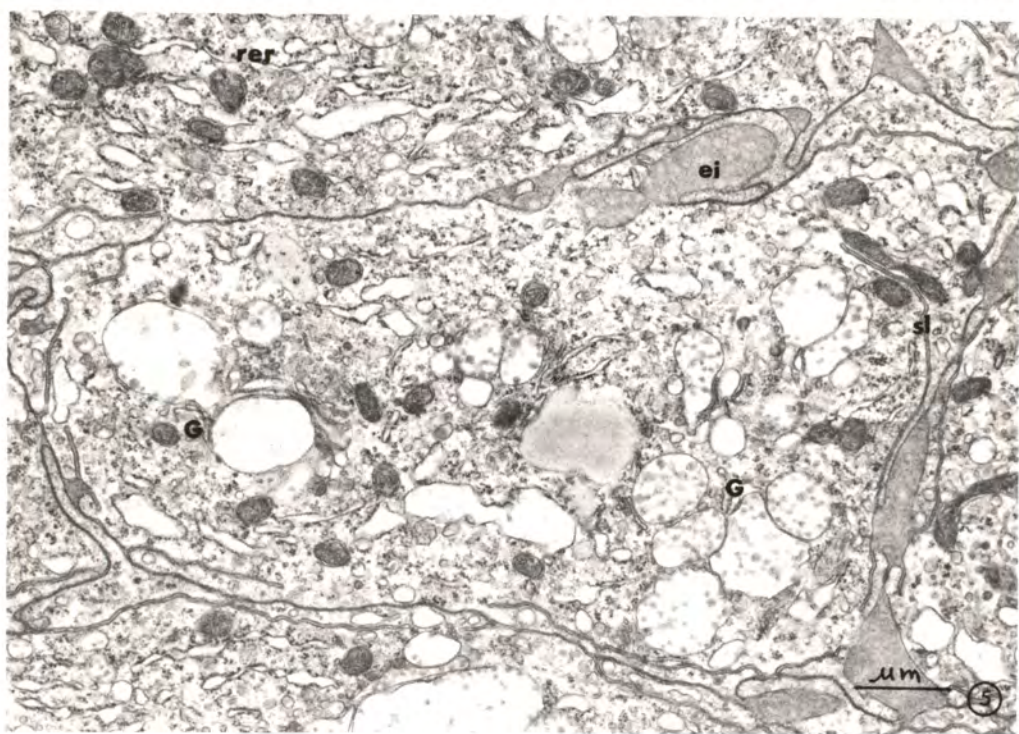
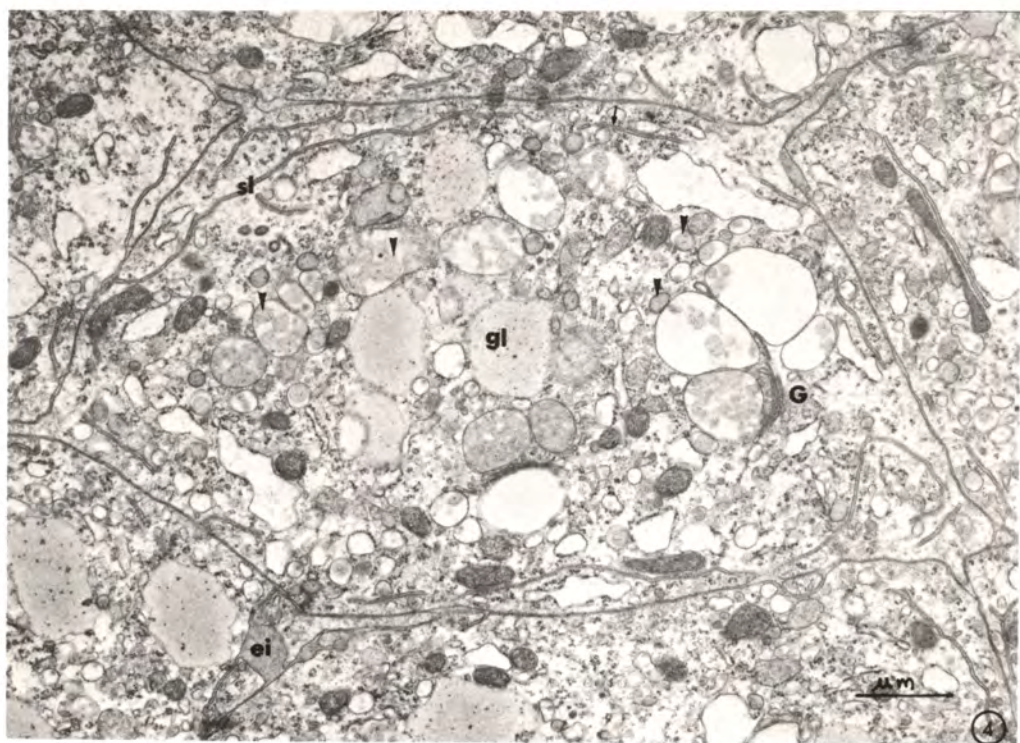




PLANCHE III. Acide palmitique, 18 heures après l'ingestion.

Figure 6. - L'absorption se traduit par la formation de granules qui n'excèdent pas 700 Å (VLDL). Les éléments golgiens sont toujours bien identifiables (G). Aucune gouttelette "libre" ne peut être observée. ei: espace intercellulaire. Méthode OTO.  
x 20 000.

Figure 7. - Les VLDL synthétisées qui ont migré par l'espace intercellulaire (ei) s'accumulent au-dessus de la membrane basale avant de gagner l'espace interstitiel par les pores de celle-ci. N: noyau.  
x 20 000.

Figure 8. - VLDL plasmatiques. Au niveau du plasma, on ne peut isoler la fraction chylomicrons. Dans la fraction VLDL la taille des VLDL est comprise entre 250 et 700 Å environ. Il s'agit alors d'un mélange de VLDL intestinales et hépatiques.  
x 80 000.

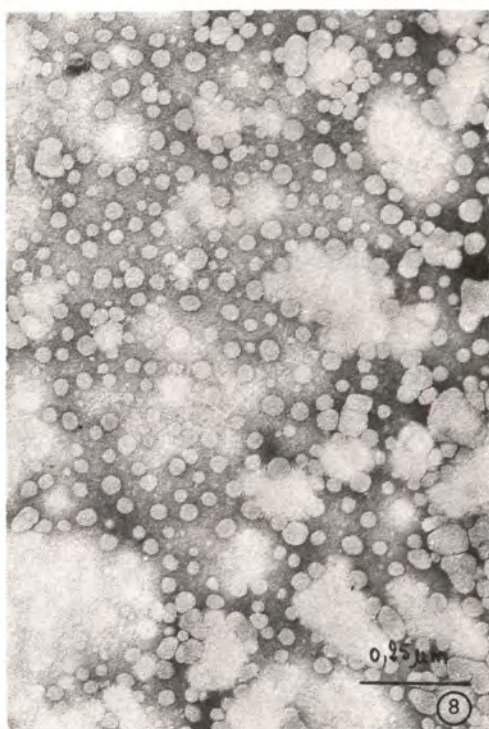
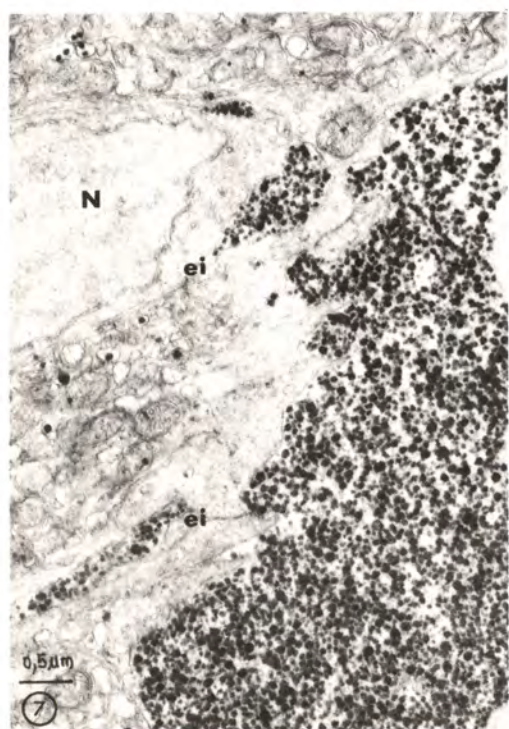
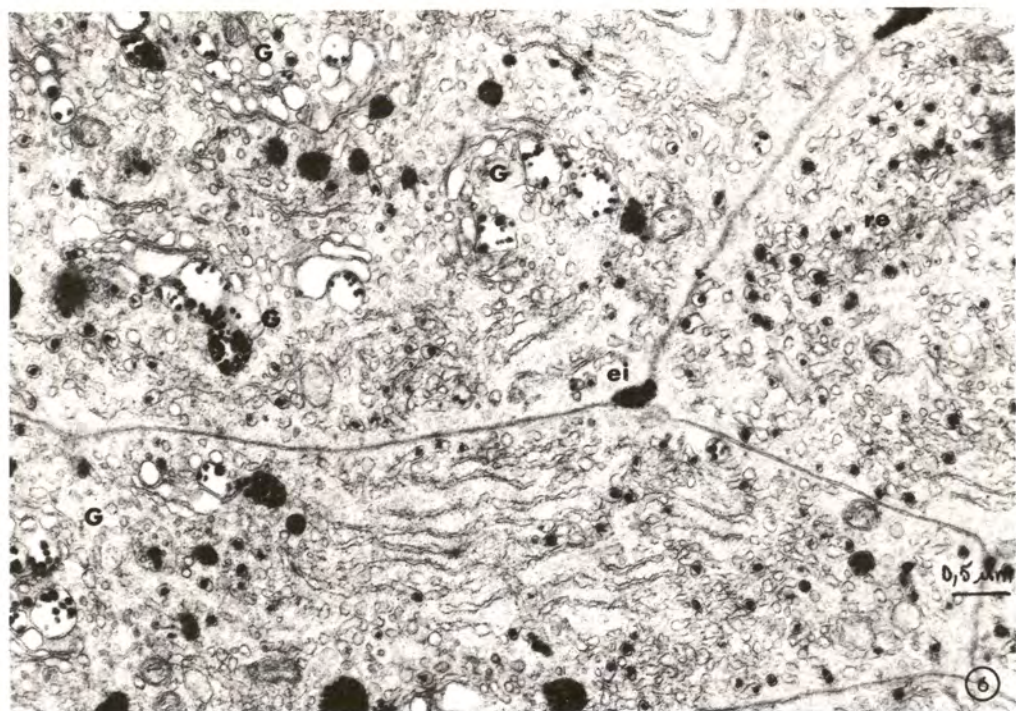




PLANCHE IV. Acide linoléique 13 heures après l'ingestion.

Figure 9. - Au moment du pic d'absorption, plus précoce qu'avec le régime standard, le réticulum endoplasmique est très développé, en particulier au niveau du hyaloplasme apical de la zone des mitochondries (ZM), juste sous le terminal web (TW). Il renferme des granules qui ici peuvent atteindre 1800 Å (têtes de flèches). L'élément caractéristique des cellules apicales pour lesquelles l'absorption semble plus importante, est la présence dans le cytosol de gouttelettes lipidiques libres (GL) souvent de grandes dimensions. Méthode OTO.

x 12 000.

Figure 10. - La taille moyenne des granules qui, par l'espace intercellulaire (ei) et après avoir franchi la membrane basale (MB), gagnent le liquide interstitiel de la lamina propria (LP) est nettement plus élevée que lors de l'ingestion d'acide palmitique. Certains granules ici approchent 2500 Å (têtes de flèches). F: fibroblaste; fc: fibre de collagène.

x 34 000.

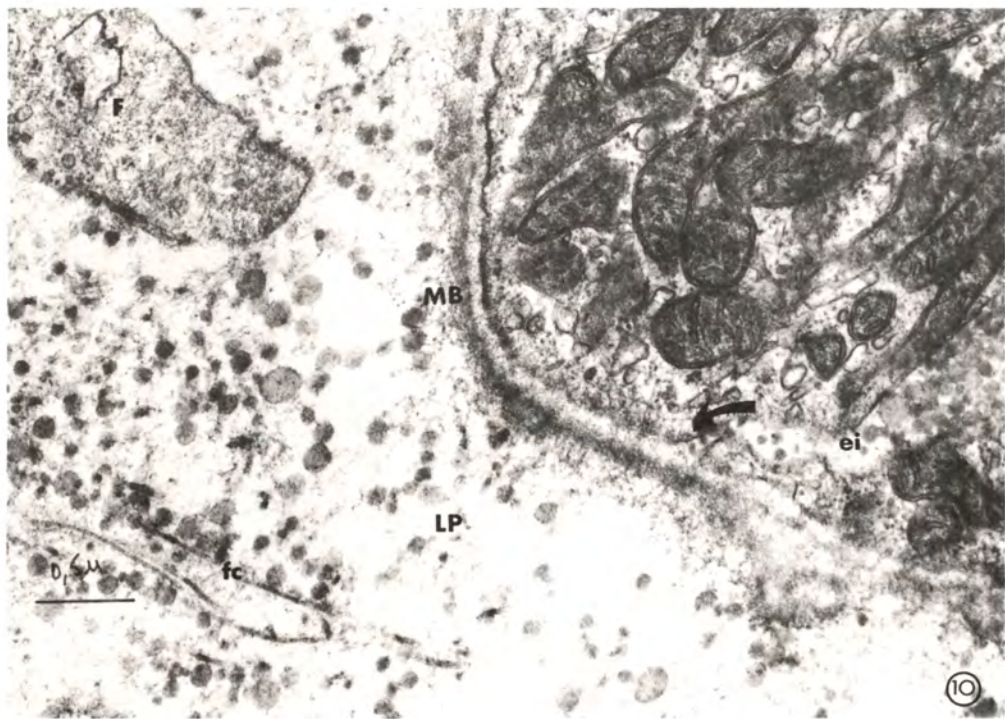
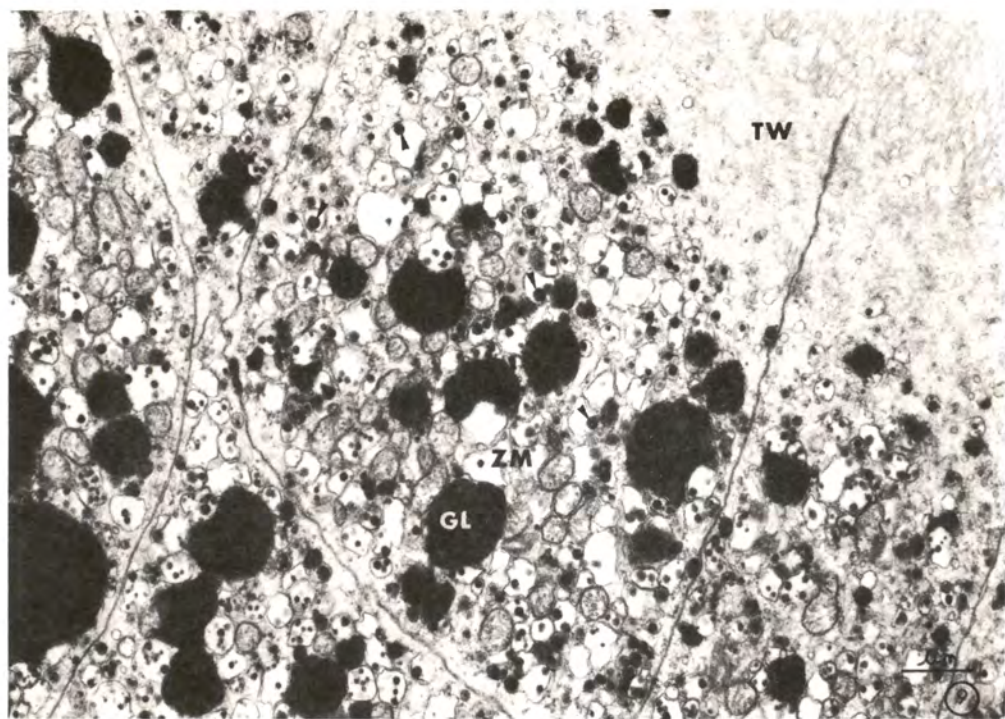




PLANCHE V.

Figure 11. - Régime raisin, 13 heures après l'ingestion. Les images obtenues sont très comparables à celles obtenues après ingestion d'acide linoléique (fig.9), en particulier du fait de la présence des gouttelettes lipidiques "libres" dans le hyaloplasme (GL). Ici encore certains granules atteignent 1800 Å (têtes de flèches) mais la taille moyenne semble plus petite. ei: espace intercellulaire; G: éléments golgiens; m: mitochondries; TW: terminal web; ZM: zone des mitochondries.

x 11 000.

Figures 12 et 13. VLDL plasmatiques, 18 heures après ingestion d'huile de raisin. Le pic d'absorption est dépassé depuis près de 5 heures, la fraction VLDL est surtout formée de granules de taille inférieure à 400 Å ce qui laisse présumer de leur origine hépatique. Les granules supérieurs à 500 Å donc d'origine intestinale sont mineurs. La figure 13 correspond à une zone plus favorable à leur observation.

x 60 000.

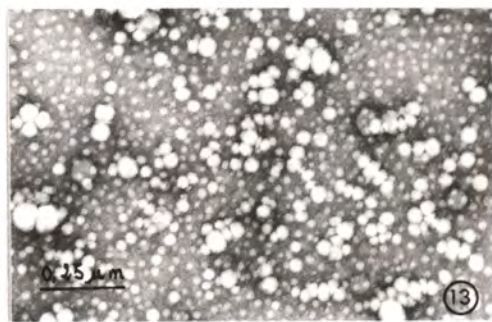
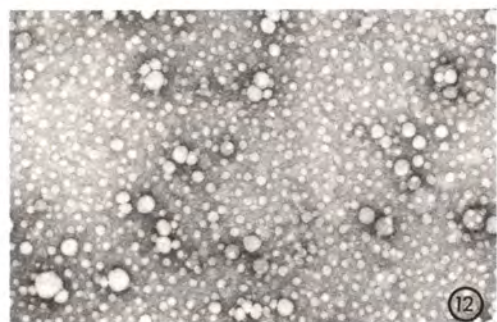
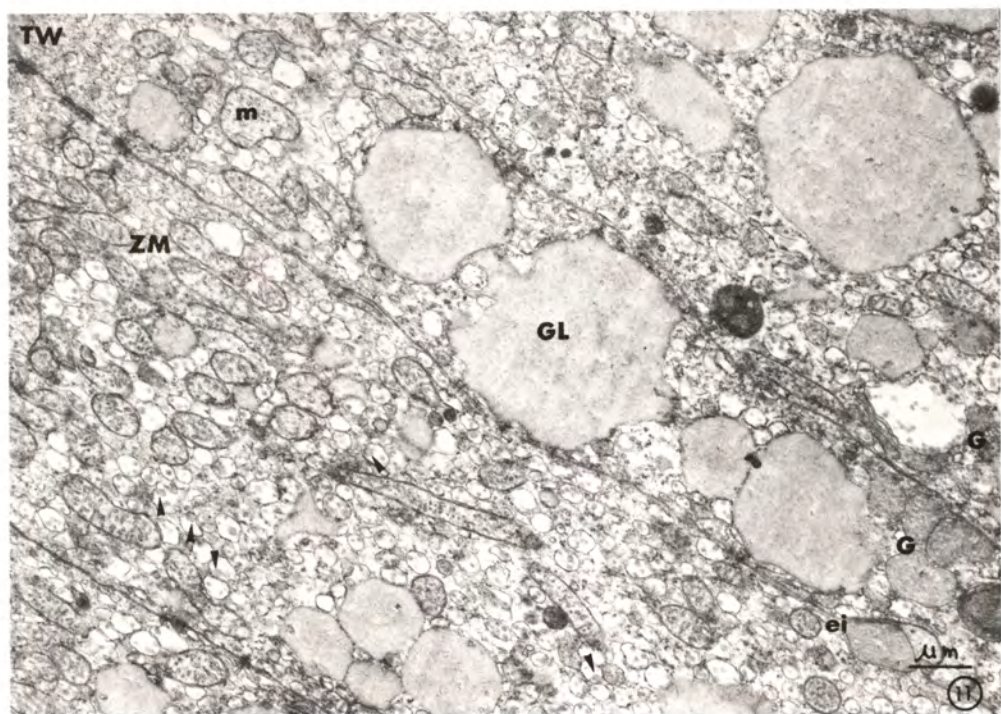




PLANCHE VI. Régime Morue.

Figures 14 à 16. - Régime morue, 6 heures après l'ingestion.

Figure 14. - Dès 6 heures après l'ingestion les éléments réticulaires renferment des granules dont la plupart entrent dans la gamme de taille admise pour les chylomicrons, certains d'entre eux dépassant 5000 Å.

x 30 000.

Figure 15. - L'observation au niveau réticulaire (tête de flèche) vaut pour les éléments golgiens (flèches).

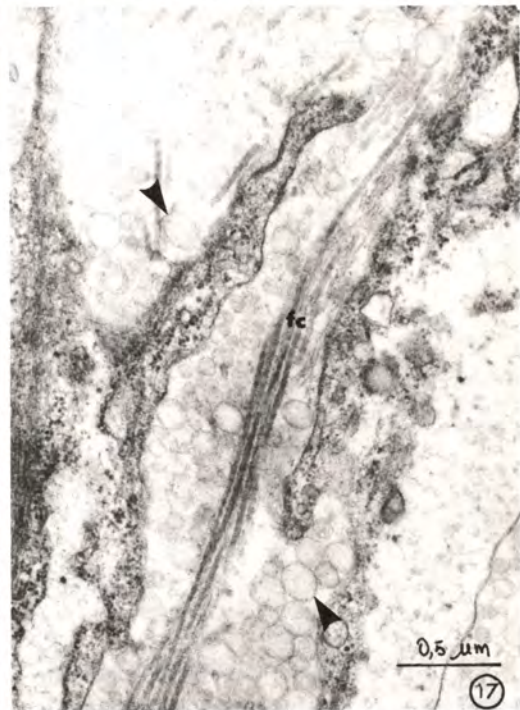
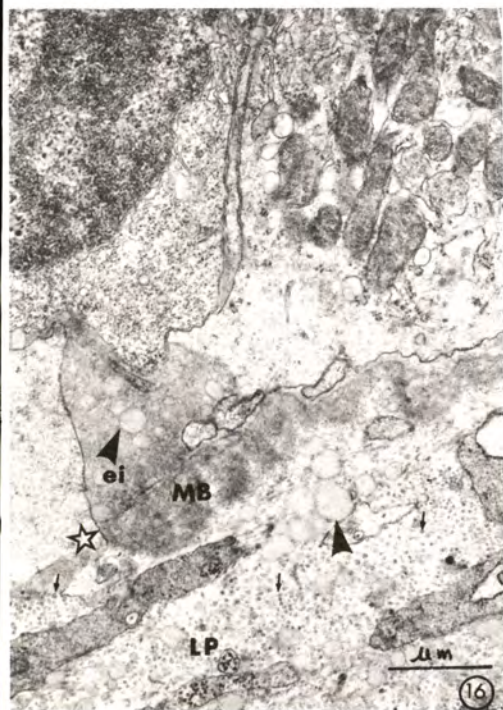
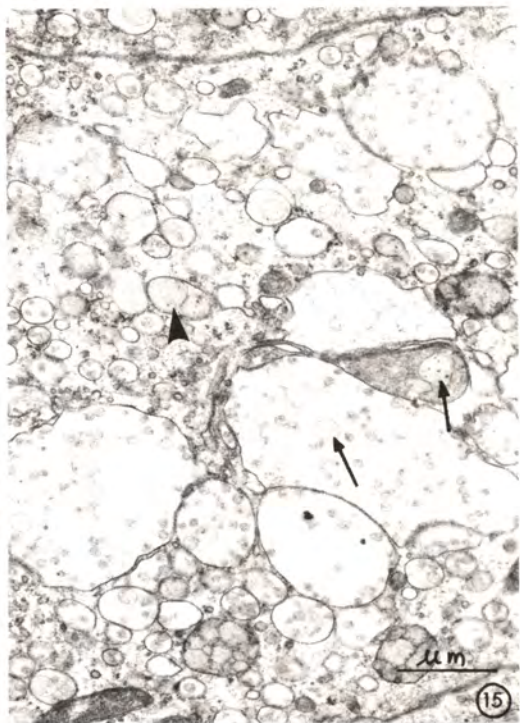
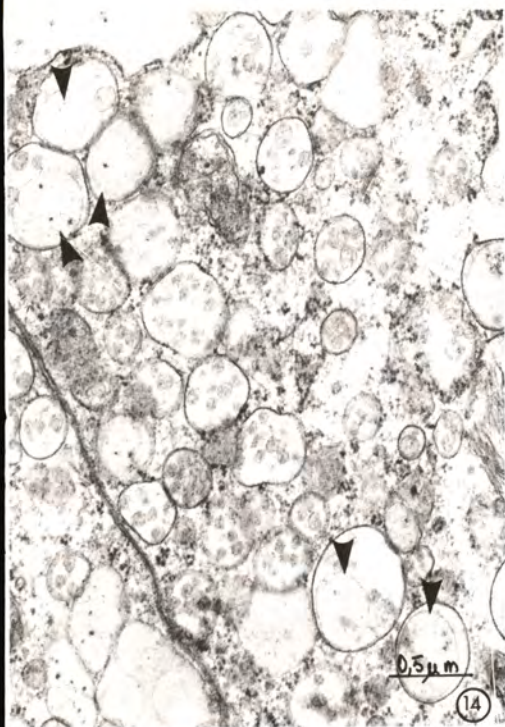
x 18 000.

Figure 16. - Cette image montre que dès ce moment, les chylomicrons et les VLDL par l'espace intercellulaire (ei) arrivent au niveau de la basale qu'ils franchissent par des pores (étoile) pour gagner l'espace interstitiel de la lamina propria (LP) entre les fibres de collagène, la plupart coupées ici transversalement (flèches). Têtes de flèches: grands chylomicrons.

x 18 000.

Figure 17. - Régime morue, 18 heures après l'ingestion. L'espace interstitiel de la lamina propria est encore encombré par les chylomicrons (têtes de flèches). fc: fibre de collagène.

x 36 000.





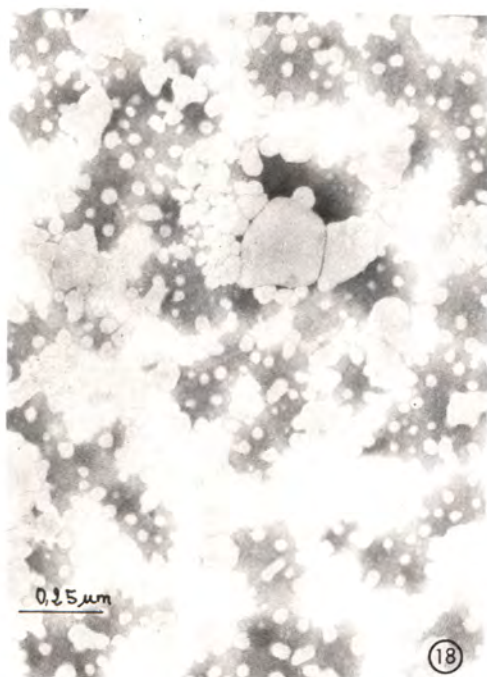


PLANCHE VII. Lipoprotéines plasmatiques légères, 18 heures après ingestion d'huile de foie de morue.

Figure 18. - Fraction VLDL. Son origine est double, hépatique et intestinale.  
x 60 000.

Figure 19. - Fraction chylomicrons. Celle-ci est très importante; certains granules atteignant 8000 Å.

x 12 000.

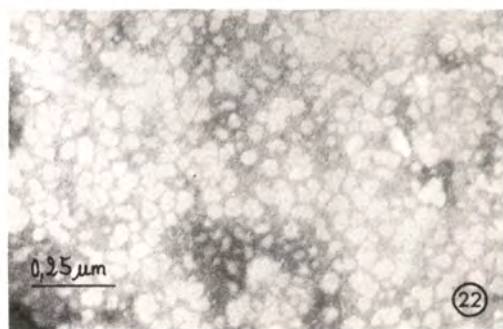
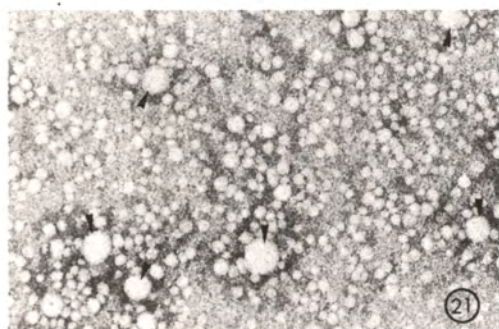
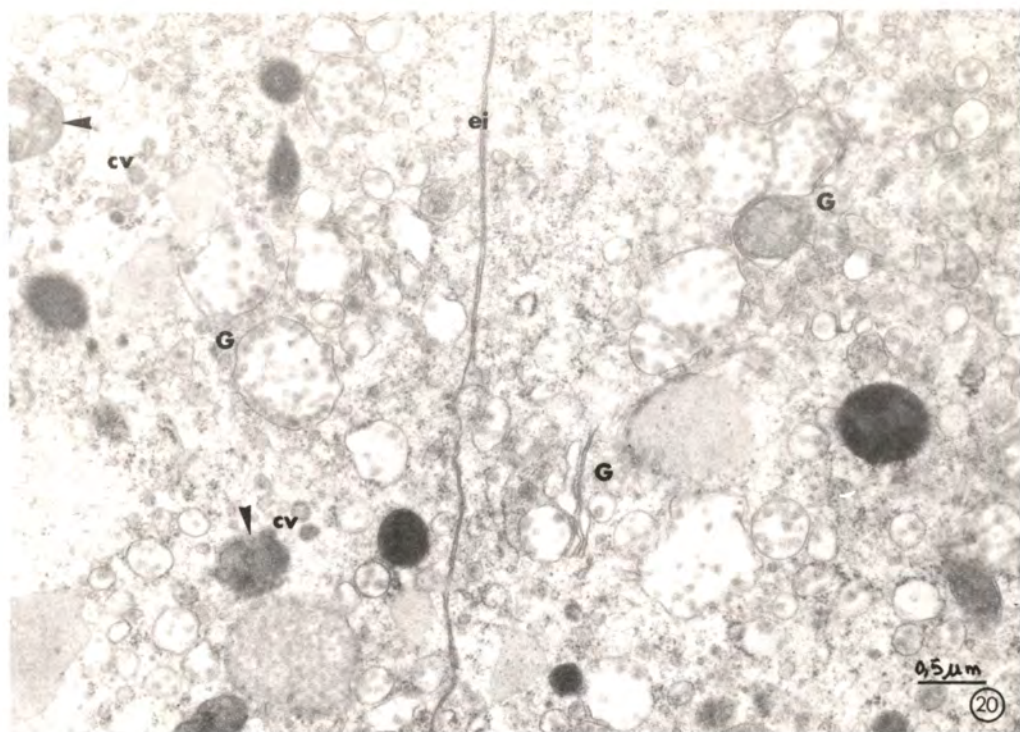


PLANCHE VIII.

Figure 20. - Régime lin, 13 heures après l'ingestion. Les images obtenues sont très comparables à celles obtenues après ingestion d'huile de raisin. Ici, les éléments des complexes golgiens (G) contiennent de nombreux granules de taille supérieure à 800 Å. Noter au voisinage immédiat de "coated vesicles" (cv) de la face de maturation d'un complexe golgien, deux vésicules contenant des granules de lipoprotéines vraisemblablement en cours de dégradation lysosomique (têtes de flèches).  
ei: espace intercellulaire.  
x 24 000.

Figures 21 et 22. Lipoprotéines plasmatiques légères, 18 heures après l'ingestion d'huile de lin.

Figure 21. - Fraction VLDL + chylomicrons. Les granules de la taille des chylomicrons (diamètre > 800 Å) sont très minoritaires (têtes de flèches).  
x 60 000.

Figure 22. - Fraction VLDL. La zone d'observation présentée ici est particulièrement riche en VLDL de grandes tailles (> 500 Å) et donc vraisemblablement d'origine intestinale.  
x 60 000.



PLANCHES IX, X et XI. Le passage par l'appareil de Golgi est-il une étape obligatoire dans la synthèse des lipoprotéines?

PLANCHE IX. Cellules intestinales au niveau de l'appareil de Golgi.

Figure 23. - Lorsque l'absorption intestinale des lipides devient importante, les saccules golgiens (G) se dilatent et forment autant de vésicules dans la lumière desquelles la densité des granules de lipoprotéines peut être considérable (d). Les dictyosomes perdent donc progressivement leur aspect "conventionnel" et leur identification devient problématique. Ici on perçoit encore pour certains éléments la disposition en saccules (têtes de flèches). GL: gouttelette lipidique libre.

x 28 000.

Figure 24. - Certaines images favorables permettent de mettre en évidence l'exocytose de vésicules de sécrétion golgiennes. Ici une vésicule golgienne dont la densité en granules du contenu est importante (d) s'ouvre directement sur l'espace intercellulaire (ei) après fusion avec la membrane plasmique latérale (tête de flèche). G: dictyosome; GL: gouttelette lipidique libre.

x 28 000.

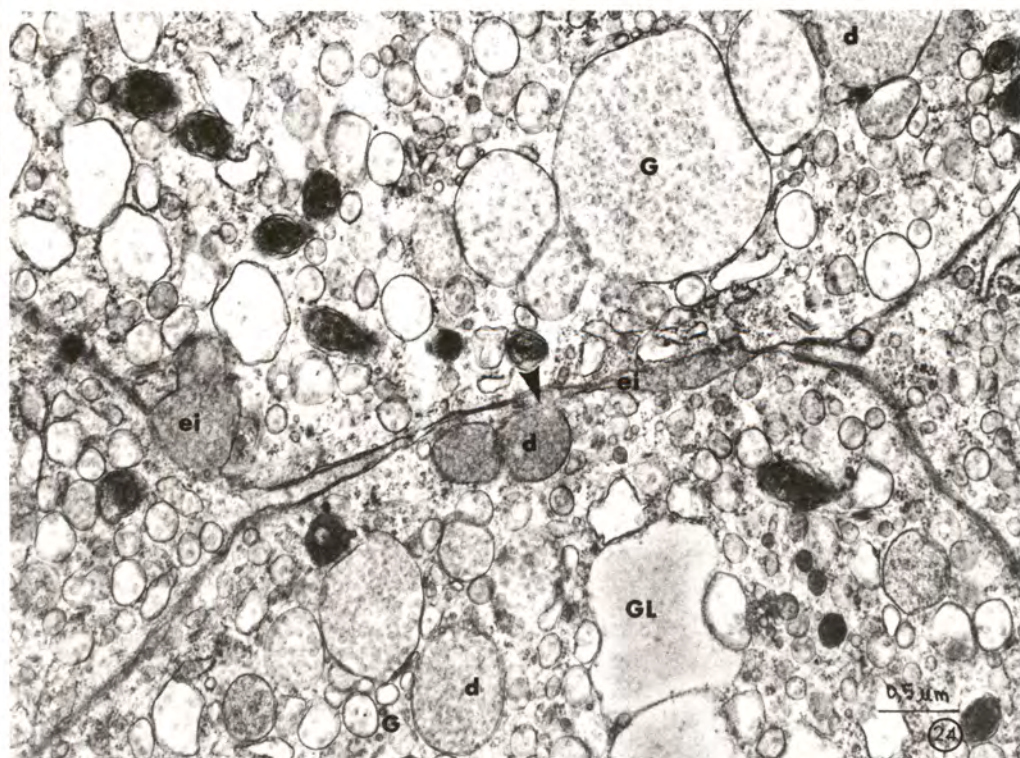
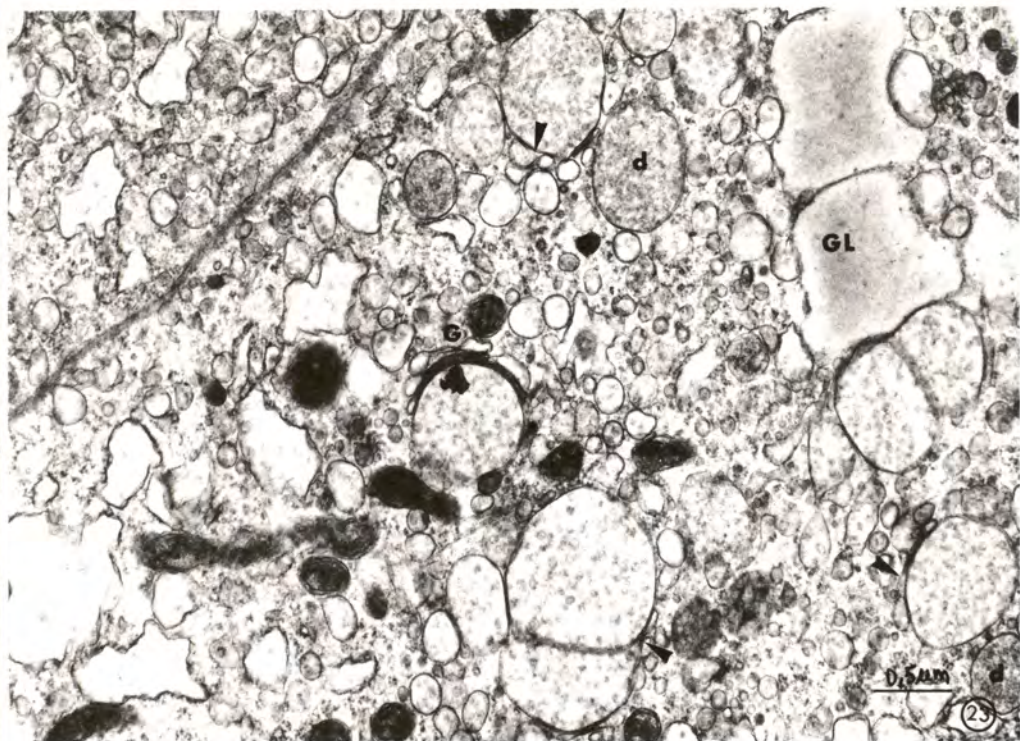




PLANCHE X.

Figure 25. - En période d'absorption, le hyaloplasme apical situé entre le "terminal web" (TW) et la zone des mitochondries (ZM) présente un réseau de réticulum endoplasmique lisse développé. De nombreux granules s'y forment (têtes de flèches). Ces granules peuvent être très généralement mis en évidence dans l'espace intercellulaire à ce niveau, c'est à dire 20 ou 30  $\mu\text{m}$  au-dessus de la zone golgienne (flèche). Noter les très nombreux microfilaments. cm: corps multivésiculaire; MV: microvillosités.

x 36 000.

Figure 26. - Le hyaloplasme infranucléaire montre un réseau réticulaire bien développé dont les éléments lisses comme granulaires contiennent des granules de lipoprotéines à disposition non-monolinéaire (têtes de flèches). Noter l'abondance des microfilaments. GL: gouttelette lipidique libre; rer: réticulum endoplasmique granulaire.

x 54 000.

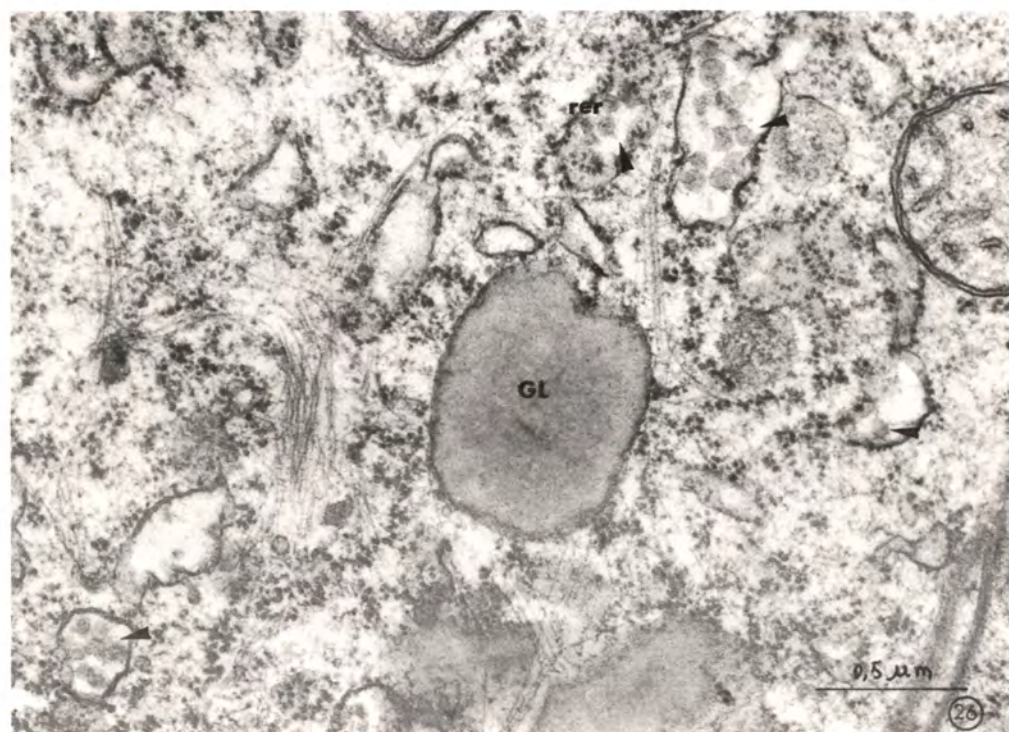
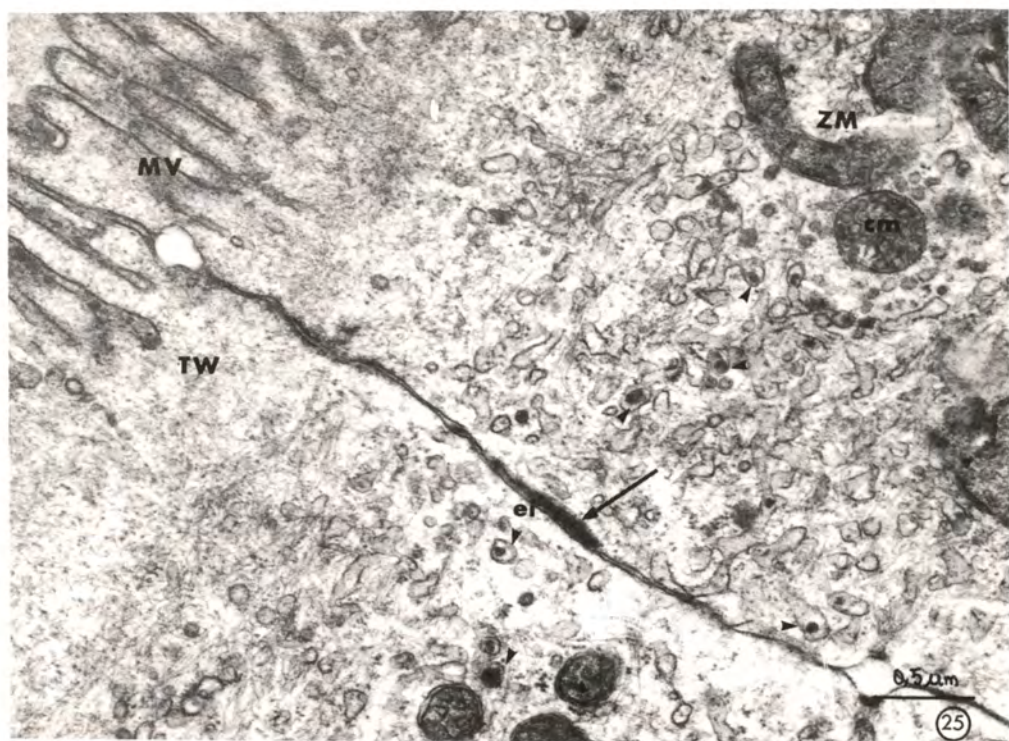




PLANCHE XI.

Figures 27 à 32. - L'étude ultrastructurale montre que les éléments du réticulum lisse comme granulaire, contenant ou non des granules de lipoprotéines peuvent s'aboucher soit directement sur la membrane plasmique latérale soit sur une structure lamellaire (flèches). Ces structures, invaginations de la membrane plasmique latérale, sont caractéristiques de l'entérocyte des Téléostéens. La vésiculation des éléments du réticulum fait que la disposition des granules n'est pas la disposition monolinéaire habituellement admise. ei: espace intercellulaire; rel: réticulum endoplasmique lisse; rer: réticulum endoplasmique rugueux; sl: structure lamellaire.

fig.27: x 32 000

fig.29: x 34 000

fig.31: x 36 000

fig.28: x 44 000

fig.30: x 36 000

fig.32: x 30 000.

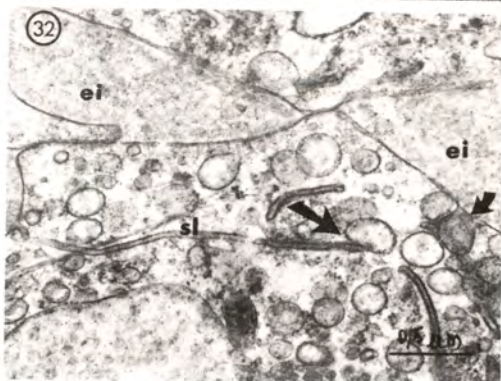
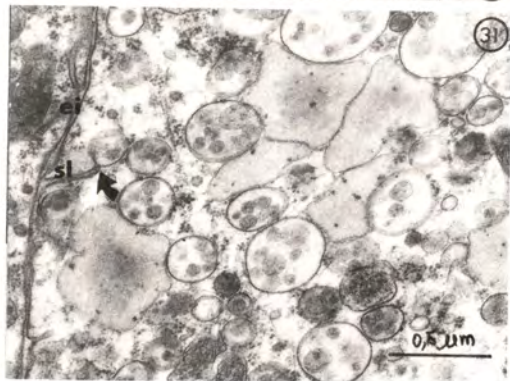
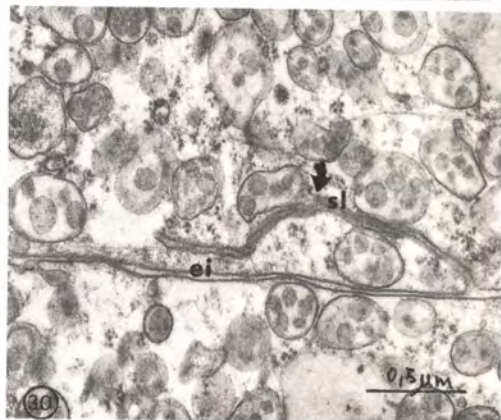
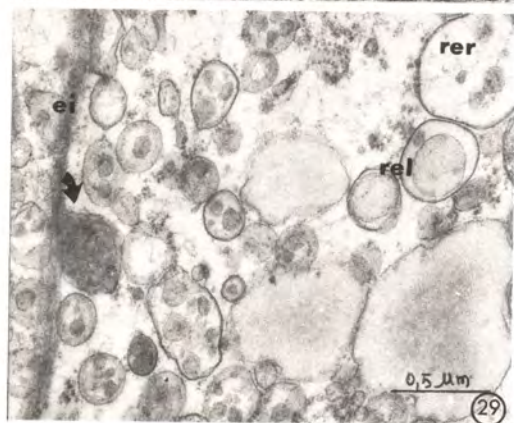
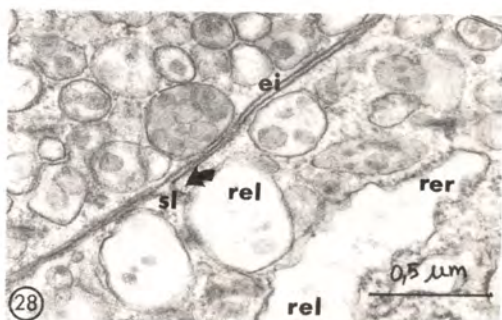
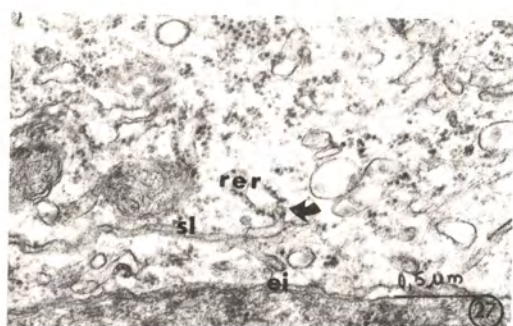




PLANCHE XII. Quelle est la voie d'exportation des lipoprotéines intestinales?

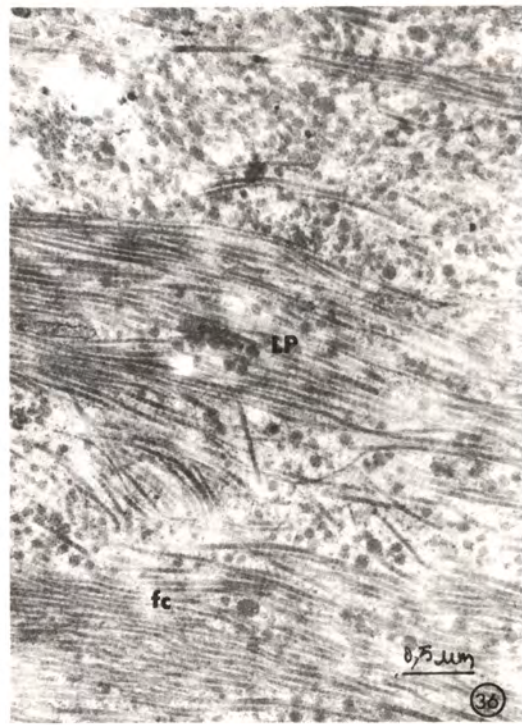
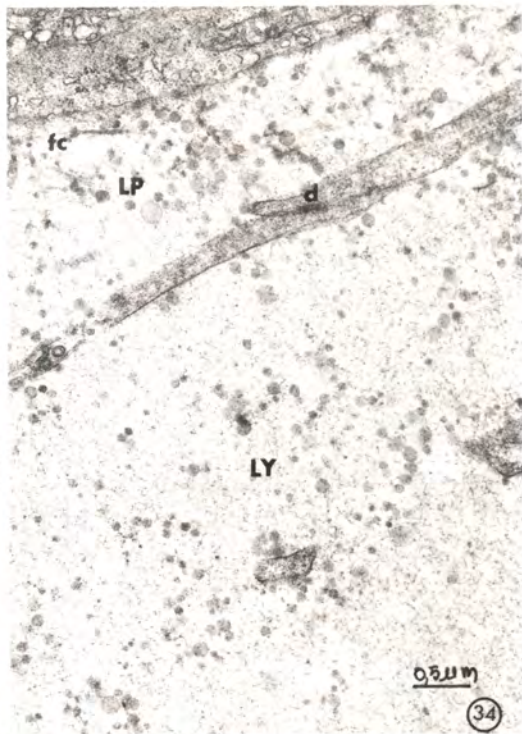
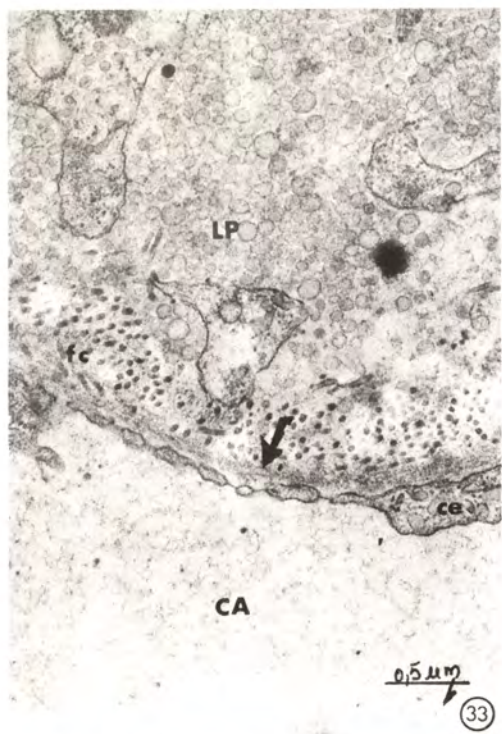
Figures 33 à 36. - Les granules de lipoprotéines qui encombrant l'espace interstitiel de la lamina propria (LP) (fig.36) ne gagnent pas la lumière des capillaires sanguins (CA) dont les cellules endothéliales (ce), fenestrées dans leurs parties amincies et doublées par une fine lame basale (flèches), présentent une intense activité pinocytotique (fig. 33 et 35). Les granules gagnent la lumière des capillaires lymphatiques (LY) dont la paroi endothéliale est très mince et non doublée par une membrane basale (fig.34). d: desmosome; fc: fibre de collagène.

fig.33: x 30 000

fig.34: x 20 000

fig.35: x 30 000

fig.36: x 24 000.





SCHEMA 1. Etapes intraentérocytaires de la synthèse des chylomicrons chez les Mammifères.

Les acides gras à chaîne courte sont transportés directement au sang portal où ils se lient à l'albumine pour constituer les acides gras "libres" plasmatiques.

Les acides gras à chaîne longue ( $\geq 14C$ ) sont toujours estérifiés et incorporés à des chylomicrons qui gagnent la lymphe. La première étape, au niveau du réticulum endoplasmique lisse consiste en une resynthèse de triacylglycérols à partir des 2-monoacylglycérols estérifiés grâce aux acides gras "activés" (Acyl-CoA). Au niveau du réticulum rugueux seraient synthétisés des glycérophospholipides par la voie du glycérol-3-phosphate et des apoprotéines spécifiques AI, AII et surtout apoprotéine B. La fusion REL-RER entraînerait la formation dans le REL de chylomicrons naissants formés d'un coeur apolaire (hachures) et d'une enveloppe polaire constituée de phospholipides, cholestérol et apoprotéines (étoiles). L'élément essentiel supportant ce point est d'ordre morphologique: les lipoprotéines n'ont jamais été décrites dans les citernes du RER. Le passage des chylomicrons naissants par l'appareil de Golgi est considéré comme une étape obligatoire. En coupes fines, les chylomicrons perdent, au niveau de l'appareil de Golgi, la disposition monolinéaire qu'ils sont censés posséder au niveau du REL. Ce critère morphologique est utilisé pour vérifier la pureté des fractions golgiennes. L'appareil de Golgi aurait deux fonctions essentielles: il serait le lieu de l'addition de la composante glucidique des lipoprotéines (glycosylation de l'apo B) et fournirait le système membranaire transporteur permettant l'exocytose dans l'espace intercellulaire.

L'obligation de l'étape golgienne repose sur des critères morphologiques liés à la polarisation structurale de l'entérocyte. Aucune figure de fusion d'éléments du réticulum, contenant ou non des chylomicrons, avec la membrane plasmique n'a pu être observée. Les chylomicrons sont toujours observés dans l'espace intercellulaire au niveau des complexes golgiens ou en dessous d'eux vers la base de la cellule, jamais dans l'espace intercellulaire au niveau du réticulum endoplasmique du cytoplasme apical. Le réticulum endoplasmique du cytoplasme infranucléaire ne renferme jamais de particules lipoprotéiques.

AG: acide gras

CS: capillaire sanguin

EI: espace intercellulaire

G: appareil de Gogli

MG: monoglycérides

PL: phospholipides

PR: protéine

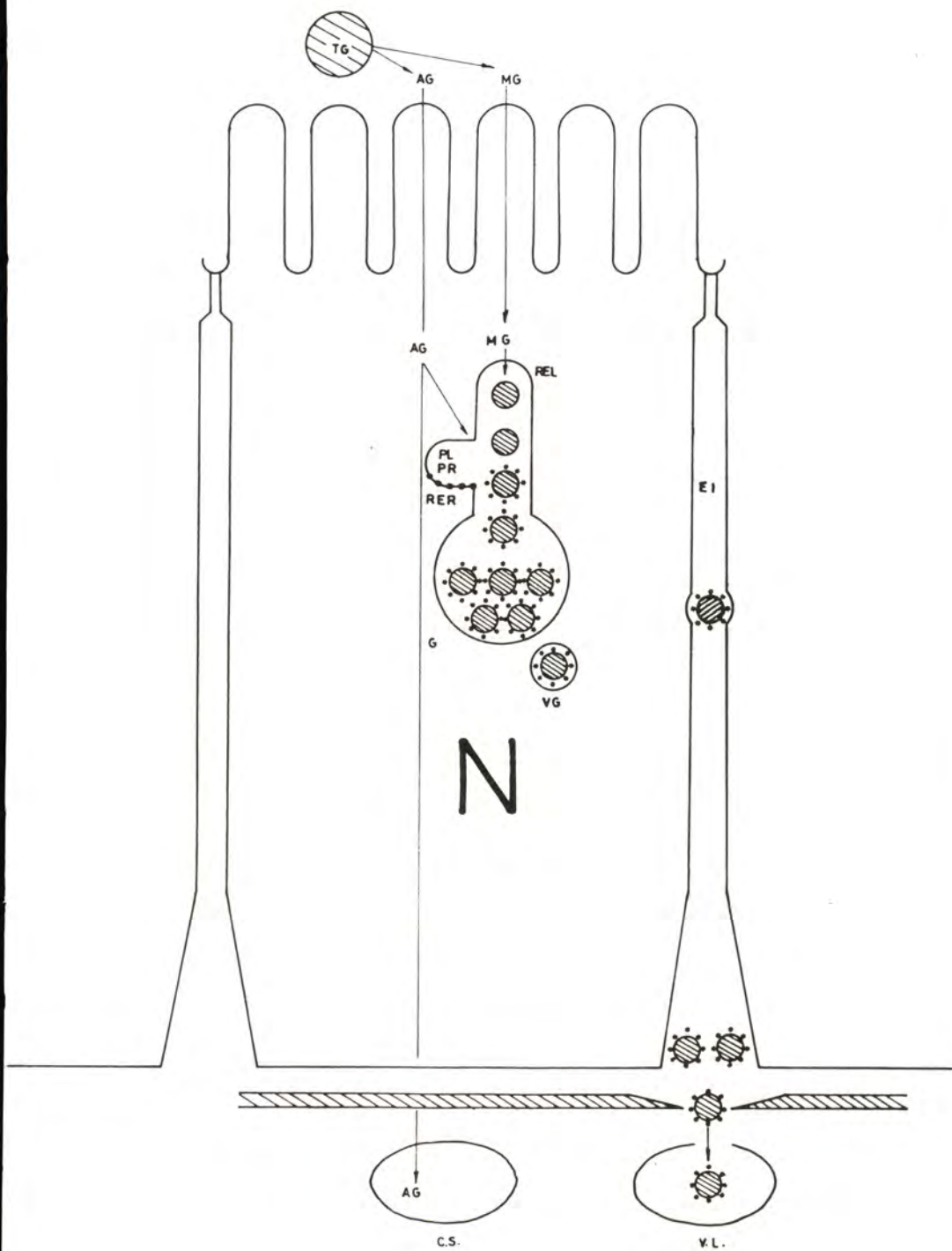
REL: réticulum endoplasmique lisse

RER: réticulum endoplasmique rugueux

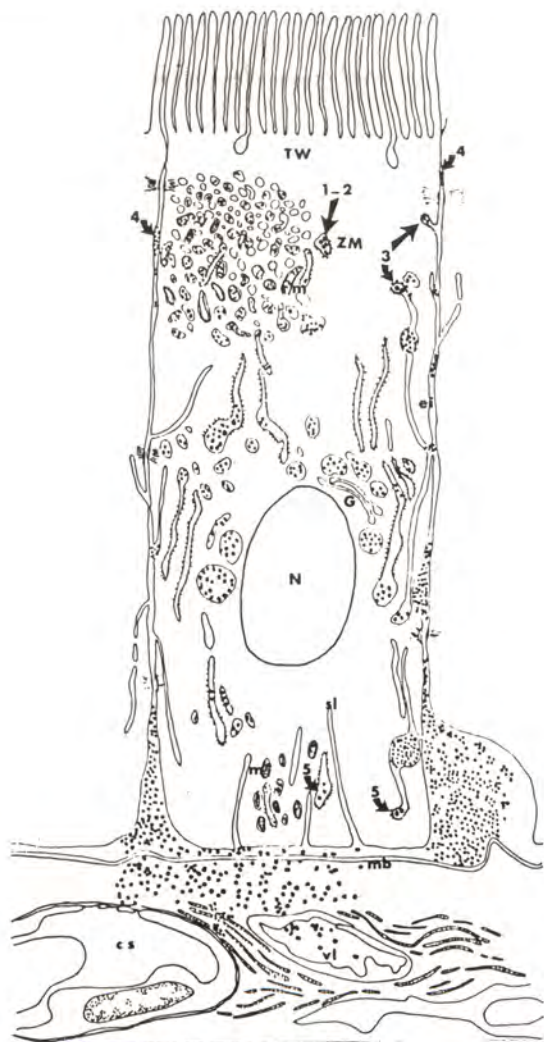
TG: triglycéride

VG: vésicule golgienne

VL: vaisseau lymphatique







SCHEMA 2. Etapes intraentérocytaires de l'absorption des lipides chez la Truite arc-en-ciel.

En régime standard, cette absorption se traduit par la synthèse de lipoprotéines de très basse densité (VLDL).

Les dimensions de la cellule (70  $\mu\text{m}$  de haut sur 7-10  $\mu\text{m}$  de large) et des éléments de la lamina propria ne sont pas respectés.

- cs: capillaire sanguin
- ei: espace intercellulaire
- G: appareil de Golgi
- m: mitochondrie
- mb: membrane basale
- N: noyau
- sl: structure lamellaire
- TW: terminal web
- vl: vaisseau lymphatique
- ZM: zone des mitochondries

ETUDE DE LA COMPOSITION CORPORELLE DE LA SOLE (Solea solea)  
AU COURS DU JEUNE : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

P. RICHARD <sup>(1)</sup>, M. DJABALI <sup>(2)</sup>, F. LAGARDERE <sup>(1)</sup>, J.-P. LAGARDERE <sup>(1)</sup>

RESUME

La composition biochimique de différents tissus a été étudiée au cours du jeûne expérimental chez la sole (Solea solea), à deux températures, 10 et 20°C. La survie est meilleure à 10°C qu'à 20°C : environ 60% des soles meurent dès la 4ème semaine de jeûne à 20°C, alors qu'à 10°C, la mort n'intervient qu'à partir de la 8ème semaine de jeûne. L'analyse corporelle globale montre qu'à 20°C les protéines sont utilisées plus rapidement qu'à 10°C, alors que l'utilisation des lipides corporels semble in affectée par la température d'adaptation des soles. Le jeûne entraîne chez ces poissons une mobilisation intense des lipides et du glycogène du foie. Cette mobilisation est d'autant plus rapide que la température est plus élevée : à 20°C, 70 % du glycogène hépatique est utilisé dès la première semaine de jeûne contre 30 % à 10°C.

ABSTRACT

The effects of starvation on Solea solea, at 10 and 20°C in sea water, were studied. At 20°C fishes start to die on week 4; at 10°C they support a longer starvation period (9 weeks). Proximate analysis shows that protein are more steadily used at 20°C than at 10°C, contrarily to the corporal lipids which are used at the same rate. Starvation results in a reduction of liver lipids and glycogen. This reduction is more pronounced at 20°C : 70 % of hepatic glycogen is used at this temperature within the first week of starvation against 30 % at 10°C.

MOTS-CLES : Solea solea, jeûne, température, réserves énergétiques.

KEY WORDS : Solea solea, starvation, temperature, energy reserves.

(1) Centre de Recherches en Ecologie marine et Aquaculture de L' Houmeau,  
ER CNRS n°256, case n°5, 17137 NIEUL-SUR-MER.

(2) Station marine d'Endoume, URA 41, rue Batterie-des-Lions, 13007 MARSEILLE.



Tab. 1. Evolutions de la perte de poids, de la teneur en eau, du RHS et du RVS (en % du poids frais) au cours du jeûne chez *Solea solea*, à 10°C (Tab. 1 a) et 20°C (Tab. 1 b). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard.

Tab. 1 a : 10°C.

Semaines de jeûne	0	1	2	4	5	7	9
Nombre d'échantillons	6	6	10	10	10	6	4
Perte de poids	0	2,71 $\pm$ 0,67	4,10 $\pm$ 0,17	8,59 $\pm$ 0,83	10,75 $\pm$ 0,61	13,15 $\pm$ 0,93	17,62 $\pm$ 1,12
Teneur en eau	79,00 $\pm$ 0,72	80,43 $\pm$ 0,49	79,86 $\pm$ 0,47	80,29 $\pm$ 0,44	80,36 $\pm$ 0,46	80,22 $\pm$ 0,46	80,85 $\pm$ 0,69
RHS	1,60 $\pm$ 0,15	1,11 $\pm$ 0,13	0,84 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,05
RVS	3,47 $\pm$ 0,31	2,54 $\pm$ 0,12	2,44 $\pm$ 0,17	2,27 $\pm$ 0,11	2,03 $\pm$ 0,11	2,17 $\pm$ 0,16	2,99 $\pm$ 0,13

Tab. 1 b : 20°C.

Semaines de jeûne	0	1	2	3	4
Nombre d'échantillons	5	6	5	9	2
Perte de poids	0	8,60 $\pm$ 1,61	10,35 $\pm$ 0,91	13,35 $\pm$ 1,22	20,00
Teneur en eau	76,86 $\pm$ 0,98	80,19 $\pm$ 1,12	78,83 $\pm$ 1,39	80,41 $\pm$ 0,72	82,17
RHS	1,21 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,04	0,46
RVS	3,35 $\pm$ 0,27	2,45 $\pm$ 0,18	2,56 $\pm$ 0,23	2,24 $\pm$ 0,14	2,20

## INTRODUCTION

Les modifications de la composition biochimique en fonction des saisons, de l'état nutritionnel et du jeûne ont été étudiées chez de nombreuses espèces de poissons (Love, 1970). Au cours du jeûne, l'utilisation des réserves énergétiques semble différente selon les espèces étudiées. Ainsi certains poissons utilisent préférentiellement les protéines musculaires comme source d'énergie (Stimpson, 1965; Butler, 1967; Murat, 1976), le glycogène hépatique étant maintenu par la néoglycogénèse. Par contre, d'autres poissons conservent les protéines musculaires aux dépens des réserves lipidiques et glycogéniques (Wilkins, 1967; Ince et Thorpe, 1976; Woo et Fung, 1981). Cependant, la stratégie métabolique utilisée peut varier en fonction de l'état physiologique des poissons, notamment en période de reproduction (Stirling, 1972), mais aussi en fonction des facteurs abiotiques du milieu (Sakamoto *et al.*, 1978; Woo et Murat, 1981).

Nous avons donc entrepris l'étude de l'effet de la température sur les modifications de la composition biochimique des tissus de la sole (*Solea solea*) au cours du jeûne provoqué.

## MATERIEL ET METHODES

Les soles (*Solea solea*) de poids variant entre 8 et 30 g, proviennent de la région de La Rochelle. A leur arrivée au laboratoire, les poissons sont maintenus à la température de l'eau de mer ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant trois semaines dans un bassin de 4 m<sup>3</sup> et nourris *ad libitum* sur aliment frais (*Nereis diversicolor*). Les animaux sont ensuite séparés en 4 groupes et transférés dans des bacs de 45 litres dont la température est régulée. Ils sont alors progressivement adaptés à la température d'expérience (10 ou 20°C) à raison d'un changement de température d'un degré par jour. Durant cette période, les animaux sont régulièrement nourris avec le même aliment frais. Le début de la période de jeûne commence trois semaines après cette adaptation aux deux températures pour deux groupes de poissons. Les deux autres groupes sont nourris à leur température d'adaptation (10 ou 20°C) durant toute l'expérience et constituent les lots témoins.

Toutes les semaines, des poissons des 4 lots sont prélevés, pesés et mesurés. Le foie et le tube digestif sont prélevés et pesés, ce qui permet de calculer les rapports hépatosomatiques (RHS) et viscérosomatiques (RVS). Les échantillons d'organes et les carcasses sont lyophilisés, leur teneur en eau est alors évaluée. Après broyage, les échantillons sont divisés en parties aliquotes sur lesquelles sont déterminées les teneurs en lipides (selon Bligh et Dyer, 1959), en azote et cendres (selon Alliot *et al.*, 1979). Le glycogène hépatique est dosé selon la méthode de Roe et Dailey (1966), chaque échantillon étant traité en double.

Les différences statistiques entre les poissons témoins et les poissons soumis au jeûne sont calculées par le test-t de Student. Cependant, si l'homogénéité des variances entre les deux groupes de poissons n'est pas réalisée, l'approximation de Cochran du test-t est utilisée (Cochran, 1964).

## RESULTATS ET DISCUSSION

A la température de 10°C, les animaux perdent régulièrement du poids. Cette perte de poids représente neuf semaines après le début du jeûne 17,6 % du poids initial. A 20°C, elle est plus rapide et atteint 20 % du poids seulement 4 semaines après le début de jeûne. A cette température, le RHS et le RVS déclinent rapidement et sont toujours inférieurs à ceux des poissons adaptés à 10°C et prélevés les mêmes jours (Tab. 1).

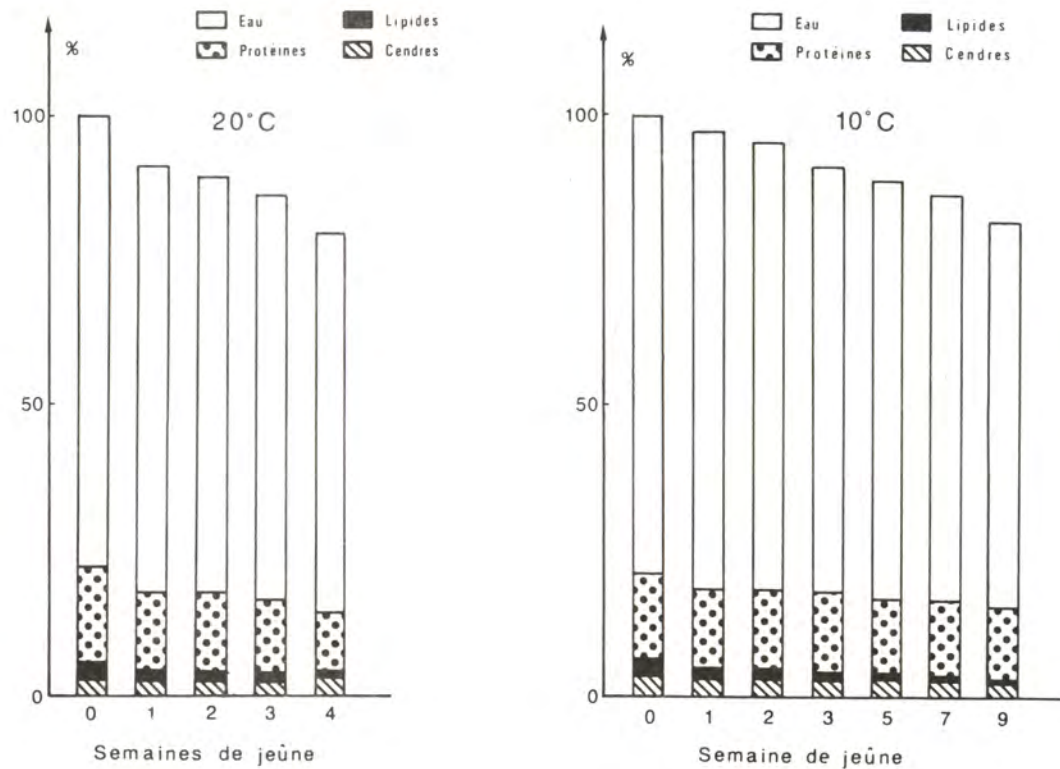


Fig. 1. Modifications de la composition corporelle globale chez la sole Solea solea au cours du jeûne, à 20°C et 10°C.



La température semble jouer un rôle important dans la capacité des animaux à supporter un jeûne prolongé. Ainsi Woo et Fung (1981) ont montré que la daurade *Chrysophrys major* adaptée à 13°C et 30 % supportait une longue période de jeûne (160 jours) alors qu'à 20°C cette période est réduite à 19 jours (Woo et Murat, 1981).

#### - Evolution de la composition corporelle globale

Chez les deux groupes d'animaux, la teneur en eau augmente au cours du jeûne. Cette augmentation est plus importante chez les poissons adaptés à 20°C ( $P < 0,001$  la première semaine) et est associée à une diminution significative du pourcentage de protéines et de lipides totaux. Cependant la diminution des protéines est plus importante ( $P < 0,001$ ) et intervient dès la première semaine de jeûne chez les animaux adaptés à 20°C alors qu'à 10°C il n'y a une utilisation significative des protéines qu'à partir de la 4ème semaine de jeûne (Fig. 1).

L'augmentation de la teneur en eau des tissus est un phénomène classique observé chez les poissons au cours du jeûne (Phillips *et al.*, 1966; Brett *et al.*, 1969).

Les teneurs en protéines globales diminuent au cours du jeûne, cependant l'utilisation des protéines est plus constante à la température de 20°C qu'à 10°C. Les protéines représentent donc une source d'énergie importante pour la sole comme pour de nombreuses autres espèces de poissons (Inui et Ohshima, 1966; Larsson et Lewander, 1973; Storer, 1967; Creach et Serfaty, 1965; Alliot *et al.*, 1983). Cette aptitude à mobiliser les protéines comme source d'énergie est, chez la sole, facilitée si la température est élevée. Par contre, il ne semble pas y avoir de différence dans la vitesse d'utilisation des lipides corporels, que les soles soient adaptées à 10°C ou 20°C. Chez la plie adaptée à 10°C, Jobling (1980) montre que les lipides représentent la part la plus importante des réserves utilisées au cours du jeûne et que les protéines n'interviennent que dans les stades ultimes de la période de jeûne.

#### - Evolution des lipides et du glycogène hépatique

A 20°C, les lipides hépatiques de la sole subissent une diminution importante et très significative et ceci dès la première semaine de jeûne ( $P < 0,001$ ). La vitesse d'utilisation des lipides hépatiques des soles adaptées à 10°C est plus lente; à cette température, les concentrations atteintes sont toujours plus élevées que celles des soles adaptées à 20°C (à 4 semaines de jeûne  $P < 0,05$ ; Fig. 2). Les réserves lipidiques hépatiques sont donc rapidement utilisées, et cette utilisation est d'autant plus intense que la température est plus élevée. Stirling (1976) constate également chez le loup que les modifications des lipides sont plus prononcées au cours du jeûne dans le foie que dans le muscle. Robinson et Mead (1973) ont montré chez la truite que les réserves lipidiques étaient surtout localisées au niveau du muscle et qu'au cours du jeûne seules ces réserves étaient utilisées. Ces auteurs ont considéré que ce fait était caractéristique des poissons actifs alors que chez les poissons vivant sur le fond et moins actifs, le foie est le principal lieu de stockage des lipides. Ces résultats ne correspondent pas à ceux trouvés chez le loup (Stirling, 1976; Alliot *et al.*, 1983) où lipides musculaires et hépatiques participent tous deux à la couverture des besoins énergétiques au cours du jeûne expérimental. Chez la sole, la contribution à ces besoins des lipides musculaires est aussi importante que celle des lipides hépatiques, la plus grande masse de tissu compensant la plus faible diminution en concentration.

A 10°C, chez les soles nourries, le pourcentage de glycogène hépatique est significativement plus bas que celui des soles nourries à 20°C ( $P < 0,001$ ; Fig. 3). Au cours du jeûne et pour les deux températures, le glycogène est très rapidement mobilisé. A 20°C; les soles utilisent environ 60 % du glycogène hépa-

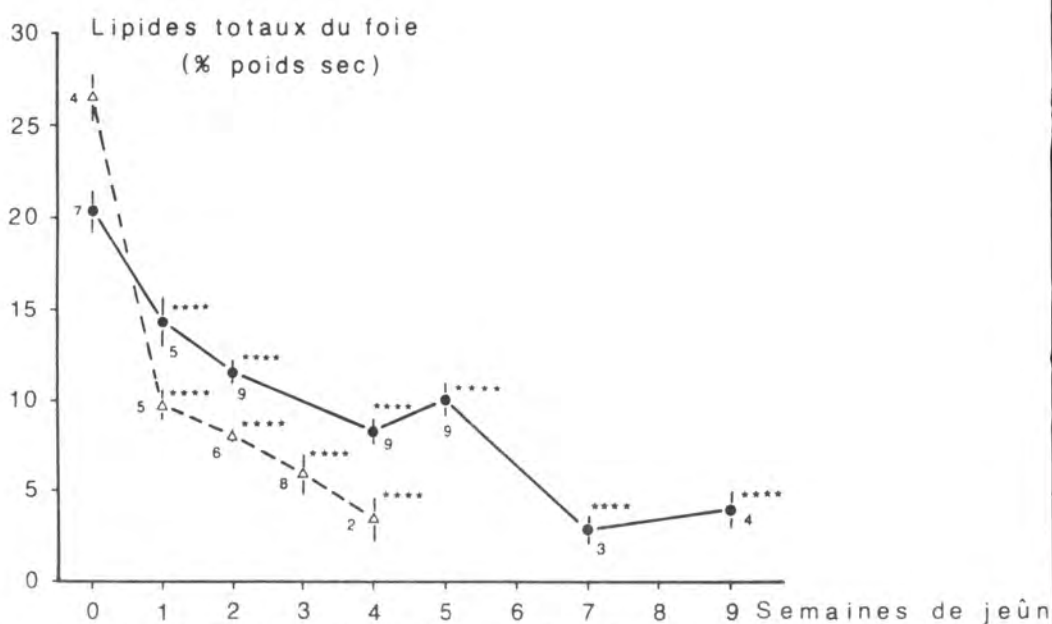


Fig. 2. Evolutions des lipides totaux du foie chez la sole au cours du jeûne à 10°C (●) et 20°C (Δ). Le nombre de poissons analysés est indiqué sur la figure.

( \*\*\*\* :  $P < 0,001$  : comparaisons par rapport aux animaux témoins)

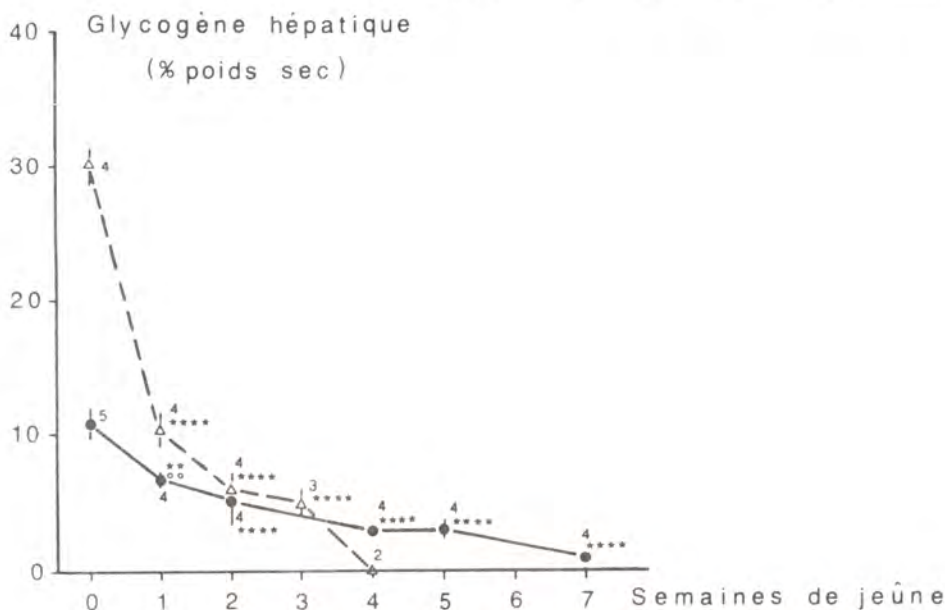


Fig. 3. Evolutions du glycogène hépatique au cours du jeûne chez la sole à 10°C (●) et 20°C (Δ). Le nombre de poissons analysés est indiqué sur la figure.

( \*\* :  $P < 0,02$ ; \*\*\*\* :  $P < 0,001$  : comparaisons par rapport aux animaux témoins; \*\* :  $P < 0,02$  : comparaison entre 10°C et 20°C les mêmes jours).



tique au cours de la première semaine de jeûne et, 4 semaines après le début du jeûne, la totalité du glycogène a été utilisé. A 10°C, cette utilisation est moins rapide : 9 semaines après le début du jeûne, la teneur en glycogène du foie est encore voisine de 1 % du poids sec.

La température influence donc fortement chez la sole la vitesse d'utilisation du glycogène hépatique. Nos résultats sont à comparer avec ceux obtenus chez le loup adapté à 19°C (Alliot et al., 1983) : 70 % du glycogène hépatique est utilisé dès la première semaine chez cette espèce; cependant, après 21 jours de jeûne, l'utilisation du glycogène est ralentie. De même, Vallet (1970) observe une nette diminution du glycogène hépatique dans les 4 premiers jours de jeûne chez Mugil sp., et, si le jeûne se prolonge au delà de 20 jours, l'utilisation du glycogène est restreinte. Par contre, Love (1970), chez la morue, Stimpson (1965) chez la daurade, et Larsson et Lewander (1973) chez l'anguille constatent une utilisation du glycogène hépatique seulement au cours des étapes ultimes du jeûne. Toutefois, comme le remarquent Brett et al. (1969), les carbohydrates ne représentent qu'un très faible pourcentage du poids du corps et ne sauraient jouer un rôle prédominant dans la couverture des besoins énergétiques; il faut cependant remarquer chez la sole que la mort intervient aussi bien à 10°C qu'à 20°C lorsque les réserves en glycogène hépatique sont épuisées. Ainsi comme le soulignent Woo et Fung (1981), la résistance au jeûne paraît conditionnée en partie par la capacité des poissons à maintenir leurs réserves glycogéniques.

---

Alliot E., DJABALI M., PASTOUREAUD A., THEBAULT H., 1983 - Changes in the biochemical composition of tissues in juvenile sea bass during forced starvation. Biochem. Syst. Ecol., sous presse.

Alliot E., PASTOUREAUD A., NEDELEC J., 1979 - Etude de l'apport calorique et du rapport calorico-azoté dans l'alimentation du bar (Dicentrarchus labrax). Influence sur la croissance et la composition corporelle. Proc. World Symp. on finfish nutrition and finfish technology, Vol. 1, Berlin 1979 : p. 242-248.

Blight E.G. et Dyer W.J., 1959 - A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem., 37, p. 911-917.

Brett J.R., Shelbourne J.E., Shoop C.I., 1969 - Growth rate and composition of fingerlings of sockeye salmon (Oncorhynchus nerka), in relation to temperature and ration size. J. Fish. Res. Bd Canada, 26, p. 2363-2394.

Butler D.T., 1968 - Control of gluconeogenesis in the North American eel. Gen. Comp. Endocr., 10, p. 85-91.

Cochran W.G., 1964. - Approximate significance levels of the Behrens-Fisher test. Biometrics, 20, p. 191-195.

Creach Y. et Serfaty A., 1965 - La protéolyse chez la carpe commune (Cyprinus carpio) au cours du jeûne : importance et localisation. C.R. Soc. Biol., 159, p. 483-486.

Ince B.W. et Thorpe A., 1976 - Effects of starvation and forcefeeding on metabolism of the Northern pike. J. Fish Biol., 8, p. 79-88.



- Inui Y. et Oshima Y., 1966 - Effect of starvation on metabolism and chemical composition of eels. Bull. Jap. Soc. sci. Fish., 32, p. 492-501.
- Jobling M., 1980 - Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilisation of plaice, Pleuronectes platessa L.. J. Fish Biol., 17, p. 325-334.
- Larsson A. et Lewander K., 1973 - Metabolic effect of starvation in the eel (Anguilla anguilla L.). Comp. Biochem. Physiol., 44 A, p. 367-374.
- Love R.M., 1970 - The chemical biology of fishes. New York, Academic Press, 547 p.
- Murat J.C., 1976 - Recherches sur la mobilisation des glucides tissulaires chez la carpe. Thèse Doct. Sc., Toulouse, France.
- Phillips A.M., Livingstone D.L., Poston H.A., 1966 - The effects of changes in protein quality, calorie source and calorie levels on the growth and composition of brook trout. Fish. Res. Bull. New York, 29, p. 6-7.
- Robinson J.S. et Mead J.F., 1973 - Lipid absorption and deposition in rainbow trout (Salmo gairdneri). Can. J. Biochem., 51, p. 1050-1058.
- Roe J.H. et Dailey R.E., 1966 - Analyt. Biochem., 15, p. 245.
- Sakamoto S., Furuhui M., Yone Y., 1978 - Effects of starvation on organ weight and chemical components of red sea bream. J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 23, p. 71-77.
- Stimpson S.H., 1965 - Comparative aspects of the control of glycogen utilization in vertebrate liver. Comp. Biochem. Physiol., 15, p. 187-197.
- Stirling H.P., 1976 - Effects of experimental feeding and starvation on the proximate composition of the European sea-bass, Dicentrarchus labrax L.. Mar. Biol., 34 (II), p. 85-91.
- Storer J.H., 1967 - Starvation and the effects of cortisol in the goldfish Carassius auratus. Comp. Biochem. Physiol., 20, p. 85-91.
- Vallet F., 1970 - Alimentation artificielle et élevage de Mugil sp. et de Morone labrax. Thèse Doct. 3ème cycle, Marseille, France.
- Wilkins N.P., 1967 - Starvation of the herring, Clupea harengus L. : survival and some gross biochemical changes. Comp. Biochem. Physiol., 23, p. 503-518.
- Woo N.Y.S. et Fung A.C.Y., 1981 - Studies on the biology of the red sea bream, Chrysophrys major. I. Temperature tolerance. Mar. Ecol. Progr. Ser., 3, p. 121-124.
- Woo N.Y.S. et Murat J.C., 1981 - Studies on the biology of the red sea bream, Chrysophrys major. III. Metabolic response to starvation in different salinities. Mar. Biol., 61, p. 255-260.

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA RECEPTIVITE DU BAR (*Dicentrarchus labrax*)  
ET DU TURBOT (*Scophthalmus maximus*)  
AUX INFECTIONS VIRALES COMMUNES EN SALMONICULTURE

J. CASTRIC (1) et P. de KINKELIN (2)

R E S U M E

La sensibilité du Bar à un virus N.P.I. (sérotype Sp) et deux virus S.H.V. (SHV1 et 23/75) et celle du Turbot au virus SHV1 ont été testées expérimentalement. Le virus NPI n'a provoqué aucune mortalité significative chez des Bars de 2 g. En dessous de 15° C, les deux espèces se sont révélées très sensibles aux virus SHV par inoculation comme par balnéation. L'injection de doses infectieuses élevées entraîne des mortalités supérieures à 90 %. Les pertes peuvent atteindre 50 % de l'effectif dans les lots contaminés par voie naturelle. A 20° C, aucun pouvoir pathogène des virus utilisés n'a été démontré. Les individus malades présentent les symptômes et lésions classiques de la SHV ; des concentrations élevées de virus sont retrouvées dans leurs organes. La présence d'anticorps anti-SHV a été détectée dans le sérum des Bars rescapés.

A B S T R A C T

The susceptibility of Sea-bass to an I.P.N. virus (Sp serotype) and to V.H.S. viruses (VHSV1 and 23/75) and those of Turbot to VHSV1 were experimentally studied. IPNV was not found pathogenic for young Sea-bass. Below 15° C the two species were readily infected with VHSV by injection or by the natural way of transmission. High infectious doses resulted in more than 90 % of mortality in injected fish. The losses could reach 50 % in the water route contaminated lots. No pathogenic effect was evidenced at 20° C. Diseased fish displayed the classical features of VHS and high virus yields were recovered from their organs. The presence of anti-VHSV neutralizing antibodies was evidenced in the sera of the sea-bass that overcome the infection.

M O T S - C L E S : Bar - Turbot - Virus - NPI - SHV - Anticorps

K E Y W O R D S : Seabass - Turbot - Virus - IPN - VHS - Antibodies

(1) Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Laboratoire National de Pathologie des Animaux Aquatiques, COB, BP 337, 29273 BREST Cedex.

(2) Laboratoire d'Ichtyopathologie, Groupe de laboratoires de pathologie animale, INRA, Route de Thiverval, 78850 THIVERVAL-GRIGNON.



## INTRODUCTION

Le programme actuel de développement de l'aquaculture, en France, privilégie certaines espèces de valeur économique élevée telles que le Bar, le Turbot, la Sole (*Solea solea*) et la Daurade (*Sparus auratus*) (CNEXO, 1978). La majorité des élevages de poissons marins en est encore au stade expérimental ; il n'est cependant pas impossible que, dans un avenir assez proche, cette nouvelle production voit son tonnage augmenter, notamment quand auront été résolus les divers points de blocage, biologiques ou technologiques, auxquels sont confrontés les éleveurs. Ces élevages marins pourraient se développer à proximité des côtes où sont déjà implantées des cages de Salmonidés élevés en mer et dans des estuaires recevant les effluents de piscicultures d'eau douce. L'éventualité d'une contamination de ces espèces marines par les agents pathogènes rencontrés en salmoniculture ne peut donc être exclue. C'est pourquoi un travail expérimental a été entrepris afin d'étudier la sensibilité de deux espèces marines, le Bar et le Turbot, aux virus pathogènes les plus couramment rencontrés en salmoniculture : les virus de la septicémie hémorragique virale (S.H.V.) et de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (N.P.I.).

## MATERIEL ET METHODES

### CULTURES CELLULAIRES

Les lignées cellulaires E.P.C., *Epithelioma papulosum cyprini* (FIJAN et al., 1983) et RTG2, Rainbow Trout Gonad (WOLF & QUIMBY, 1962) ont été multipliées à 29° C (EPC) ou 20° C (RTG2) dans du milieu de Eagle modifié Stoker, tamponné à pH 7,4 par du Tris-HCl et supplémenté par : 10 % de bouillon tryptose-phosphate, 10 % de sérum de veau foetal, 100 U.I. de Pénicilline et 0,1 mg de Streptomycine par ml. Pour la production virale et le diagnostic, le pourcentage de sérum est ramené à 2 % et les cellules incubées à 14° C.

### VIRUS

Les sérotypes 1 (souche 07/71) et 23/75 (LE BERRE et al., 1977) du virus de la S.H.V. ont été inoculés à des truitelles arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*, puis isolés et clonés sur cellules E.P.C. Les stocks de virus ont été produits à partir de ces clones selon la méthode précédemment décrite (de KINKELIN et CASTRIC, 1982). Le virus de la NPI (souche G45) appartient au sérotype Sp (VESTERGARD-JORGENSEN & KEHLET, 1971) et a été isolé sur cellules RTG2 au cours d'une épizootie affectant des alevins de truite arc-en-ciel. Tous les virus avaient subi 4 passages en cultures cellulaires avant leur utilisation pour infection expérimentale.

Le titrage des virus a été réalisé à 14° C selon la méthode des plages sous milieu agarosé à 0,5 % (de KINKELIN & SCHERRER, 1970). Le diagnostic virologique était effectué à partir de broyats de rein, rate ou cerveau dilués au 1/10 dans une solution saline de Earle contenant 200 U.I. de Pénicilline et 0,2 mg de Streptomycine par ml. Après centrifugation, à 4° C, pendant 15 mn à 2000 g, 100 µl des surnageants dilués sont inoculés sur cellules de 48 h cultivées dans des plaques à 24 cupules, à raison de 2 cupules/dilution.

### HISTOLOGIE

Les organes prélevés sur poissons témoins ou malades ont été fixés dans une solution de Bouin puis coupés et colorés selon les techniques habituelles.



## TESTS DE SERONEUTRALISATION :

Les bars réscapés de l'infection par les virus SHV ont été saignés individuellement par section du pédoncule caudal. Le sérum, récupéré après centrifugation à 4 000 g pendant 15 mn, est décomplémenté durant 30 mn à 45° C avant d'être congelé à -20° C. La présence d'anticorps neutralisants, anti-SHV, a été détectée selon la méthode de CASALS (1967) en mélangeant à volume égal sérum dilué et suspension virale contenant 2000 unités formant plaque (u.f.p.) / ml. La réaction est réalisée à 14° C pendant 1 h en présence de complément de truite à une dilution finale de 1/40 (DORSON et TORCHY, 1979). Au bout de ce temps, 100 µl sont inoculés sur cellules EPC en boîtes de Petri (35 mm de diamètre). Les résultats sont lus 3 jours plus tard après fixation des cellules par le formol et coloration au cristal violet à 1 %.

## INFECTIONS EXPERIMENTALES :

### Conditions générales

L'absence de virus dans les stocks de poissons expérimentaux a été vérifiée avant chaque essai par contrôle d'un pool d'organes prélevés sur 5 individus. Les poissons sont distribués au hasard dans des bacs en plastique de 12 ou 50 litres. Avant inoculation par voie intrapéritonéale (i.p.), les poissons sont anesthésiés à l'aide de 200 mg/ml de 2-phénoxy-éthanol. La contamination par bain est réalisée en ramenant le volume des aquariums à 2 ou 10 litres, la suspension virale est alors ajoutée à ce volume et une aération suffisante assurée aux poissons pendant toute la durée du bain. Au bout de 3 h, la circulation d'eau est rétablie. A chacun des essais correspond un lot témoin dans lequel la préparation virale est remplacée par un volume égal de surnageant de culture cellulaire non infectieux. Les poissons sont nourris à l'aide d'un granulé réhydratable (AQUALIM). Les morts sont répertoriés chaque jour et congelés à -20° C en attendant d'être analysés. La température de l'eau de mer était thermorégulée avec une précision de  $\pm 1^\circ$  C et tous les bacs placés en circuit ouvert.

### Bar :

1er essai : réalisé en parallèle à 12° 5 et 20° C sur des lots de 4 x 25 poissons âgés de 3 à 4 mois, (poids moyen : 2 g). Dans une première série de bacs, chaque poisson a reçu  $4.10^5$  ufp de virus SHV1 ou  $5.10^5$  de virus N.P.I. par voie i.p. ; dans la deuxième série, les poissons sont contaminés par bain dans une eau titrant  $4.10^5$  ufp de virus SHV1/ml ou  $2.10^5$  ufp de virus NPI/ml.

2è essai : effectué sur des bars d'un an (poids moyen 12 g) répartis par 30 dans des bacs de 50 l. Dans un premier groupe, à 14° C, chaque poisson a été inoculé par  $2.10^7$  ufp de virus<sub>07/71</sub> ou 23/75. Dans un deuxième groupe, à 12° C, la dose inoculée était de  $1.10^5$  ufp de 07/71 ou  $2.10^5$  ufp de 23/75. Et dans un troisième groupe, à 12° C, les poissons ont été contaminés dans un bain infectieux de  $2.10^5$  ufp de 07/71 ou  $5.10^5$  ufp de 23/75 par ml.

### Turbot :

Seul le pouvoir pathogène du virus 07/71 a pu être testé sur cette espèce.

1er essai : réalisé à 12°5 C sur des poissons âgés de 5 à 7 mois (poids moyen 6,5 g) répartis à raison de 25 individus / bac de 12 l. 5 doses infectieuses ont été inoculées respectivement aux poissons de 5 bacs :  $1.10^8$  ;  $1.10^5$  ;  $1.10^4$  ;  $1.10^2$  et 10 ufp/poisson. Dans un 6è bassin, les turbots ont été contaminés par voie balnéatoire dans une eau contenant  $4.10^5$  ufp de virus / ml.

Jours apres infection	12 <sup>o</sup> 5 c		20 <sup>o</sup> c	
	i p	bain	i p	bain
+ 3	5 / 5	3 / 5	5 / 5	/
+ 8	5 "	1 "	5 "	
+ 23	5 "	1 "	5 "	
+ 36	3 "	2 "	2 "	
+ 42	1 / 1	1 "	1 "	

**TABLEAU 1 : NOMBRE DE BARS VIRUS<sup>⊕</sup>, EN FONCTION DU TEMPS, APRES**

**INFECTION EXPERIMENTALE PAR UN VIRUS DE LA NPI (SOUCHE G45)**

sérum dilution initiale	07/71			23/75		
	1.10 <sup>5</sup> ufp i.p.	2.10 <sup>5</sup> ufp/ml bain	témoins	2.10 <sup>5</sup> ufp ip	5.10 <sup>5</sup> ufp/ml bain	témoins
1/20	48 62 32 54	76 92 98 48 67 8 12	0 0	32 8 46 8 24 28 8	35 62 30 48 0 62	0 0
1/50	39 43 0 23	49 75 78 27 67 0 0	0 0	19 0 37 0 22 0 0	41 57 18 38 0 65	0 0

**TABLEAU 2 : TAUX D'ANTICORPS NEUTRALISANTS CHEZ DES BARS D'1 AN, RESCAPES D'UNE INFECTION EXPERIMENTALE PAR 2**

**SEROTYPES DE VIRUS SHV. POISSONS MAINTENUS A 12<sup>o</sup>C, SAIGNES 74 JOURS APRES INFECTION.**

**RESULTATS EXPRIMES EN % DE NEUTRALISATION DU VIRUS HOMOLOGUE.**



2<sup>e</sup> essai : à 20° C sur des lots identiques aux précédents. Les poissons d'un bac ont reçu  $1.10^4$  ufp par voie i.p., ceux d'un deuxième bac sont contaminés dans un bain infectieux ( $4.10^5$  ufp/ml).

3<sup>e</sup> essai : effectué sur un lot de Turbots hétérogène : le poids des individus variant de 11 à 50 g (poids moyen : 28 g). Après avoir reçu  $6.10^7$  ufp de virus 07/71 par voie i.p., 14 poissons ont été placés dans un bac à 12° C et 10 dans un bac à 18° C. Un 3<sup>e</sup> groupe de 14 Turbots a été contaminé par bain ( $2.10^5$  ufp/ml) et placé à 12° C.

## R E S U L T A T S

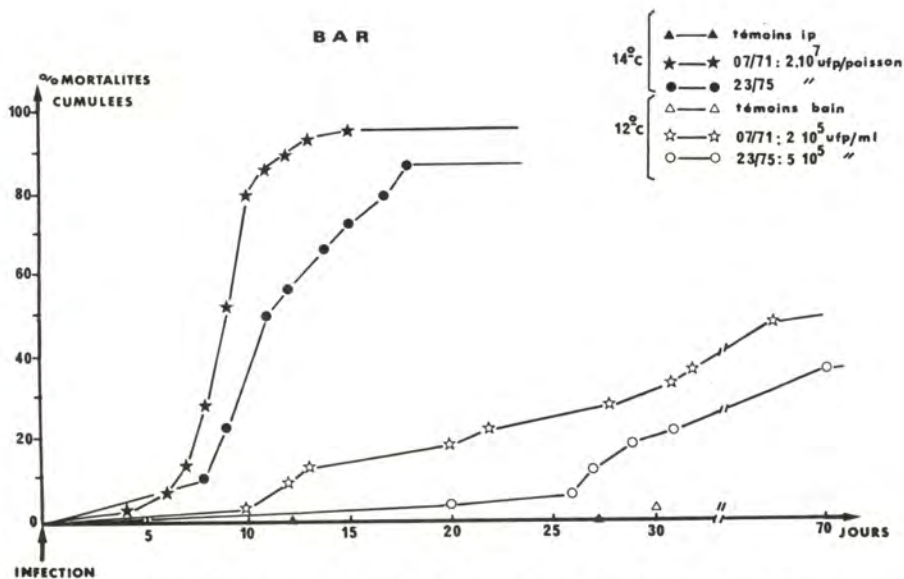
### Bar :

Aucun pouvoir pathogène du virus N.P.I., G 45, n'a été mis en évidence chez les jeunes Bars de 2 g : le maximum de pertes n'a pas dépassé 8 % dans les lots infectés. Cependant, le virus est encore présent dans les poissons, 42 jours après infection, à 12°5 C comme à 20° C (Tableau 1).

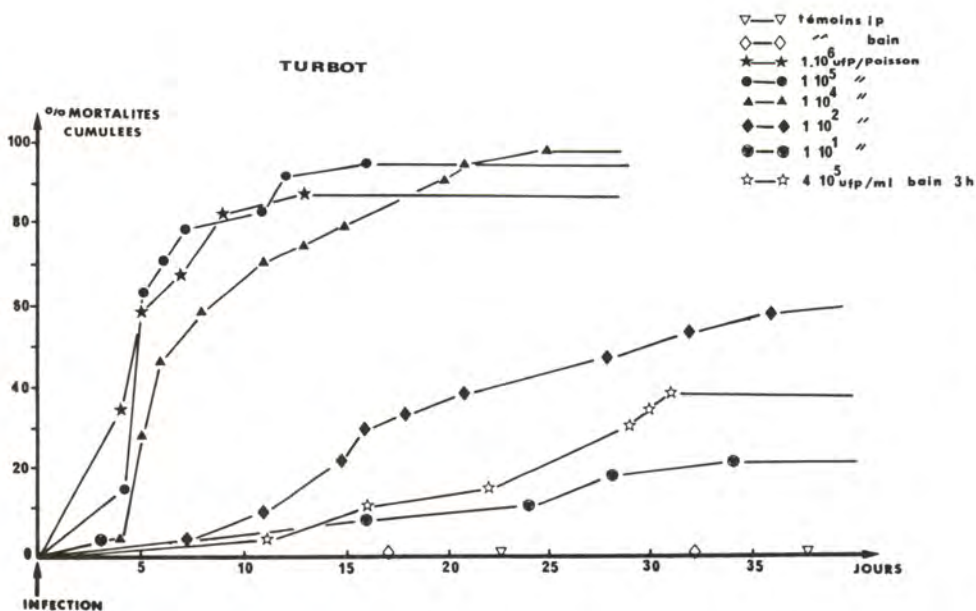
A des températures inférieures à 15° C, l'inoculation de doses élevées ( $2.10^7$  ufp) des virus de la S.H.V., 07/71 et 23/75, entraîne chez le Bar d'un an des mortalités respectives de 97 et 87 % en moins de 20 jours (figure 1). Des doses 100 fois plus faibles inoculées à des poissons de même âge résultent encore en 23 et 40 % de pertes. 70 jours après contamination par voie balnéatoire, les mortalités atteignent 50 et 37 % avec ces 2 souches (figure 1). L'infection de poissons plus jeunes par la souche 07/71 donne des pourcentages de mortalités comparables aux précédents : 50 % chez les inoculés (12 % chez les Témoins) et 20 % dans le groupe contaminé par bain (4 % chez les Témoins). A 20° C, la souche 07/71 n'a entraîné aucune mortalité significative et le virus n'a pas été réisolé chez les 6 poissons morts après inoculation. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent de 4 à 20 jours après l'infection selon les doses et le mode de contamination utilisés. Les symptômes et lésions sont très comparables à ceux observés chez la Truite Arc-en-Ciel (Ghittino, 1965) : apathie, mélanisme, exophtalmie très prononcée accompagnée d'hémorragies orbitales, points hémorragiques sous l'abdomen et à la base des pectorales, branchies pâles. L'autopsie révèle la présence d'un abondant liquide d'ascite, des hémorragies dans le foie, les mésentères, l'intestin, la vessie natatoire et les muscles situés en arrière de la tête. L'étude histologique montre une nécrose plus ou moins importante du tissu interstitiel du rein.

Durant la phase aigüe de la maladie, les concentrations de virus dans le rein, la rate et le cerveau sont supérieures à  $10^8$  ufp/g d'organe. Environ 12 jours après le début des mortalités, les poissons présentent une forme nerveuse de la maladie qui se traduit par une nage rapide et désordonnée alternant avec des phases d'apathie durant lesquelles ils restent couchés sur les flancs. La mort survient de 1 à 3 jours plus tard ; leur autopsie ne montre aucune lésion particulière. A ce stade, le virus est toujours présent dans le cerveau, à des concentrations de l'ordre de  $10^6$  ufp/g, mais pas obligatoirement dans le rein et la rate. Environ 1 mois après la fin des mortalités, le virus ne peut plus être mis en évidence chez les rescapés. Par contre, la présence d'anticorps neutralisants anti-SHV a pu être détectée dans leur sérum 74 jours après contamination (Tableau 2).





**FIGURE 1 : COURBES DE MORTALITES CHEZ DES BARS ( poids moyen 12 g ) INFECTES  
EXPERIMENTALEMENT PAR 2 SEROTYPES DE VIRUS S.H.V.**



**FIGURE 2 : COURBES DE MORTALITES CHEZ DES TURBOTS (poids moyen: 6,5g) INFECTES  
EXPERIMENTALEMENT PAR UN VIRUS DE LA S.H.V.<sub>1</sub> (souche 0771).**

#### Turbot :

A 12°5 C, le virus SHV1, 07/71, s'est montré très pathogène pour les jeunes turbots. Les mortalités sont proportionnelles aux doses injectées (figure 2) ; elles sont encore de 100 % pour une dose de  $10^4$  ufp, 64 % pour  $10^2$  ufp et 24 % pour seulement 10 ufp/poisson. Les mortalités débutent généralement 4 jours après infection et augmentent très rapidement lorsque la dose infectieuse est supérieure ou égale à  $10^4$  ufp/poisson. La contamination par voie naturelle dans un bain infectieux résulte aussi en une mortalité de 40 %. La période d'incubation est d'environ 10 jours. Comme chez le Bar, aucun pouvoir pathogène n'a été démontré à 20° C. Chez les poissons plus grands, l'inoculation de doses élevées de virus ( $6.10^7$  ufp) entraîne la mortalité de tout l'effectif (14/14) en 10 jours à 12° C. A 18° C, une dose identique tue encore 5 poissons sur 10. Dans le lot contaminé par bain : 4 poissons sont morts en présentant les symptômes de la maladie. Ces symptômes sont moins spectaculaires que chez le Bar ; néanmoins, les individus atteints prennent une teinte plus sombre, l'abdomen est renflé, les hémorragies sont fréquentes sur la face aveugle, dans les yeux et sur le pourtour des nageoires. A l'autopsie, s'écoule un important liquide d'ascite, la paroi abdominale est hémorragique et des pétéchies sont nombreuses sur le foie mais très rares dans les muscles. Les concentrations de virus sont supérieures à  $10^8$  ufp/g d'organe chez les poissons morts. Les images histologiques sont comparables à celles observées chez le Bar et montrent une nécrose du tissu hématoépithélial du rein et de la rate. La forme nerveuse de la maladie n'a pas été observée. Chez les rescapés, le virus n'est plus isolé un mois après la fin des mortalités.

#### CONCLUSION

Dans des conditions expérimentales définies, aucun pouvoir pathogène du virus de la N.P.I. utilisé n'a été démontré chez le Bar de 2 g maintenu à 12°5 ou 20° C. Par contre, Bar et Turbot se sont révélés très sensibles aux virus de la S.H.V. à des températures inférieures à 15° C. Le déroulement de la maladie chez ces deux espèces présente des analogies avec ce qui se passe chez la Truite Arc-en-Ciel : temps d'incubation, symptômes, lésions, concentrations de virus dans les organes, phase nerveuse et anticorps neutralisants chez le Bar.

A 20° C, les deux espèces sont réfractaires à la maladie, ce qui laisse supposer qu'à cette température les mécanismes de défense interviennent pour contrecarrer la multiplication virale.

Les résultats de cette étude expérimentale démontrent que les virus de la SHV doivent être considérés comme des pathogènes potentiels pour le Bar et le Turbot lorsque la température est inférieure à 15° C.

---

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat CNEXO - CNRS 1982.

Nous remercions le Département "Aquaculture" du C.O.B. à Brest et la Ferme Marine du Douhet à Oléron qui nous ont fourni les poissons ; de même que J. CABON, Y. ROUDAUT, A. ABIVEN et N. JEZEQUEL pour leur assistance technique efficace.

- Casals J., 1967. - Immunology techniques for animal viruses. In : K. Maramorosch and H. Koprowski (Editors), Methods of Virology, Academic Press, New York, p. 113-198.
- Castric J., de Kinkelin P., 1980. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson reared in sea water. J. Fish Diseases, 3, p. 21-27.
- Cnexo, 1978. - Rapport annuel d'activité du Centre Océanologique de Bretagne (BP 337 - 29273 Brest Cedex, France), p. 40-44.
- Dorson M., Torchy C., 1979 - Complement dependent neutralization of Egtved virus by trout antibodies. J. Fish Diseases, 2, p. 345-347.
- Fijan N., Sulimanovic D., Bearzotti M., Muzinic D., Zwillenberg L.O., Chilmonczyk S., Vautherot J.F., de Kinkelin P., 1983 - Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from Carp Cyprinus carpio. Ann. Virol. (Inst. Pasteur), 134 E, p. 207-220.
- Ghittino P., 1965 - Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout in Italy. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 126, p. 468-478.
- de KINKELIN P., 1982 - Viral Haemorrhagic Septicaemia. In : D.P. Anderson, M. Dorson & P. Dubourget (Editors), Antigens of Fish Pathogens, development and production of vaccines and serodiagnostics, Symposium international de Talloires, 10-12 mai 1982, 10 p.
- De Kinkelin P., Scherrer R., 1970 - Le virus d'Egtved : 1. Stabilité, développement et structure du virus de la souche danoise Fl. Ann. Rec. Vet., 1, p. 17-30.
- de Kinkelin P., Castric J., 1982 - An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry, Salmo salar L., to viral haemorrhagic septicaemia. J. Fish Diseases, 5, p. 57-65.
- Le Berre M., de Kinkelin P., Metzger A., 1977 - Identification sérologique des Rhabdovirus des Salmonidés. Bull. Off. int. Epiz., 87 (5-6), p. 391-393.
- Vestergard-Jorgensen P.E., Kehlet N.P., 1971 - Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout : their serological and pathogenic properties. Nord. Vet. Med., 23, p. 568-575.
- Wolf K., Quimby M., 1962 - Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science, 135, p. 1065-1066.



EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DU REGIME ALIMENTAIRE  
SUR CERTAINS PARAMETRES DE L'IMMUNITE CELLULAIRE DU  
LOUP DE MER EN ELEVAGE (1)

P. DESCHAUX (2), G. PÈRÈS (3)

RESUME

Afin d'améliorer les conditions d'élevage du Loup de mer Dicentrarchus labrax, nous avons cherché à connaître la température optimale à laquelle ce poisson présente une réponse immune maximale. Nos études ont montré que la production d'anticorps et la réponse spontanément tueuse (NK) sont dépendantes de la température et que le maximum de ces réponses est obtenu lorsque les Loups sont élevés à 18°C. D'autre part, nous avons observé une réduction de la réponse T cytotoxique et une augmentation de la réponse NK lors d'un régime protéinoprive. L'étude de l'influence du jeûne total pendant 15 jours ne montre aucune variation significative de ces réponses cytotoxiques.

ABSTRACT

Our data showed that antibody response and NK cells activity of a teleostean fish Dicentrarchus labrax (Loup de mer) were maximal when animals were bred at a temperature equal to 18°C. A proteinoprive diet enhanced T cytotoxic response and diminished NK cell activity. A fast of 15 days had no effect on these two cellular responses.

MOTS - CLES : Immunité, Poisson, Température, Nutrition.

KEY WORDS : Immunity, Fish, Temperature, Nutrition.

INTRODUCTION

Tout élevage intensif de poissons exige la mise au point de conditions se rapprochant le plus possible de celles d'un environnement naturel adapté. L'élevage du Loup de mer, Dicentrarchus labrax, fait actuellement l'objet de nombreuses études. Notre travail s'inscrit dans cet objectif en étudiant l'influence des conditions thermiques et nutritionnelles sur la fonction immune. La

.....

1 - Ce travail a bénéficié de deux contrats CNEXO-CNRS.

2 - Laboratoire de Physiologie animale, Immunophysiologie générale et comparée, UER Sciences, Université de Limoges, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges (France).

3 - Institut Michel Pacha, laboratoire maritime de Physiologie de Tamaris sur Mer, 83500 La Seyne sur Mer (France).

meilleure connaissance de cette fonction peut permettre l'amélioration de la résistance des Loups d'élevage aux agressions extérieures.

Il a été démontré que la température d'élevage représente un facteur influençant la réponse immune des poissons. Aucune recherche immunologique n'a été réalisée chez le Loup de mer.

L'influence des conditions nutritionnelles sur l'immunité du poisson n'a jamais été étudiée mais bien démontrée par des observations cliniques et expérimentales chez l'Homme et l'Animal de laboratoire (Chandra 1980, Heresi et Chandra 1980).

Nous rapportons une étude sur l'influence de la température d'élevage (13, 18, 21°C) du jeûne et d'un régime appauvri en protéines sur la production d'anticorps et la réponse immune cytotoxique du Loup de mer en élevage.

## MATERIELS ET METHODES

### 1 - Animaux -

Nos expérimentations ont porté sur des Loups de mer, Dicentrarchus labrax, âgés d'un été (O<sup>+</sup>) pesant 80 g ± 20.

### 2 - Conditions d'élevage hors expérimentations -

Les Loups sont élevés en semi-liberté dans des bassins de 2 m x 4 m à renouvellement permanent en eau de mer.

### 3 - Conditions d'élevage lors des expérimentations -

Température : Chaque lot expérimental est constitué de 60 poissons répartis en 3 bacs de 250 litres. L'acclimatation à la température expérimentale commence 4 semaines avant le début des expérimentations. Les températures expérimentales sont les suivantes 13°, 18° et 21°C.

Régime alimentaire : Pour ces expérimentations les Loups sont maintenus à 18°C dans les bassins de 250 litres et répartis comme précédemment.

- Influence du jeûne - Nous avons soumis les Loups à un jeûne de 15 jours. Après ce temps les animaux sont tués par fracture cervicale et leurs fonctions immunes étudiées.

- Influence d'un régime alimentaire appauvri en protéines - des granulés spéciaux de taux protéinique faible (20 p. cent) (Société SARB Pontanevaux) sont donnés aux Loups en remplacement des granulés normaux (taux de protéines 46 p. cent). Les animaux sont sacrifiés après 15, 45 ou 75 jours de régime.

### 4 - Etude des plages d'hémolyse -

La technique d'étude des cellules formant plage d'hémolyse a été détaillée antérieurement (Cordier et al. 1983). Nous la rappelons brièvement :



Les poissons sont immunisés (injection intracoelomique de 0,2 ml d'une suspension de globules rouges de mouton à 11 p. cent) le dernier jour du traitement. Un lot d'animaux "témoins" n'est pas immunisé et reçoit 0,2 ml d'une solution saline physiologique (NaCl 9 p. mille).

Les Loups sont sacrifiés 14 jours après l'immunisation, les rates prélevées stérilement dans une solution de BSS, les lymphocytes isolés et ajustés à une concentration de  $30.10^6$  cellules par ml.

Dans un tube à hémolyse contenant 0,4 ml d'agarose (0,6 p. cent) on ajoute 0,1 ml de la suspension cellulaire et 0,05 ml d'une suspension de globules rouges de mouton (11 p. cent). L'ensemble est étalé sur une lame agarosée. Après 2 h 30 d'incubation (25°C) on additionne du complément de Loup et après une nouvelle incubation de 1 h 30 à 25°C nous déterminons sur chaque lame le nombre de plaques de lyse.

#### 5 - Etude des T cytotoxiques (cytotoxicité splénique) -

Les cellules T cytotoxiques doivent être sensibilisées par un premier contact avec l'antigène afin de différencier un clone cellulaire détruisant l'antigène.

La sensibilisation est réalisée in vitro en culture mixte de cellules spléniques et de cellules cibles syngéniques.

Les cellules cibles utilisées pour nos expérimentations sont des cellules spléniques de Loup de mer traitées au TNP (Trinitrophényl). Cette substance a la propriété de modifier les protéines, de surface des membranes cellulaires donc la structure des antigènes membranaires qui deviennent inconnus pour les lymphocytes T (Shearer 1974).

#### a)- Préparation de la suspension lymphocytaire :

Les Loups sont tués par décapitation, les rates sont prélevées et écrasées. Après lavages successifs dans un milieu RPMI (RPMI BioMérieux additionné d'antibiotiques) la suspension cellulaire obtenue est débarrassée des globules rouges par choc hypotonique. Après un test de viabilité au bleu trypan, la concentration de la suspension est ajustée à  $5.10^6$  cellules par ml.

#### b)- Préparation de cellules marquées au 2.4.6. TNP selon la technique de Shearer (1974) :

Comme précédemment les rates de Loups sont prélevées stérilement, écrasées et les cellules spléniques dénombrées.

La concentration lymphocytaire est ramenée à  $10^7$  lymphocytes/ml et on ajoute 0,2 ml de milieu RPMI<sub>10</sub> (RPMI + 10 p. cent sérum de veau foetal) additionné de 10 mM de 2,4,6 TNP, pH 7,3 ; le rapport volume de la suspension cellulaire, volume du réactif = 1 : 4. On laisse incuber 10 mn à 25°C. Le culot est récupéré et lavé 2 fois par centrifugation à 1200 g pendant 10 mn. Le dernier culot est repris dans du milieu RPMI<sub>10</sub> afin d'obtenir une concentration à  $2.10^5$  cellules /ml.

On réalise ensuite le contact entre cellules spléniques (1 ml) et cellules marquées au TNP (1 ml) (boîtes Costar 24 puits). L'in-



incubation est réalisée pendant 5 jours à 18°C (5 p. cent CO<sub>2</sub> , 95 p. cent O<sub>2</sub>).

c)- Test du relargage du chrome 51 :

Après 5 jours d'incubation les lymphocytes sont récupérés, lavés. La concentration cellulaire finale est de 30.10<sup>6</sup> cellules vivantes/ml.

Ces cellules sont mises au contact de nouvelles cellules marquées au TNP et ayant subi une incubation de 45 minutes à 37°C dans du milieu RPMI<sub>10</sub> + une solution de chrome radioactif Cr51 à 200 µ Ci/ml (rapport 1 cellule cible/10 cellules spléniques). Après une incubation de 4 heures à 18°C le surnageant est récupéré. Ce surnageant contient la radioactivité libérée à partir des cellules cibles lysées par les cellules T cytotoxiques sensibilisées. Le taux de radioactivité est déterminé par un comptage à l'aide d'un compteur Gamma (Packard).

Les résultats sont exprimés par le pourcentage de lyse ; le témoin minimum est obtenu en additionnant 1 ml de milieu RPMI<sub>10</sub> à 1 ml de cellules marquées au TNP ; le témoin maximum est obtenu en additionnant 1 ml d'une solution de SDS (sodium dodecyl sulfate) à 1 ml d'une solution de cellules marquées au TNP.

$$\text{pourcentage de lyse} = \frac{\text{cpm du test} - \text{cpm témoin minimum}}{\text{cpm témoin maximum} - \text{cpm témoin minimum}} \times 100$$

#### 6 - Etude des cellules spontanément tueuses (Natural Killer Cells = NK)

La technique d'étude des cellules NK a été rapportée précédemment (Deschaux et al. 1983), nous la rappelons brièvement :

La préparation des cellules effectrices est réalisée comme dans le cas des lymphocytes T cytotoxiques (10<sup>7</sup> cellules/ml).

Les cellules cibles sont des cellules diploïdes de poumon de fœtus humain (MRC5) ou les cellules cancéreuses (L) de souris C<sub>3</sub>H. Ces cellules sont marquées au chrome radioactif comme pour l'étude des lymphocytes T cytotoxiques (2.10<sup>5</sup> cellules/ml).

Le test de microtitration se fait par le relargage du Cr51 des cellules cancéreuses lysées par des cellules spléniques de Loups.

L'expression des résultats se fait comme dans le cas des lymphocytes T cytotoxiques.

## RESULTATS

### I - Influence de la température sur la production d'anticorps anti-globules rouges de mouton (plages d'hémolyse)

Les résultats du tableau 1 ci-après démontrent que l'optimum de l'activité anticorps antiglobules rouges de mouton est 18°C.

température d'élevage	nombre de poissons étudiés	nombre de PFC ( $\bar{X} + Sm$ ) pour $10^6$ cellules vivantes	significativité *	nombre de PFC ( $\bar{X} + Sm$ )/rate	significativité
13°C	10	33 + 5	↕ 0.001 ↕ 0.001 ↕ 0.001	1321 + 205	↕ 0.001 ↕ 0.001 ↕ 0.001
18°C	12	217 + 18		8692 + 752	
21°C	9	39 + 4		1588 + 191	

Tableau 1 - Etude de l'influence de la température d'élevage sur la production in vivo d'anticorps antiglobules rouges de mouton.

\* - test de Student Fisher.

2 - Influence de la température sur l'activité spontanément tueuse (cellules NK) (tableau 2).

température d'élevage	Cpm de chrome 51 relargué / $10^6$ cellules $\bar{X} + Sm$	pourcentage de lyse $\bar{X} + Sm$	Significativité *** comparaison entre les différentes températures
13°C	1487* + 11 n*** = 13	6,87	/18° p ≤ 0.01 /21° p ≤ 0.001
18°C	11930 + 223 n = 23	38,5	/21° p ≤ 0.001
21°C	2952 + 58 n = 35	7,7	-

Tableau 2 - Effet de la température d'élevage sur la cytotoxicité des cellules naturelles tueuses (NK).

\* - Cytotoxicité exprimée en cpm  $\bar{X} + Sm$

\*\* n = nombre d'essais réalisés par température et par expérience. Nous avons réalisé 2 expériences.

\*\*\* - test de Student Fisher.

3 - Influence des conditions de nutrition sur le nombre de lymphocytes formant plages d'hémolyse (tableau 3).

	témoin	animaux au jeûne (15 jours)
1ère expérimentation (10 poissons)	158 ± 20	132 ± 8 (NS)*
2ème expérimentation (10 poissons)	205 ± 10	200 ± 11 (NS)
durée du régime (10 poissons par temps)	témoin	animaux au régime dépourvu en protéines
15 jours	138 ± 15	155 ± 5 (NS)
45 jours	124 ± 18	130 ± 12 (NS)
75 jours	182 ± 4	167 ± 21 (NS)

Tableau 3 - Nombre de PFC/10<sup>6</sup> lymphocytes vivants

\*NS = non significatif (test de Student Fisher)

Dans nos conditions expérimentales nous n'avons observé aucune influence du régime alimentaire sur la production d'anticorps antiglobules de mouton.

4 - Influence des conditions de nutrition sur la réponse cytotoxique cellulaire du Loup de mer en élevage.

a)- Influence du jeûne sur l'activité cytotoxique :

(tableau 4).

Nous constatons aucune influence du jeûne alimentaire.

régime alimentaire	nombre de poissons étudiés	moyenne + Sm cpm Cr 51 <sup>-</sup> relargués	pourcentage de lyse $\bar{X}$ ± Sm
normal	17	5386 ± 113	23,62 ± 1,20
jeûne 15 jours	16	5305 ± 111 NS	22,76 ± 1,18 NS*

Tableau 4 - Etude in vivo de l'activité T cytotoxique de cellules spléniques de Loup de mer ; influence du jeûne (voir conditions d'élevage). Les cellules cibles sont des cellules spléniques de Loup traitées au TNP; le rapport cellules effectrices/cellules cibles = 1/10). Les résultats sont exprimés en cpm relargués, et en pourcentage de lyse. \* test de Student Fisher.

b)- Influence d'un régime appauvri en protéines

(tableau 5).

Nos résultats mettent en évidence une diminution importante de l'activité cytotoxique.



durée du régime	régime	nombre de poissons étudiés	moyenne + Sm cpm Cr 51 relargués	pourcentage lyse $\bar{X} + Sm$
15 jours	normal	11	1191 + 23	24,76 + 2,37
	DP	11	1083 + 22 < 0.001	13,73 + 2,33 < 0.001*
45 jours	normal	8	1596 + 50	20,70 + 2,07
	DP	4	1322 + 14 < 0.001	9,44 + 0,58 < 0.001
75 jours	normal	5	4412 + 277	33,26 + 4,67
	DP	4	3732 + 147 NS	21,95 + 4,16 NS

Tableau 5 - Etude in vivo de l'activité T cytotoxique de cellules spléniques de Loup de mer ; influence d'un régime dépourvu en protéines (voir conditions d'élevage). Les cellules cibles sont des cellules spléniques de Loup traitées au TNP, le rapport cellules effectrices/cellules cibles = 1/10. Les résultats sont exprimés en cpm relargués et en pourcentage de lyse.

\* test de Student Fisher.

5 - Influence des conditions de nutrition sur la réponse spontanément tueuse (NK) du loup de mer en élevage.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de cps de radioactivité relarguée par les cellules cibles lysées sous l'influence de l'activité cytotoxique des cellules spléniques : x cpm (cpm = coups par minute). Nous avons également exprimé les résultats en pourcentage de lyse des cellules cibles par les cellules spléniques, ce qui correspond au pourcentage d'activité cytotoxique des cellules spléniques =  $\bar{X}$  pourcentage cytotoxicité =  $\bar{X}$  pourcentage lyse.

a)- Influence d'un jeûne de 15 jours (tableau 6) :

L'activité des cellules naturelles tueuses semble légèrement augmentée par le jeûne de 15 jours mais non significativement.

durée du régime	régime	nombre de poissons	$\bar{X} + Sm$	pourcentage lyse $\bar{X} + Sm$
15 jours	T	22	9547 + 284	26,46 + 2,03
	jeûne	19	9956 + 282 NS	29,37 + 2,01 NS*

Tableau 6 - Etude in vivo de l'activité naturelle tueuse de cellules spléniques de Loups de mer : influence du jeûne.

\* test de Student Fisher.

b)- Influence d'un régime appauvri en protéines (DP) (15, 45, 75 jours) (tableau 7) :

On observe une augmentation significative de l'activité naturelle tueuse lors des premiers jours de régime. Aucune variation de cette activité n'est observée après 45 ou 75 jours.

durée du régime	régime	nombre de poissons	$\bar{X} \pm Sm$	pourcentage de lyse $\bar{X} \pm Sm$
15 jours	T	12	1097 $\pm$ 29	16,32 $\pm$ 1,44
	DP	12	1214 $\pm$ 27	21,92 $\pm$ 1,41 <0,05 *
45 jours	T	13	2409 $\pm$ 139	35,11 $\pm$ 5,09
	DP	13	2184 $\pm$ 137 NS	26,94 $\pm$ 5,00 NS
75 jours	T	12	4053 $\pm$ 253	21,68 $\pm$ 4,85
	DP	12	4170 $\pm$ 226 NS	23,92 $\pm$ 4,31 NS

Tableau 7 - Etude *in vivo* de l'activité naturelle tueuse des cellules spléniques de Loup de mer : influence d'un régime dépourvu en protéines.

\* test de Student Fisher.

## CONCLUSION

En 1972, Cone et Marchonis ont montré chez le Poisson que les cellules formant rosettes (lymphocytes T) apparaissent 3 jours après l'immunisation et que leur fonction est indépendante de la température mais dépendante de la dose d'antigène. La synthèse d'anticorps (lymphocytes B) est dépendante à la fois de la température et de la dose d'antigène.

Une variation de température peut ainsi dissocier des étapes fonctionnelles dans la formation d'anticorps : une phase "température insensible" pouvant représenter l'activation du lymphocyte T tandis qu'une phase plus tardive consisterait à la formation des lymphocytes B (Avtalion 1969, Paterson et Fryer 1974, Riskers et al. 1980).

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude de l'effet de la température sur la coopération lymphocytes B - lymphocytes T ; l'immunisation a été faite avec des globules de mouton. Cette immunisation a été pratiquée par injection intra coelomique ; les poissons (*Dicentrarchus labrax*) ont été maintenus pendant 4 semaines à différentes températures (13, 18, 21°C). On constate que la production maximale d'anticorps est obtenue chez les animaux élevés à 18°C.

Nous avons démontré la présence de cellules spontanément tueuses (NK) chez le Loup. Le pouvoir cytotoxique de ces cellules est maximum lorsque les animaux sont élevés à 18°C.



Chez le Mammifère, on considère les lymphocytes B et T comme des souches cellulaires différentes des cellules NK, ces dernières pouvant être classées parmi les défenses non spécifiques de l'organisme. L'étude que nous rapportons montre chez le Poisson l'existence d'un effet de la température d'élevage sur les défenses spécifiques et non spécifiques.

Dans la seconde partie de notre travail il a été démontré que ni le jeûne, ni un régime appauvri en protéines n'influent sur la production d'anticorps antiglobules rouges de mouton. Par contre, ces régimes modifient la cytotoxicité des lymphocytes spléniques et des cellules naturelles tueuses.

La cytotoxicité cellulaire lymphocytaire est abaissée lorsque les animaux sont carencés en protéines et n'est pas modifiée par le jeûne ; la réponse naturelle tueuse est augmentée après le régime appauvri en protéines et légèrement modifiée par le jeûne.

Le régime carencé en protéines influe sur les populations cellulaires cytotoxiques mais cependant un équilibre se maintient. Notre étude a été réalisée in vivo. Pour trouver le point d'impact de l'action de ce régime sur les cellules cytotoxiques il faut travailler in vitro en modifiant la composition des milieux de culture des cellules ; ceci a été réalisé avec les lymphocytes des poissons carencés. C'est l'objectif que nous poursuivons.

L'explication de la différence entre les résultats obtenus après le jeûne et le régime dépourvu en protéines doit relever du métabolisme intermédiaire du Poisson, encore très mal connu.

Durant notre travail, deux conditions expérimentales importantes n'ont pas été étudiées : le mode d'injection de l'antigène et la dose d'antigène injectée. Il sera donc intéressant, la température optimale d'élevage ayant été déterminée, d'étudier l'influence de ces paramètres (mode d'injection et dose d'antigène) sur la réponse immune. Enfin, après avoir défini ces conditions optimales nous pourrions envisager l'utilisation d'immuno-stimulants de la fonction immune cellulaire (hormones thymiques).

---

Avtalion R. R., 1969 - Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (Cyprinus carpio) immunised against. BSA Immunology, 17, p. 927-931.

Chandra R. K., 1980 - Immunology of nutritional disorders. Current topics in Immunology series.

Cone E., Marchalonis J. J., 1972 - Cellular and humoral aspects of the influence of environmental temperature on the immune response of poikilothermic vertebrates. J. Immunol., 108, p. 952-957.

Cordier-Perroy L., Deschaux P., Pérès G., 1983 - Influence of an antibody response (antiSRBC) in a teleostean fish : Dicentrarchus labrax. Experientia, 39, p. 84-85.



- Deschaux P., Cordier-Perroy L., Pérès G., 1983 - Evidence for NK cells in Dicentrarchus labrax. Action of breeding temperature. Comp. Immunol. Microbiol. and Inf. Diseases, 6, p. 95-99.
- Heresi G., Chandra R.K., 1980 - Effects of severe caloric restriction on thymic factor activity and lymphocyte stimulation response in rats. J. of Nutrition, 110, p.1888-1892.
- Paterson W.D., Fryer J.L., 1974 - Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (Ochorhyncus kisutch) to aeromonas salmocida endotoxin. J. Fish.Res. Board Can., 31 p. 1743-1749.
- Rijkers G.J., Van Muis A., Winkel W.B., 1980 - The immune system of cyprinid kinetics and temperature dependance of antibody-producing cells in carp. Immunology, 99, p.876-882.
- Shearer G.M., 1974 - Cell mediated cytotoxicity to trinitrophenol modified syngenic lymphocytes. Eur. J. Immunol., 4, p.527-533.

ADAPTATIONS BIOCHIMIQUES INTESTINALES CHEZ LA TRUITE : INFLUENCE DE  
L'ALIMENT ET DE LA SALINITE SUR QUELQUES PROPRIETES MEMBRANAIRES.

C. LERAY (1)

R E S U M E

Nous rapportons ici des résultats d'expériences tendant à confirmer le rôle important joué par l'intestin dans la régulation osmotique des poissons euryhalins. La modulation de cette fonction par le contrôle des lipides alimentaires est décrite. Il a été établi que la perméabilité aux ions des membranes apicales des entérocytes est reliée à leur composition lipidique, elle même conditionnée par l'aliment. L'importance des acides gras essentiels (n-3) a pu être soulignée. L'intérêt d'une telle modulation pour l'amélioration des capacités adaptatives des animaux à l'eau de mer est suggéré par l'évolution des perméabilité apicales après le transfert rapide en eau de mer. L'addition de NaCl à l'aliment imperméabilise la bordure en brosse et altère sa composition chimique, tout en améliorant la survie en eau de mer.

S U M M A R Y

We report the results of physiological and biochemical experiments which confirm the important role played by fish intestinal mucosa in their osmoregulatory process. We describe the ability of the dietary lipids to modulate this function. It was demonstrated that the ionic apical permeability of the enterocytes are related to their membrane lipid composition. The importance of the essential fatty acids is emphasized. The time course changes of the apical permeability are of value in improving sea water adaptation, similar conclusions are reported for NaCl supplementation.

---

M O T S - C L E S : *Salmo gairdneri*, intestin, perméabilité, phospholipide, acide gras, adaptation à l'eau de mer.

K E Y W O R D S : *Salmo gairdneri*, intestine, permeability, phospholipid, fatty acid, sea water adaptation.

---

(1) C.N.R.S. BP 20 CR 67037 Strasbourg Cedex

## INTRODUCTION

Il est désormais bien prouvé que l'absorption intestinale d'eau et de sel fait partie intégrante des processus de l'osmorégulation qui président à la survie des poissons téléostéens vivant dans un milieu hyperosmotique (SHEHADEH et GORDON 1969, SHARRATT et al. 1964, SKADHAUGE 1969, LAHLOU 1976, HIRANO et al. 1976). Alors que les poissons d'eau douce dulcaquicoles ou marins (SMITH 1964, ELLORY et al. 1972, HOUSE et GREEN 1965, AULL 1966) n'ont fait l'objet que de quelques travaux, les espèces euryhalines ont été souvent explorées par suite de l'existence de régulations osmotiques complexes. Bien que la nature des mécanismes en jeu ne soit pas complètement connue, il semble y avoir combinaison de systèmes de pompage actif et de phénomènes de perméabilité passive. Certaines études ont porté sur le rôle passif joué par l'intestin chez des poissons s'adaptant à une salinité croissante (SHEHADEH et GORDON 1969, SHARRATT et al. 1964) mais de nombreux auteurs ont souligné un accroissement de l'absorption active de NaCl dans les mêmes conditions (SKADHAUGE 1969, LAHLOU 1976, HIRANO et al. 1976). Bien que certains points portant sur la chronologie des phénomènes adaptatifs soient encore discutés (MAC KAY et JANICKI 1979), l'accroissement de l'absorption de NaCl semble lié à un accroissement d'activité des enzymes liées au transport (HIRANO et al. 1976). Récemment, une diminution des transports ioniques a été décrite chez Tilapia lors de l'adaptation à l'eau de mer (HAINOYA 1982). Cette stratégie peut être interprétée comme un mécanisme compensateur limitant la surcharge saline tout en maintenant curieusement l'absorption d'eau au même niveau.

Le rôle joué par la régulation de la perméabilité passive est particulièrement important si l'on considère l'absorption réduite ou presque nulle de  $Mg^{2+}$  et  $SO_4^{2-}$  (SHEHADEH et GORDON 1969) mais semble aussi intervenir dans la limitation de l'invasion de NaCl en milieu hypertonique (LAHLOU 1976). Cet auteur a en effet montré que si les bons euryhalins (ex. : Flet) maintenaient constante la perméabilité apicale de leurs entérocytes, les mauvais euryhalins (ex. : Carassin, truite) voyaient cette perméabilité réduite.



Il apparaît ainsi que, probablement en regard de l'efficacité variable de la branchie à excréter les sels contre un gradient de concentration, on trouve diverses stratégies au niveau intestinal contribuant au maintien de l'homéostasie du milieu intérieur.

Ces différentes formes adaptatives au niveau de l'épithélium intestinal soulignent l'importance des phénomènes siégeant aux deux pôles de l'entérocyte : bordure en brosse et membrane latérobasale.

Au niveau apical, peu de données sont à retenir, bien qu'une modulation de la conductance au  $\text{Cl}^-$  par l'AMP cyclique ait été démontrée (MAC KAY et al. 1978, FIELD et al. 1980) et qu'une intervention de la phosphatase alcaline dans l'absorption d'eau soit probable (UTIDA 1967, UTIDA et ISONO 1967, UTIDA et al. 1968, OIDE 1973). Au niveau basal, l'échange Na/K lié à la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase est généralement considéré primordial dans l'adaptation de l'épithélium intestinal à une surcharge salée (HIRANO et al. 1976, OIDE 1967, MAC KAY et JANICKI 1979). Le rôle joué par la  $\text{HCO}_3^-$ -ATPase est plus controversé bien que quelques travaux suggèrent son intervention dans le transport de  $\text{Cl}^-$  chez l'anguille (MORISAWA et UTIDA 1976, HIRANO et al. 1976).

L'ampleur des mécanismes adaptatifs rencontrés chez les poissons euryhalins les rend particulièrement intéressants en vue d'études variées sur les relations de type structure-fonction au niveau des cellules ou même des membranes intestinales. C'est dans cette optique que nous avons utilisé la truite arc-en-ciel puisqu'elle tolère une élévation de la salinité ambiante (LAHLOU et al. 1975, LERAY et al. 1981) et surtout grâce à la facilité de son élevage avec apport alimentaire contrôlé.

Nous rapporterons donc ici nos recherches récentes sur les propriétés de transport ionique au niveau de la bordure en brosse intestinale en relation avec sa composition lipidique et avec l'adaptation rapide de la truite à l'eau de mer. L'activité et les propriétés de certaines enzymes membranaires ont également fait l'objet de recherches parallèles. Une supplémentation du régime alimentaire en NaCl a été aussi tentée afin de rechercher une activation potentielle des mécanismes osmorégulateurs et surtout une méthode de préconditionnement des animaux avant leur transfert en eau de mer.

A - COMPOSITION LIPIDIQUE DE L'ALIMENT ET PROPRIETES DES MEMBRANES INTES-  
TINALES CHEZ LA TRUITE D'EAU DOUCE

De nombreux travaux ont montré que les lipides alimentaires pouvaient moduler la composition des phospholipides chez la truite (CASTELL et al. 1972a, YU et SINNHUBER 1975, CASTLEDINE et BUCKLEY 1980). Il a de plus été bien montré que seuls les acides gras de la série (n-3) issus de l'acide linoléique (18:3) étaient essentiels pour ce poisson (CASTELL et al. 1972 a, b).

Leur conservation lors de carences alimentaires (CASTLEDINE et BUCKLEY 1980, 1982) ou lors d'acclimatation thermique (HAZEL, 1979) suggère leur rôle important dans le maintien de l'intégrité des fonctions et des structures membranaires. Il faut souligner que jusqu'à présent aucune relation précise entre fonctionnement cellulaire et composition lipidique membranaire n'a été décrite chez les poissons. De plus, les tissus transporteurs ont à ce jour échappé à toute analyse.

Nous avons donc entrepris l'étude des relations entre perméabilité ionique et composition phospholipidique au niveau de la bordure en brosse de l'intestin moyen de truite. Le choix de l'intestin moyen (zones coecale et post coecale) s'est imposé par suite des données de la littérature relative à son rôle dans l'osmorégulation (LAHLOU et al. 1975) et du bon rendement observé lors de la préparation des membranes apicales. Nous avons en effet montré dans un premier travail (DI COSTANZO et al. 1983a), que ces membranes, isolées par une méthode modifiée de SCHMITZ et al. (1973) et basée sur une lyse hypotonique suivie d'une agrégation des contaminants par le  $Mg^{2+}$ , présentaient un degré de pureté acceptable au vu de données enzymatiques et ultrastructurales uniquement lorsque la muqueuse provenait de l'intestin moyen. L'extraction et la séparation des phospholipides et du cholestérol ont été effectuées selon un protocole adapté à la haute teneur de ces membranes en acides gras polyinsaturés (DI COSTANZO et al. 1983b). Les acides gras sont analysés sous forme butylée par chromatographie en phase gazeuse (PERKIN-ELMER Sigma 1 et intégrateur Sigma 10, colonne capillaire carbowax 20 M ou DEGS de 50 m x 0.3 mm). La proportion de chaque acide gras est rapportée sous la forme de pourcentage molaire et non pondéral afin de mieux représenter la structure physique de la membrane.

Les truites sont nourries pendant au minimum 6 semaines avec un aliment granulé composé au laboratoire selon la formule de base établie par CASTELL et al. (1972a). Les quatre régimes employés ne diffèrent que par



leur composante lipidique (Tableau I) ajustée à 8 % du poids de l'aliment sauf pour un régime (D) dépourvu totalement de lipides. Les régimes A et B contiennent de grandes quantités d'acides gras essentiels présents sous forme soit de 49 % de polyinsaturés ( $C_{20}$  et  $C_{22}$ ) de l'huile de foie de morue (Régime A), soit de 59 % d'acide linoléique (18:3, n-3) de l'huile de lin (Régime B). A l'opposé, le régime C contient 77 % d'acide linoléique (18:2, n-6 de l'huile de pépin de raisin) et est totalement carencé en acides gras essentiels. La captation apicale de  $Na^+$  et  $Cl^-$  a été effectuée selon la méthode des flux rapides (SCHULTZ et al. 1967) sur des portions d'intestin moyen montées en chambre de type Ussing avec perfusion des compartiments muqueux et séreux (FLORENTZ 1982).

La composition en phospholipides et en cholestérol des quatre types de membrane est donnée dans le tableau 2. Le rapport phospholipide/protéine est le plus élevé dans les membranes témoins (A), valeur 2 à 5 fois plus élevée que chez les mammifères, et le plus faible après carence en acide gras (n-3) (C).

Le rapport molaire cholestérol/phospholipide est voisin de 1 pour les membranes A, B et D mais notablement plus élevé (+ 60 %) pour les membranes C. La composition en phospholipides révèle peu de modifications induites par le régime alimentaire si l'on excepte une plus faible teneur en PC dans les membranes B et inversement une plus forte teneur dans les membranes C. Il faut également remarquer que les membranes B ont plus de SP que les autres types, doublant ainsi le rapport molaire SP/PC s'élevant à 0.18 dans les membranes A, C et D.

La composition globale en acides gras des lipides polaires est donnée dans le tableau 3. Il est remarquable que ces lipides ont selon les types de membranes une composition en acides gras distincte en relation avec la composition de l'aliment ou avec les capacités de bioconversion métabolique. Ainsi, la forte teneur en acides gras (n-9) de l'huile de foie de morue n'est pas corrélée à la teneur observée dans les membranes A. Il est évident que la richesse en acides gras (n-6) du régime C est reflétée dans celle des membranes correspondantes puisqu'aucune source alimentaire de (n-3) ne vient gêner la bioconversion du précurseur 18:2 en 22:5 (représentant jusqu'à 12 % du contenu en acide gras des lipides polaires).

La plus faible teneur en acides gras (n-3) des membranes B par rapport aux membranes A peut probablement s'expliquer par l'efficacité réduite de la bioconversion du précurseur (18:3, n-3) en acides gras polyinsaturés, surtout en 22:6, n-3, en regard d'une incorporation aisée de ce composé à partir de l'aliment A. Les membranes obtenues de truites carencées en lipides sont apauvries en acides gras (n-3) mais enrichies en saturés et



en acides gras (n-3) dont elles peuvent effectuer la biosynthèse.

Ainsi, avons nous montré que le régime alimentaire peut moduler la composition en acides gras des bordures en brosse intestinales de truite et peut nous fournir différents types de membranes en vue d'étudier leurs propriétés fonctionnelles. Les résultats des mesures in situ de perméabilité au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{Cl}^-$  des bordures en brosse (mesures sur 90 secondes) sont donnés dans le tableau 4.

Les valeurs de captation du  $\text{Na}^+$  sont voisines de celles mesurées par LAHLOU et al. (1975) chez la même espèce, mais contrairement aux mesures effectuées chez d'autres espèces (SMITH et al. 1975) la captation de  $\text{Cl}^-$  n'est pas significativement différente de celle de  $\text{Na}^+$  et cela dans tous les groupes expérimentaux. L'influence du régime alimentaire sur la captation de  $\text{Na}^+$  est évidente chez les truites carencées en acides gras essentiels (C et D) en comparaison des animaux conservés sur régimes riches en acides gras (n-3) (A et B). La même tendance s'observe pour le  $\text{Cl}^-$  mais avec moins de netteté due à la plus grande dispersion des résultats.

Ces résultats permettent d'établir nettement que la perméabilité aux ions des membranes apicales des entérocytes est reliée à leur composition lipidique. Malgré la diversité des modifications induites par le régime alimentaire, il est possible de dégager l'influence prépondérante des acides gras essentiels dans ces phénomènes. En effet, si l'importance des acides gras (n-3) peut être masquée par les teneurs en cholestérol variables si l'on considère les membranes A et C, les différents taux de captation de  $\text{Na}^+$  dans le cas des membranes B et D (ayant la même teneur en cholestérol) montrent le rôle important joué par ces constituants.

Une étude approfondie des caractéristiques cinétiques de la phosphatase alcaline de la bordure en brosse (DI COSTANZO et al. 1983b) dans les quatre lots considérés plus haut a également montré qu'une forte teneur en acides gras essentiels était liée à une faible affinité de l'enzyme pour son substrat et à une coopérativité négative accrue (cas de l'inhibition par le bromotétramisole).

Ce travail souligne donc la possibilité de moduler expérimentalement la composition d'une des barrières qu'offre l'entérocyte aux ions et permet d'envisager une étude plus complète des phénomènes de transport à ce niveau en relation avec la phase lipidique. Puisque l'adaptation des animaux à l'eau de mer dépend en grande partie de l'efficacité de l'absorption intestinale de l'eau et des sels, on comprendra tout l'intérêt d'un pré-conditionnement des animaux en eau douce avec un régime lipidique approprié avant leur transfert en eau de mer où la croissance et la qualité de la chair sont connues pour s'améliorer.

B - EFFET DE L'ADAPTATION A L'EAU DE MER SUR LES PROPRIETES DES MEMBRANES  
INTESTINALES

Etant données les conclusions des recherches précédentes nous avons limité l'étude des effets de l'adaptation à l'eau de mer à deux types de membranes obtenus à partir de truites préalablement nourries en eau douce avec les aliments A et C (respectivement pourvu et carencé en acides gras essentiels).

Les animaux sont transférés rapidement d'eau douce en eau de mer ( $S = 32 \text{ ‰}$ ) et la muqueuse intestinale est prélevée après un séjour de 1, 2 et 7 jours dans ce nouveau milieu (le même aliment est distribué en eau douce et en eau de mer).

L'étude de l'évolution de la natrémie (fig. 1) en eau de mer montre que le milieu intérieur est largement influencé par la qualité des lipides ingérés par les truites. Le plus fort accroissement de la natrémie dès le premier jour en eau de mer chez les animaux pourvus en acides gras essentiels peut être mis en relation avec leur plus forte captation de sel au niveau apical comme il a été vu précédemment. Il est certain qu'une intervention différentielle des cellules branchiales (ionocytes) ne peut être exclue. Lorsque l'évolution de la captation intestinale est analysée (fig. 2), il apparaît nettement qu'une carence alimentaire en acides gras (n-3) (régime C) induit une perméabilisation progressive, nette après deux jours en eau de mer, alors que le phénomène inverse s'observe chez les animaux témoins (régime A). Ces résultats sont ainsi en accord avec la réalité d'un rôle important des acides gras essentiels pour la truite dans les propriétés fonctionnelles de ses membranes entérocytaires. Ce rôle spécifique avait déjà été évoqué comme un des facteurs responsables des différences de composition en acides gras observées entre poissons d'eau douce et d'eau de mer, aussi bien qu'entre poissons d'eau chaude et d'eau froide (CASTELL 1979). Il est à remarquer que seule une étude cinétique des phénomènes d'adaptation peut révéler de telles modifications membranaires puisqu'après un mois en eau de mer (correspondant à une adaptation complète) le taux de captation de  $\text{Na}^+$  a retrouvé la valeur initiale en eau douce. Cette adaptation cellulaire rapide correspond aux nombreuses réponses physiologiques et biochimiques déjà décrites chez la truite en cours d'adaptation à un milieu fortement salé (LERAY et al. 1981).

Il a pu être démontré (LERAY et FLORENTEZ, 1983) que deux jours après le transfert en eau de mer, les changements de perméabilité membranaire ne sont pas associés à une modification de l'activité de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase



intestinale ou du nombre des sites de pompage ionique (sites de fixation d'ouabaine). Les mécanismes d'urgence essentiels pour la survie de l'animal doivent donc être indépendants des synthèses protéiques et paraissent plus limités à une restructuration membranaire par l'intermédiaire des phospholipides. Ces mécanismes d'urgence concourent, semble-t-il chez les animaux témoins, à limiter l'invasion du milieu intérieur par les sels provenant en grande partie de l'eau de boisson. Nous avons également pu exclure de ces mécanismes adaptatifs la phosphatase alcaline et la  $\text{HCO}_3^-$ -ATPase, comme l'avaient supposé OIDE (1973), UTIDA (1967) et MORISAWA (1978) chez l'anguille, puisque l'activité de ces enzymes intestinales décroissent dès le premier jour après le transfert en eau de mer.

Il est certain que cette étude n'est que préliminaire, et que beaucoup d'autres recherches seront nécessaires tant au niveau physiologique (flux ioniques) que biochimique (enzymologie, phospholipides) afin de préciser les liens existant entre acides gras essentiels et absorption intestinale d'eau, de sels et de nutriments (glucose, acides aminés, graisses). D'ores et déjà il apparaît que, chez la truite, la plasticité membranaire peut être mise à profit pour explorer les mécanismes fondamentaux sous-jacents à l'euryhalinité et pour tenter d'améliorer les performances des élevages marins souhaités par les professionnels.

#### C - INFLUENCE DU SEL ALIMENTAIRE SUR LES PROPRIETES DES MEMBRANES INTES- TINALES

La supplémentation en sels du régime des salmonidés a souvent été pratiquée par suite de son utilité potentielle en aquaculture pour améliorer soit la croissance (MAC LEOD, 1978) soit l'adaptation à l'eau de mer (ZAUGG et MAC LAIN 1970, BASULTO 1976). Dans ce dernier cas, l'addition de sel peut être efficace dans le déclenchement des mécanismes osmorégulateurs et constituer ainsi une sorte de préconditionnement des poissons en eau douce avant leur transfert en eau de mer.

Nous avons tout d'abord vérifié que l'addition de NaCl à raison de 10 % dans l'aliment A améliorerait bien la survie des truites en eau de mer. Pour cela nous avons transféré en eau de mer deux lots de 100 truites de poids moyen 70 g après les avoir nourries pendant deux mois avec un régime contrôle (A) ou un régime supplémenté avec 10 % NaCl. La taille des animaux a été choisie afin de limiter leur survie en eau de mer, contrairement aux autres expériences où des animaux de 200-250 g sont utilisés. Il a été ainsi observé (fig. 3) que la durée létale moyenne s'accroît de 18 h à 66 h



après prétraitement au NaCl. Inversement, il a pu être démontré que des truites de 250 g conservées deux mois en eau douce avec un régime dépourvu de NaCl ne pouvait survivre 24 h dans une eau de mer diluée deux fois. Ainsi, ces essais montrent clairement que la fraction salée du régime influence fortement l'adaptation à l'eau de mer et qu'une supplémentation a un effet bénéfique chez cette espèce.

Nous avons par suite procédé à un examen biochimique et physiologique au niveau des membranes intestinales en eau douce. Il a été ainsi observé (tableau 5) que l'addition de sels diminuait significativement le taux de captation apicale de  $\text{Na}^+$  de même que le nombre de sites de pompage actif (fixation d'ouabaine) alors que les activités de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase et de la phosphatase alcaline restent inchangées. Ces modifications peuvent être interprétées comme résultant de mécanismes compensateurs liés à une réduction de l'absorption ionique par la muqueuse intestinale. Ces mécanismes intéressent donc à la fois la perméabilité passive et les transports actifs.

La composition lipidique des membranes de bordure en brosse préparées à partir d'animaux surchargés en NaCl en eau douce révèle d'importantes modifications aussi bien au niveau de la composition globale (tableau 6) qu'au niveau de la composition en acides gras (tableau 7). Si l'accroissement notable de la teneur en sphingomyéline doit contribuer à réduire la fluidité membranaire et par conséquent sa perméabilité aux ions (BARENHOLZ et THOMSON 1980), la diminution du rapport cholestérol/phospholipide tend à réduire cet effet. Il est remarquable que la proportion des acides gras essentiels s'accroît sous l'effet d'une surcharge alimentaire de NaCl pendant que l'insaturation globale des acides gras diminue. Les conséquences de ces perturbations sur les propriétés fonctionnelles de la bordure en brosse ne peuvent présentement être évaluées. L'étendue des antagonismes entre constituants membranaires ne pourra être élucidée qu'après expérimentation sur liposomes. Bien que le mécanisme d'action d'une surcharge salée orale ne soit pas encore élucidé, notre étude a révélé la capacité de ce sel à induire des modifications à long terme dans la composition des membranes intestinales altérant ainsi leurs fonctions à l'interface de milieu de compositions différentes. Ces recherches devront être complétées par l'évaluation des flux transépithéliaux de NaCl et surtout, en s'inspirant des recherches précédentes en milieu salé, par une étude de l'évolution des adaptations fonctionnelles et biochimiques de la muqueuse intestinale immédiatement après addition de sel à la ration alimentaire. Ainsi, la comparaison des effets d'une surcharge salée en fonction du mode d'ap-

plication (environnement ou aliment) permettra sans nul doute de mieux comprendre le rôle de l'intestin dans l'équilibre osmotique des poissons euryhalins.

#### CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux souligne l'intérêt d'une étude conjointe des phénomènes osmotiques et des structures membranaires en portant l'accent sur l'intérêt de préciser les besoins nutritionnels des poissons en eau douce comme en eau de mer, afin de pouvoir utilement sélectionner les composants requis pour le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'animal.

L'efficacité du préconditionnement des poissons en eau douce par l'addition de sel à la ration alimentaire est un guide pour de futures expériences qui devront intéresser en priorité les composés lipidiques. Ces derniers peuvent donc désormais être considérés fondamentaux dans l'établissement des fonctions de transport au niveau épithélial en plus de leur rôle important en tant que source énergétique traditionnelle.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide financière du CNRS et du CNEOX (contrat n° 81/2496) et de l'aide technique de Mademoiselle L. DEBELLEMANNIÈRE, Madame G. GUTBIER et Monsieur R. MEENS.

- 
- AULL F. (1966) Absorption of fluid from isolated intestine of the toadfish *Opsanus tau*.  
Comp. Biochem. Physiol. 17 : 867-870.
- BARENHOLZ J. and THOMSON T.E. (1980) Sphingomyelins in bilayer of biological membrane.  
Biochim. Biophys. Acta 604 : 129-158.
- BASULTO S. (1976) Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in the feeding of atlantic salmon (*Salmo salar* L.).  
Aquaculture 8 : 45-55.
- CASTELL J.D. (1979) Review of lipid requirement of finfish. In : Halver J. and Tiews K. (ed)  
Proc. world symp. on finfish nutrition and fishfeed technology vol. 1  
Heinemann Verlag, Berlin, p 59.
- CASTELL J.D., LEE D.J. and SINNHUBER R.O. (1972a) Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : lipid metabolism and fatty acid composition.  
J. Nutr. 102 : 93-100.



- CASTELL J.D., SINNHUBER R.O., LEE D.J. and WALES J.H. (1972b) Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (Salmo gairdneri) : physiological symptoms of EFA deficiency.  
J. Nutr. 102 : 87-92.
- CASTLEDINE A.J. and BUCKLEY J.T. (1980) Distribution and mobility of  $\omega$  3 fatty acids in rainbow trout fed varying levels and types of dietary lipid.  
J. Nutr. 110 : 675-685.
- CASTLEDINE A.J. and BUCKLEY J.T. (1982) Incorporation and turnover of essential fatty acids in phospholipids and neutral lipids of rainbow trout.  
Comp. Biochem. Physiol. 71 B : 119-126.
- DI COSTANZO G., FLORENTZ A., LERAY C. and NONNOTTE L. (1983) Structural and functional organization of the brush border membrane in the rainbow trout intestine.  
Molec. Physiol. 4 : 111-123.
- DI COSTANZO G., DUPORTAIL G., FLORENTZ A. and LERAY C. (1983) The brush border membrane of trout intestine : influence of its lipid composition on ion permeability, enzyme activity and membrane fluidity.  
Molec. Physiol. 4 : 279-290.
- ELLORY J.C., LAHLOU B. and SMITH M.W. (1972) Changes in the intestinal transport of sodium induced by exposure of goldfish to a saline environment.  
J. Physiol. London 222 : 497-509.
- FIELD M., SMITH P.L. and BOLTON J.E. (1980) Ion transport across the isolated intestinal mucosa of the winter flounder, Pseudopleuronectes americanus : II. Effects of cyclic AMP.  
J. Membr. Biol. 55 : 157-163.
- FLORENTZ A. (1982) Relations acides gras essentiels et échanges ioniques transmembranaires au niveau de l'intestin de la truite arc en ciel lors de son transfert en eau de mer.  
Thèse de cycle, Strasbourg.
- HAZEL J.R. (1979) Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver.  
Ann. J. Physiol. 261 : R 91-R 101.
- HIRANO T., MORISAWA M., ANDO H. and UTIDA S. (1976) Adaptive changes in ion and water transport mechanism in the eel intestine.  
In : Robinson J.W. (ed) Intestinal ion transport.  
MTP Press, Lancaster, p 301.
- HOSSLER F.E., SARRAS M.P. and BARNETT R.J. (1978) Ouabain binding during plasma membrane biogenesis in duck salt gland.  
J. Cell Sci. 31 : 179-197.
- HOUSE C.R. and GREEN K. (1965) Ion and water transport in isolated intestine of the marine teleost, Cottus scorpius.  
J. Exp. Biol. 42 : 177-189.



- LAHLOU B. (1976) Ionic permeability of fish intestinal mucosa in relation to hypophysectomy and salt adaptation.  
In : Robinson J.W. (ed) Intestinal ion transport.  
MTP Press, Lancaster, p 318.
- LAHLOU B., CRENESSE D., BENSANLA-TALET A. and PORTHE-NIBELLE J. (1975) Adaptation de la truite d'élevage à l'eau de mer. Effets sur les concentrations plasmatiques, les échanges branchiaux et le transport intestinal du sodium.  
J. Physiol. Paris 70 : 593-603.
- LERAY C., COLIN D.A. and FLORENTZ A. (1981) Time course of osmotic adaptation and gill energetics of rainbow trout (Salmo gairdneri R.) following abrupt changes in external salinity.  
J. Comp. Physiol. 144 : 175-181.
- LERAY C. and FLORENTZ A. (1983) Biochemical adaptation of trout intestine related to its ion transport properties. Influence of dietary salt and fatty acids, and environmental salinity.  
in : Gilles-Baillien M. and Gilles R. (eds) Intestinal transport,  
Springer-Verlag Berlin, p. 354.
- MACKAY W.C. and JANICKI R. (1979) Changes in the eel intestine during seawater adaptation.  
Comp. Biochem. Physiol. 62 A : 757-761.
- MACKAY W.C., LAHLOU B. and PORTHE-NIBELLE J. (1978) AMP cyclique et contrôle des échanges ioniques au niveau de l'intestin de poisson.  
C. R. Acad. Sc. Paris 287 : 1239-1242.
- MACLEOD M.G. (1978) Relationships between dietary sodium chloride food intake and food conversion in the rainbow trout.  
J. Fish Biol. 13 : 73-76.
- MAINOYA J.R. (1982) Water and NaCl absorption by the intestine of the tilapia Sarotherodon mossambicus adapted to fresh water or seawater and the possible role of prolactin and cortisol.  
J. Comp. Physiol. 146 : 1-7.
- MORISAWA M. (1978) Changes in activity of  $\text{HCO}_3^-$ -activated adenosine triphosphatase in intestinal mucosa of the eel during seawater adaptation.  
Annot. Zool. Jap. 51 : 5-9.
- MORISAWA M. and UTIDA S. (1976)  $\text{HCO}_3^-$ -activated adenosine triphosphatase in intestinal mucosa of the eel.  
Biochem. Biophys. Acta 445 : 458-463.
- OIDE M. (1967) Effects of inhibitors on transport of water and ion in isolated intestine and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in intestinal mucosa of the eel.  
Annot. Zool. Jap. 40 : 130-135.
- OIDE M. (1973) Role of alkaline phosphatase in intestinal water absorption by eels adapted to seawater.  
Comp. Biochem. Physiol. 46 A : 639-645.

- SCHMITZ J., PREISER H., MAESTRACCI D., GHOSH B.K., CERDA J.J. and CRANE R.K. (1973) Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 323 : 98-112.
- SCHULTZ S.G., CURRAN P.F., CHEZ R.A. and FUISZ R.E. (1967) Alanine and sodium fluxes across mucosal border of rabbit ileum. *J. Gen. Physiol.* 50 : 1241-1260.
- SHARRATT B.M., BELLAMY D. and JONES I.C. (1964) Adaptation of the silver eel (Anguilla anguilla L.) to sea water and to artificial media together with observations on the role of the gut. *Comp. Biochem. Physiol.* 11 : 19-30.
- SHEHADEH Z.H. and GORDON M.S. (1969) The role of the intestine in salinity adaptation of the rainbow trout, Salmo gairdneri. *Comp. Biochem. Physiol.* 30 : 397-418.
- SKADHAUGE E. (1969) The mechanism of salt and water absorption in the intestine of the eel (Anguilla anguilla) adapted to waters of various salinities. *J. Physiol. London* 204 : 135-158.
- SMITH M.W. (1964) The in vitro absorption of water and solutes from the intestine of goldfish, Carassius auratus. *J. Physiol. London* 175 : 38-49.
- SMITH M.W., ELLORY J.C. and LAHLOU B. (1975) Sodium and chloride transport by the intestine of the european flounder Platichthys flesus adapted to fresh or sea water. *Pflügers Arch.* 357 : 303-312.
- UTIDA S. (1967) Effect of sodium chloride on alkaline phosphatase activity in intestinal mucosa of the rainbow trout. *Proc. Jap. Acad.* 43 : 783-788.
- UTIDA S. and ISONO N. (1967) Alkaline phosphatase activity in intestinal mucosa of the eel adapted to fresh water or sea water. *Proc. Jap. Acad.* 43 : 789-792.
- UTIDA S., OIDE M. and OIDE H. (1968) Ionic effects on alkaline phosphatase activity in intestinal mucosa with special reference to seawater adaptation of the japanese eel Anguilla japonica. *Comp. Biochem. Physiol.* 27 : 239-249.
- YU T.C. and SINNHUBER R.O. (1975) Effect of dietary linolenic and linoleic acids upon growth and lipid metabolism of rainbow trout (Salmo gairdneri). *Lipids* 10 : 63-66.
- ZAUGG W.S. and MACLAIN L.R. (1970) Adenosine triphosphatase activity in gills of salmonids : seasonal variations and salt water influence in Coho salmon, Oncorhynchus kisutch. *Comp. Biochem. Physiol.* 35 : 587-596.

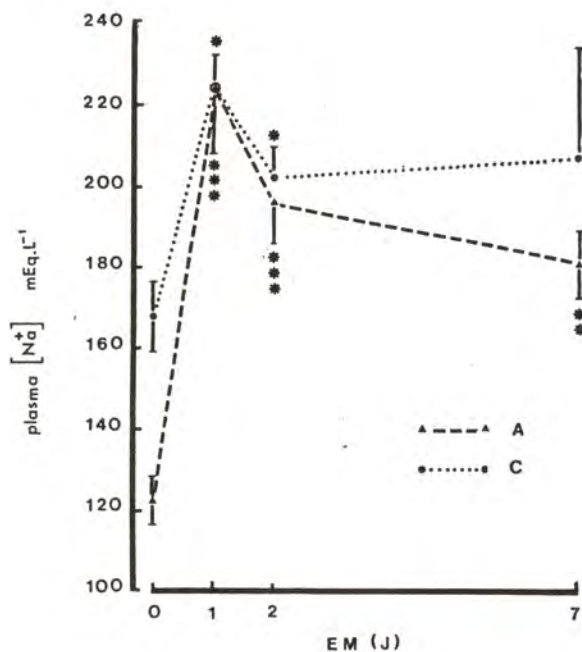


Fig. 1 - Evolution de la natrémie, après transfert en eau de mer de truites nourries avec un aliment pourvu (A) ou carencé (C) en acides gras essentiels.

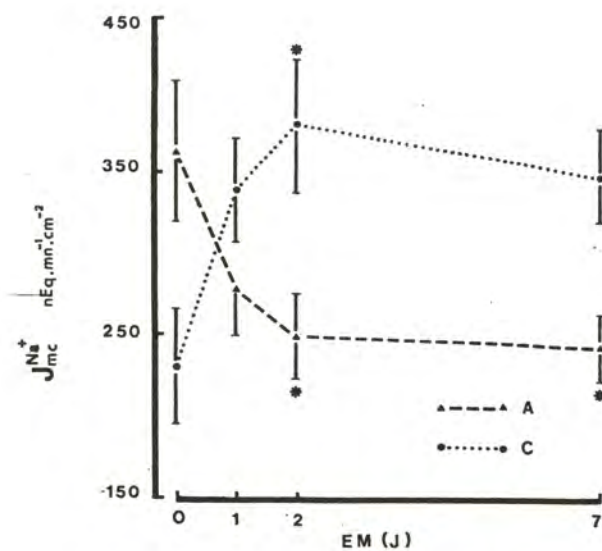


Fig. 2 - Evolution de la captation apicale de Na<sup>+</sup> ( $J_{mc}^{Na^+}$ ) après transfert en eau de mer de truites nourries avec un aliment pourvu (A) ou carencé (C) en acides gras essentiels.



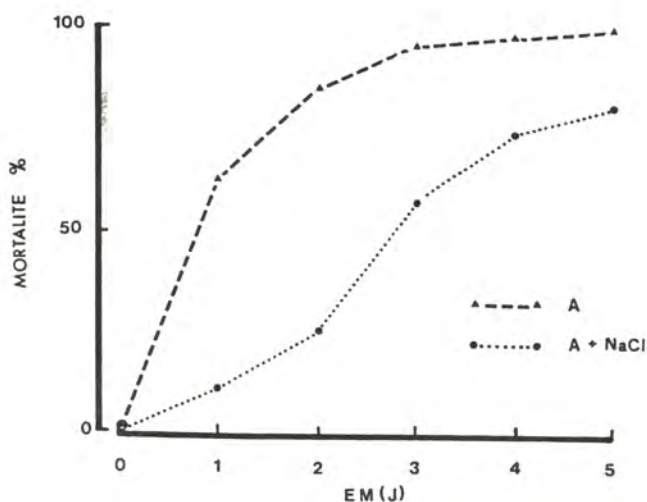


Fig. 3 - Effet du transfert en eau de mer sur la survie de jeunes truites nourries avec un aliment témoin (A) ou additionné de 10 % NaCl (A + NaCl).

Tableau 1 : Composition en acides gras (molé %) des lipides alimentaires.

Les acides gras sont introduits sous forme d'huile de foie de morue (A), d'huile de lin (B) et d'huile de pépin de raisin (C) à raison de 8 % dans l'aliment. Dans le régime D, la dextrine remplace pondéralement les lipides.

Acides gras	Régime			
	A	B	C	D
sat.	4.6	10.1	8.5	0
n-9	52.5	15.6	13.6	0
n-6	0.6	15.1	77.6	0
n-3	29.2	59.2	0.4	0
n-3/insat.	0.30	0.66	0.004	-
n-3/n-6	0.48	3.92	0.005	-

Tableau 2 : Composition en phospholipides (PL) et en cholestérol (CHOL) des membranes de bordure en brosse isolées chez des truites nourries en eau douce.

*PL/Protéine est sur la base poids, CHOL/PL sur la base molaire. Les phospholipides sont exprimés en % du P lipidique. PE, phosphatidylethanolamine ; PC, phosphatidylcholine ; PI, phosphatidylinositol ; SP, sphingomyéline.*

Régime	$\frac{PL}{Proteine}$	$\frac{CHOL}{PL}$	PE	PC	PI	SP
A	0.50	0.98	28.5	34.6	19.6	6.5
B	0.35	0.97	33.0	26.8	19.0	9.8
C	0.27	1.58	26.9	40.2	15.1	6.9
D	0.38	0.90	33.7	33.3	16.7	6.2

Tableau 3 : Composition en acides gras (mole %) des phospholipides des membranes de bordure en brosse chez des truites nourries en eau douce.

*DL, nombre de double liaisons pour 100 moles d'acides gras.*

Régime	Acides gras				$\frac{n-3}{n-6}$	$\frac{insat.}{sat.}$	$\frac{DL}{sat.}$	$\frac{DL}{insat.}$
	sat.	n-9	n-6	n-3				
A	39.6	11.9	10.5	34.0	3.24	1.52	6.3	4.1
B	63.6	3.0	13.2	19.8	1.50	0.57	2.5	4.4
C	38.4	14.5	37.2	9.4	0.25	1.57	4.8	3.1
D	55.1	17.1	14.4	11.4	0.79	0.81	2.4	3.0

Tableau 4 : Captation apicale de sodium et de chlore,  $J_{mc}$ , dans l'intestin moyen de truites nourries

en eau douce.

$n$ , nombre de truites. Chaque valeur ( $n \text{ Eq. min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) est la moyenne  $\pm$  S.E. de 4 mesures à chaque fois sur  $n$  truites.  $a, b$  : différence significative ( $P < 0.05$ ) avec les valeurs respectivement des lots A et B.

Régime	A	B	C	D
$n$	5	5	4	6
$J_{mc}^{\text{Na}^+}$	365 $\pm$ 46	421 $\pm$ 28	232 $\pm$ 36 <sup>a</sup>	282 $\pm$ 40 <sup>b</sup>
$J_{mc}^{\text{Cl}^-}$	381 $\pm$ 53	528 $\pm$ 70	240 $\pm$ 44	288 $\pm$ 46

Tableau 5 : Captation apicale de Na ( $J_{mc}^{\text{Na}^+}$ ) et activités enzymatiques dans la muqueuse de l'intestin moyen chez des truites nourries en eau douce.

$J_{mc}^{\text{Na}^+}$  sont exprimés en  $n\text{Eq. mn}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\text{nmole. mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protéine, la liaison de l'ouabaïne en  $\text{pmole. mg}^{-1}$  protéine selon HOSSLER et al. (1978).

Régime	$n$	$J_{mc}^{\text{Na}^+}$	$\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$	Ouabaïne liée	Phosphatase alcaline (NaCl)
A	10	469 $\pm$ 17	13.7 $\pm$ 2.3	2.9 $\pm$ 0.2	91.4 $\pm$ 13.7
A + NaCl	9	414 $\pm$ 9	12.3 $\pm$ 1.3	2.1 $\pm$ 0.2	64.4 $\pm$ 9.5
		$p < 0.05$		$p < 0.05$	



Tableau 6 : Composition en phospholipides et en cholestérol des membranes de bordure en brosse isolées chez des truites nourries en eau douce.

Même légende que tableau 2.

Régime	$\frac{\text{CHOL}}{\text{PL}}$	PE	PC	PI	SP
A	0.98	28.5	34.6	19.6	6.5
A + NaCl	0.75	26.6	32.5	20.5	11.8

Tableau 7 : Composition en acides gras des phospholipides totaux des bordures en brosse isolées chez des truites nourries en eau douce.

PUFA, ac. gras polyinsaturés à longue chaîne ; DL, nombre de double liaisons pour 100 moles d'ac. gras.

Régime	AG composition (mole %)				$\frac{\text{n-3}}{\text{n-6}}$	$\frac{\text{n-3}}{\text{insat.}}$	PUFA	$\frac{\text{insat.}}{\text{sat.}}$	$\frac{\text{DL}}{\text{sat.}}$	$\frac{\text{DL}}{\text{insat.}}$
	sat.	n-9	n-6	n-3						
A	39.6	11.9	10.5	34.0	3.24	0.56	38.2	1.52	6.3	4.1
A + NaCl	43.8	7.5	7.5	39.4	5.23	0.70	44.9	1.28	6.2	4.8

- ETUDE CYTOLOGIQUE ULTRASTRUCTURALE DES ANOMALIES  
HEPATIQUES DU LOUP, DE LA DAURADE ET DE L'ANGUILLE,  
INDUITES PAR UNE ALIMENTATION ARTIFICIELLE.

N. BAC, S. BIAGIANTI et J. BRUSLE (1)

**RESUMÉ :** Chez les trois espèces étudiées, l'alimentation artificielle (granulés secs) induit des perturbations hépatiques qui ont été analysées à l'échelle ultrastructurale. Les anomalies hépatocytaires consistent surtout en une accumulation de lipides, sous la forme de nombreux et volumineux liposomes, qui traduit une déviation du métabolisme des acides gras. Elles s'accompagnent de lésions cellulaires (altérations mitochondriales, pycnoses nucléaires) correspondant à des phénomènes de dégénérescence.

Il serait intéressant de savoir si ces modifications hépatocytaires révèlent une simple réponse physiologique à une alimentation déséquilibrée ou bien reflètent des atteintes organiques graves (pathologie nutritionnelle).

**ABSTRACT :** In the three species, an artificial feeding (dry pellets) disturbs liver cells as revealed at ultrastructural level. In hepatocytes, anomalies consist of lipids storage (liposomes) considered as deviation in fatty acids metabolism. Moreover are observed cellular alterations (mitochondrial vacuolization, nuclear pycnosis) related to degenerative process.

It is of great interest to understand whether liver modifications are just a reaction to an unbalanced feeding or a true trophic pathology.

**MOTS-CLES :** Loup, Daurade, Anguille, Alimentation artificielle, Foie, Cytologie et Cytopathologie, Lipides.

**KEY WORDS :** Sea-bass, Sea-bream, Eel, Artificial feeding, Liver, Cytology and Cytopathology, Lipids.

---

(1) Laboratoire de Biologie marine, Université de Perpignan.

## INTRODUCTION

D'une façon générale, l'élevage des poissons d'eau douce ou marins fait largement appel à une **alimentation artificielle**, adoptée en raison de ses avantages de stockage et de distribution. Toutefois, ces aliments, le plus souvent présentés sous forme de granulés secs (ou "pellets") sont parfois responsables de certains **déséquilibres nutritionnels** tels que des déficiences vitaminiques (Steffens, 1974, Dabrowski, 1977) et des surcharges graisseuses liées au métabolisme des lipides (Takeuchi et al., 1980; Roche et al., 1982). Les aquaculteurs rencontrent encore actuellement des problèmes quant au choix de l'aliment le plus favorable à des taux de croissance élevés et le mieux adapté au maintien de qualités sanitaires et organoleptiques convenables.

Les effets de l'alimentation artificielle ont été étudiés sur le **foie**, car celui-ci constitue un **organe-clé** d'importance vitale, qui intervient à plusieurs niveaux essentiels de la physiologie du poisson (nutrition, reproduction, métabolisme général...). Le foie est, de plus, considéré comme **organe-cible** vis à vis de diverses substances toxiques et d'agents infectieux ou parasitaires. Ainsi, le tissu hépatique peut-il subir des atteintes d'origines parasitaire (Maillard, 1976), toxicologique (Narbonne et al., 1979) et nutritionnelle (Ghittino, 1978 ; Stroband et Dabrowski, 1979). Les hépatocytes constituent alors de bons indicateurs de la situation nutritionnelle du poisson et sont susceptibles de fournir des informations très utiles quant à la qualité et à la quantité des aliments offerts en élevage (Storch et al., 1983).

Ce travail se propose de comparer, chez plusieurs espèces d'intérêt aquacole (le Loup, *Dicentrarchus labrax*, la Daurade, *Sparus aurata* et l'Anguille, *Anguilla anguilla*), les foies d'individus sauvages et d'individus d'élevage provenant de diverses piscicultures marines régionales. Il s'agit de déceler d'éventuelles **perturbations structurales hépatiques** induites par des **déséquilibres métaboliques d'origine nutritionnelle** liés à une **alimentation artificielle**.

Les caractères cytologiques des hépatocytes, et en particulier leurs réserves lipidiques et glucidiques, ont été comparés, à l'échelle ultrastructurale, en fonction de l'alimentation (naturelle ou artificielle).

## MATERIEL ET METHODES

Trois espèces d'intérêt aquacole ont été étudiées: le Loup (*Dicentrarchus labrax*), la Daurade (*Sparus aurata*) et l'Anguille (*Anguilla anguilla*).



## A - LES MILIEUX D'ECHANTILLONNAGE

### 1) Les milieux naturels :

Les Loups et Daurades sauvages proviennent soit du milieu marin (littoral de Banyuls-sur-mer), soit du milieu lagunaire (étang de Salses-Leucate). Les Anguilles ont été prélevées dans les étangs de Salses-Leucate et du Bourdigou.

### 2) Les élevages :

Les exploitations piscicoles utilisent des modalités d'élevage très variées : système de bassins à terre ("Méditerranée-Pisciculture" à Salses ; "entente des Prud'Homies de Bages-Port-La-Nouvelle") ou cages en mer : flottantes ("Cie les Caps du Roussillon" à Banyuls-sur-mer) ou immergées ("Mairie et Prud'Homie de St Cyprien").

Les Anguilles proviennent d'élevages expérimentaux en bassins cimentés réalisés à "Méditerranée Pisciculture" (Roche, 1983).

## B - LES ALIMENTS :

Les trois espèces étudiées sont carnivores dans le milieu naturel. *Dicentrarchus labrax* se nourrit de proies animales variées au cours de sa phase juvénile puis devient progressivement carcinophage et ichthyophage (Barnabé, 1976 ; Roblin, 1980). *Sparus aurata* est une espèce essentiellement malacophage (Arias, 1980).

*Anguilla anguilla*, espèce opportuniste, consomme aussi bien des annélides que des mollusques, des crustacés ou des insectes (Lecomte-Finiger, 1983).

L'alimentation artificielle utilisée dans les élevages de Loups et de Daurades est un "aliment composé complet" de marque "Aqualim". Les élevages expérimentaux d'Anguilles reçoivent deux types d'aliment : l'un "naturel" : déchets d'abattoirs (foie de boeuf), l'autre artificiel : pâte commerciale "Aqualim".

## C - ANATOMIE, CYTOLOGIE DU FOIE :

Les foies prélevés sur le vivant sont traités pour une part en vue d'observations histologiques (coupes à la paraffine ou coupes semi-fines dans l'épon), l'autre part étant destinée à la cytologie ultrastructurale. Des fragments de petite taille (de l'ordre du mm) sont prélevés et aussitôt fixés au glutaraldéhyde (2 %) dans un tampon cacodylate de sodium pendant 4 h à 4°C. Du chlorure de calcium a été ajouté au tampon selon Fusson-Mabillot (1971). Les échantillons sont ensuite lavés (tampon cacodylate de sodium + saccharose), puis post-fixés au tétr oxyde d'osmium OsO<sub>4</sub> (2%) dans du tampon cacody-

late (1 heure à température ambiante). La déshydratation se fait à l'acétone et l'inclusion dans l'épon. Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle (1/2 heure) et au citrate de plomb (10 mn) (Reynolds, 1963). Les observations sont réalisées sur un microscope électronique Hitachi (HU 12 A).

## RESULTATS

### 1) Poissons sauvages :

L'organisation cellulaire du foie, chez les trois espèces étudiées, se caractérise (planche 1, fig.1) par une forme assez régulièrement polygonale des hépatocytes. La membrane plasmique présente de nombreuses microvillosités au niveau des canalicules biliaires et des sinusoides. Le noyau central est sphérique et pourvu d'un nucléole bien individualisé et d'une chromatine périnucléaire dense. Les mitochondries sont nombreuses et régulièrement réparties dans le cytoplasme ; elles possèdent une matrice dense et des crêtes bien développées. Le glycogène constitue l'essentiel des réserves hépatocytaires, sous forme de granules denses (osmiophiles), uniformément répartis dans le cytoplasme. On observe, de plus, quelques globules lipidiques de petite taille (de l'ordre de  $1\mu\text{m}$ ) très osmiophiles.

### 2) Poissons d'élevage :

#### a - le Loup, *Dicentrarchus labrax* : (planche 1, fig. 2)

L'examen des micrographies hépatiques révèle des **modifications hépatocytaires**. Ainsi, le parenchyme hépatique se caractérise par une augmentation spectaculaire, en nombre et en taille (environ  $5\mu\text{m}$ , soit de l'ordre du diamètre du noyau et même au-delà) des **globules lipidiques** qui sont relativement homogènes et faiblement osmiophiles. On constate d'autre part une diminution de la quantité de glycogène. De plus, apparaissent, au sein du cytoplasme, des structures composées d'un matériel dense ainsi que de nombreuses fibres assimilées à des "lysosomes-like-bodies".

#### b - la Daurade, *Sparus aurata* : (planche 2, fig. 1, 2 et 3)

Les modifications ultrastructurales les plus importantes concernent les réserves hépatocytaires, sous la forme de nombreux **globules lipidiques** de tailles et de densités variables selon les individus. Deux cas peuvent être distingués : chez les uns, les globules lipidiques, de petite taille ( $2\mu\text{m}$  environ) et faiblement osmiophiles, sont groupés par plages et parfois coalescents. Chez d'autres, les inclusions sont de plus grande taille (jusqu'à  $8\mu\text{m}$ ), supérieure à celle du noyau, et caractérisées par leur hétérogénéité et par une forte osmiophilie. On note de plus une disparition du glycogène et un développement du réticulum endoplasmique granulaire, concentriquement

au noyau et aux mitochondries. Les noyaux des hépatocytes de cette dernière catégorie manifestent des symptômes de **pycnose** (forme irrégulière et forte densité électronique) alors que ceux du premier type apparaissent comparables aux témoins.

c - L'Anguille, *Anguilla anguilla* : (planche 3)

On remarque d'abord l'existence de nettes différences entre hépatocytes voisins. Certains présentent un aspect normal comparable aux témoins. D'autres, au contraire se caractérisent par des **accumulations lipidiques** plus ou moins importantes.

Chez ceux nourris au foie de boeuf, les globules lipidiques sont volumineux (4  $\mu\text{m}$ ) et nettement coalescents, formant des plages faiblement osmiophiles qui envahissent la cellule et entourent le noyau (planche 3, fig. 1 et 2). Une partie du chondriome manifeste une nette vacuolisation (plus grand diamètre, matrice très claire, absence de crêtes : planche 3, fig. 2). Les réserves glycogéniques ne semblent cependant pas affectées.

Chez les individus nourris à la pâte, on peut observer, quoique plus rarement, ce même type de perturbations. Les hépatocytes ne montrent, le plus souvent, aucune atteinte cytoplasmique. Par contre, des anomalies nucléaires (noyau à contours irréguliers à forte densité électronique avec des amas chromatiniens) sont observées traduisant une évolution pycnotique (planche 3, fig. 3).

## DISCUSSION

La comparaison entre poissons sauvages et poissons de pisciculture fait apparaître, dans les trois espèces étudiées, des **modifications hépatocytaires** chez les individus maintenus **en élevage**. Les hépatocytes de tous les échantillons traités de cette provenance présentent en commun des caractères ultrastructuraux (développement de liposomes, réduction des réserves glycogéniques et éventuellement altérations nucléaires et mitochondriales) que ne montrent jamais les individus pêchés dans le milieu naturel. L'alimentation **artificielle** constituant le paramètre commun des échantillons d'élevage, le **facteur nutritionnel** semble impliqué dans l'apparition des perturbations anatomophysiologiques du foie.

Du point de vue **anatomique**, leurs foies présentent une couleur anormalement pâle, précédemment signalée chez la Truite par Castell et al. (1972) et chez la Daurade par Paperna et al., (1977), ce symptôme étant celui d'un mauvais équilibre alimentaire d'après Sinnhuber (1969).

Les observations **histologiques** montrent la présence d'une **vacuolisation hépatique** très importante et le plus souvent généralisée à l'ensemble du parenchyme, les "vacuoles" correspondant à la dissolution des globules lipidiques par les traitements



chimiques (paraffine). Leurs contours et leur contenu sont bien visualisables sur coupes semi-fines. De telles images ont été précédemment décrites chez l'Omble, *Salvelinus fontinalis* (Ghittino, 1978) et chez la Daurade, *Sparus aurata*, par Paperna et al. (1977).

A l'échelle **cytologique**, le développement de nombreux et volumineux **liposomes** constitue la caractéristique essentielle des hépatocytes des poissons d'élevage. Une telle accumulation de lipides intrahépatocytaires vient seulement d'être tout récemment décrite à l'échelle ultrastructurale par Storch et al. (1983) sur *Chanos*.

Les modifications structurales observées dans ces hépatocytes témoignent de **perturbations métaboliques** induites par les conditions d'élevage et notamment par des **déséquilibres alimentaires**. Ceux-ci concernent le métabolisme des **lipides** (Leger et Fremont, 1979 ; Watanabe, 1952), tant du point de vue **quantitatif** (excès de nourriture riche en graisses) que **qualitatif** (nature et taux d'acides gras). Les lipides alimentaires jouent en effet un rôle très important, comme source des acides gras essentiels, nécessaires à la production d'énergie qui, chez les poissons carnivores, dépend plus des lipides que des glucides et permet d'économiser sur les besoins protéiques (Watanabe, 1982). Le foie constitue alors le site majeur des synthèses d'acides gras et les changements touchant la nature et la proportion des acides gras sont rapides, en réponse immédiate à la composition du régime alimentaire. La composition des acides gras hépatiques reflète donc celle des acides gras apportés par la nourriture, de sorte que les hépatocytes sont particulièrement sensibles à toute perturbation nutritionnelle (Stroband et Dabrowski, 1979).

Des dosages d'acides gras tissulaires chez diverses espèces d'élevage (Truite : Castell et al., 1972 ; Anguille : Usui, 1972, Polesello et al., 1977, Takeuchi et al., 1980 ; Loup : Roche, 1980, Roche et al., 1983 ; Loup et Daurade : Alliot et al., 1983a) ont montré des anomalies quant aux taux et à la nature des acides gras hépatiques, par rapport aux individus sauvages à nourriture naturelle. La nature et la quantité des **lipides fournis par l'aliment artificiel** (8 à 12 % en poids sec : Alliot et al., 1983a) ont donc été mis en cause. Une telle **surcharge grasseuse hépatique** est en effet extrêmement fréquente chez les poissons d'élevage (mais aussi chez d'autres vertébrés comme la tortue *Chelonici* nourrie par des granulés artificiels : Challicl et al., 1983) et résulte, selon les espèces, soit d'une déficience en acides gras essentiels (Castell et al., 1972 ; Takeuchi et al., 1979 ; Yu et Sinnhuber, 1979), soit d'un excès en acides gras des séries W3 et W6 dans la nourriture (Fuji et Yone, 1976 ; Fuji et al., 1976). Il convient d'ailleurs de noter que les espèces marines présentent des besoins en acides gras et des capacités métaboliques bien distinctes de ceux des espèces d'eau douce, leurs aptitudes de bioconversion par désaturation en élongation des chaînes d'acides gras étant inférieures, chez la Daurade et le Loup, à ce qu'elles sont chez la Truite et le Saumon (Leger et Frémont, 1981, Watanabe, 1982).

Les conséquences de cette accumulation de lipides hépatiques et de cette surcharge tissulaire en acides gras sont le développement de nombreux et volumineux **liposomes intrahépatocytaires**. Leur présence peut être considérée comme une **simple réponse physiologique** à la composition de l'aliment, comme une adaptation métabolique à une situation trophique anormale (Yu et Sinnhuber, 1976), par comparaison avec les poissons sauvages. Cet état se révélerait alors réversible dans le cas d'un retour à une alimentation mieux équilibrée (Paperna et al., 1977). Cet accroissement de la charge lipidique hépatique s'accompagne cependant ici de **lésions cellulaires graves** (atteintes mitochondriales, productions lysosomiales, corps résiduels et surtout pycnoses nucléaires) susceptibles de conduire à des processus dégénératifs importants présentant certaines similitudes avec des atteintes bactériennes ou virales et avec des intoxications chimiques. Ces phénomènes peuvent donc alors être considérés comme une **véritable pathologie nutritionnelle** décrite d'ailleurs, chez diverses espèces aquacoles, le plus souvent sur de simples critères anatomiques, comme "degenerazione lipoidea epatica" (DLE) ou "liver lipid degeneration" (LLD) par Ghittino (1978), "liver fat degeneration" (Acuigrup, 1981) et "lipid liver disease" (Storch et al., 1983).

L'importance physiologique de telles atteintes organiques est considérable, tant en raison des effets directs (réduction du stockage de glycogène, diminution de la détoxification cellulaire) qu'indirecte (accroissement de la pathogénicité, diminution des taux d'éclosion des oeufs produits par ces géniteurs). Le développement de l'aquaculture justifie qu'une attention toute particulière soit portée aux **maladies nutritionnelles** induites par l'alimentation artificielle, en ce qui concerne la quantité distribuée et ingérée et la qualité du granulé (composition chimique des ingrédients mais aussi conditions de conservation). La durée et les conditions du stockage de l'aliment artificiel sont des facteurs à prendre en considération, les lipides rances, par oxydation des graisses, sont en effet responsables de troubles organiques sérieux ("ceroidosis" = Smith, 1979 -"panstéatitidis"= Roberts et al., 1979).

Ainsi, il apparaît nécessaire de mieux cerner les étapes de l'accumulation des liposomes et les séquences chronologiques des lésions cellulaires. De plus, il convient de préciser la **réversibilité** de ces atteintes structurales et métaboliques, en particulier chez les espèces aquacoles marines particulièrement sensibles, comme le Loup, aux fluctuations de la salinité (Roche et al., 1983) et de la température (Alliot et al., 1983b). La réussite commerciale des expériences d'aquaculture marine passe donc par une meilleure compréhension de ces facteurs limitants et par une meilleure connaissance des qualités nutritionnelles des aliments artificiels adaptés à chacune des espèces en élevage.



- Acuigrup , 1981 - Aspects of fish pathology in Spain, with application to other geographic areas. World conference on aquaculture. Venise, 21-25 septembre 1981.
- Alliot E., Pastoureaud A., 1983a - Les besoins alimentaires et leur couverture chez le Bar et la Daurade. Colloque l'Aquaculture du Bar et des Sparidés, Sète.
- Alliot E., Pastoureaud A., Thebault H., 1983b - Influence de la température et de la salinité sur la croissance et la composition corporelle d'Alevins de *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 31, p. 181-194.
- Arias A., 1980 - Crecimiento, regimen alimentario y reproduccion de la Dorada, *Sparus aurata* L., y del Robalo, *Dicentrarchus labrax* L., en los esteros de Cadiz. Inv. Pesq., 44, (1), p. 59-83.
- Barnabé G., 1976 - Contribution à la connaissance de la biologie du Loup, *Dicentrarchus labrax*. Thèse de Doct. d'Etat, Montpellier, 407 p.
- Busson-Mabillot S., 1971 - Influence de la fixation chimique sur les ultrastructures. I. Etude sur les organites du follicule ovarien d'un Poisson Téléostéen. J. Micr., 12, p. 317-347.
- Castell J.D., Sinnhuber R.D., Wales J.H., Lee D.J., 1972 - Essential fatty acids in the diet of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Growth, feed and some gross deficiency symptoms. J. Nutrition, 102, p. 77-86.
- Challiol J., Guerre M., Bonnet B., Pajaniaye A., 1983 - Les lipides de la Tortue verte, *Chelonia mydas* L. : comparaison entre animaux sauvages et animaux d'élevage. Ann. Fals. Exp. Chim., 76, (818), p. 237-244.
- Dabrowski K., 1977 - The L-ascorbic acid content in Silver-Bream's, *Vimba vimba* L., organs. Pol. Arch. Hydrobiol., 24, (4), p. 569-573.
- Fuji M., Nakayama H., Yone Y., 1976 - Affect of W3 fatty acids on growth, feed efficiency and fatty acid composition of Red Sea bream. (*Chrysophys major*). Rept. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ., 3, p. 65-86.
- Fuji M., Yone Y., 1976 - Studies on nutrition of red Sea-Bream. XII. Effect of Dietary linolenic and W3 poly - unsaturated fatty acids on growth and feed efficiency. Bull. Japan. Soc. Sc. Fish., 42, p. 583-588.
- Fremont L., Léger C., 1979 - Le transport des lipides plasmatiques. actes colloque CNERNA, Paris, p. 263-294.
- Ghittino P., 1978 - L'Ascite della cieca, *Anguilla anguilla*, d'allevamento da degenerazione lipoidea epatica. Riv. Ital. di Pisc. e Ittiopatol., 13, (4), p. 97-100.
- Lecomte-Finiger R., 1983 - Contribution à la connaissance de l'écobiologie de l'Anguille, *Anguilla anguilla* L. 1758, des milieux lagunaires et méditerranéens du Golfe du Lion : Narbonnais et Roussillon. Thèse de Doct. d'Etat, Perpignan, 172 p.
- Maillard C., 1976 - Distomatoses de Poissons en milieu lagunaire. Thèse de Doct. d'Etat, Montpellier, CNRS A.O. 12304, 383 p.



- Narbonne J., Gallis J., 1979 - In vivo and in vitro Effect of phenchlor DP6 on drug metabolizing activity in Mullet liver. Bull. env. Cont. Toxicol., 23, p. 338-343.
- Paperna I., Colorni A., Gordin H., Kissil G. Wm., 1977 - Diseases of *Sparus aurata* in marine culture at Elat. Aquaculture, 10, p. 195-213.
- Polesello A., Mannino S., Pizzacaro F., 1977 - Influenza del Tipo di allevamento sulla composizione chimica dell'Anguilla. Riv. Ital. delle sostanze Grasse, 54, p. 27-30.
- Reynolds E.S., 1963 - The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 17, p. 208-212.
- Roblin C., 1980 - Etude comparée de la biologie du développement (gonadogenèse, croissance, nutrition) du Loup, *Dicentrarchus labrax*, en milieu naturel et en élevage. Thèse de 3ème cycle, Perpignan. 260 p.
- Roche H., 1980 - Recherches sur la nature des constituants lipidiques des tissus du Loup, *Dicentrarchus labrax*, et leurs modifications en fonction du milieu et de la saison Thèse, Lyon, 190 p.
- Roche P., 1983 - Expérience de grossissement d'Anguillettes : comparaison de régimes alimentaires et de systèmes de tri comportementaux. Mémoire de fin d'Etude ENITA, Dijon, 60 p.
- Roche H., Jouanneteau J., Peres G., 1982 - Les lipides tissulaires du Loup d'élevage, *Dicentrarchus labrax*. Comparaison à différentes saisons. CIESM, Cannes, 7p.
- Roche H., Jouanneteau J., Peres G., 1983 - Effects of adaptation to different salinities on the lipids of various tissues in Sea-Dace, *Dicentrarchus labrax*. Comp. Biochem. Physiol., 74 B, (2), 325-330.
- Sinnhuber R.O.; 1969 - The role of fats. Fish in Research, p. 245-261.
- Steffens W., 1974 - Der Vitaminbedarf der Regentogenförelle, *Salmo gairdneri*. Inst. Revue Ges. Hydrobiol., 59, (2), p. 255-282.
- 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. Marine Biology, 74, p. 101-104.
- Stroband H.W.J., Dabrowski K., 1979 - Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. Actes colloque CNERNA, Paris, p. 355-374.
- Takeuchi T., Arai S., Watanabe T., Shimma Y., 1980 - Requirement of Eel, *Anguilla japonica*, for essential fatty acids. Bull. of Jap. Soc. of Sc. Fish., 46, (3), p. 345-353.
- Takeuchi T., Watanabe T., 1979 - Effect of excess amounts of essential fatty acids on growth of rainbow trout. Bull. Japan. soc. Sc. Fish., 47, p. 1517-1519.
- Usui K., 1972 - L'élevage de l'Anguille. Pisciculture Française, 29, p. 20-42.
- Watanabe T., 1982 - Lipid nutrition in fish. Comp. Biochem. Physiol., 73B, (1), p. 3-15.
- Yu T.C., Sinnhuber R.O. (1979) - Effect of dietary W3 and W6 fatty acids on growth and feed conversion efficiency of chio salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 16, p. 31-38.

# PLANCHE 1

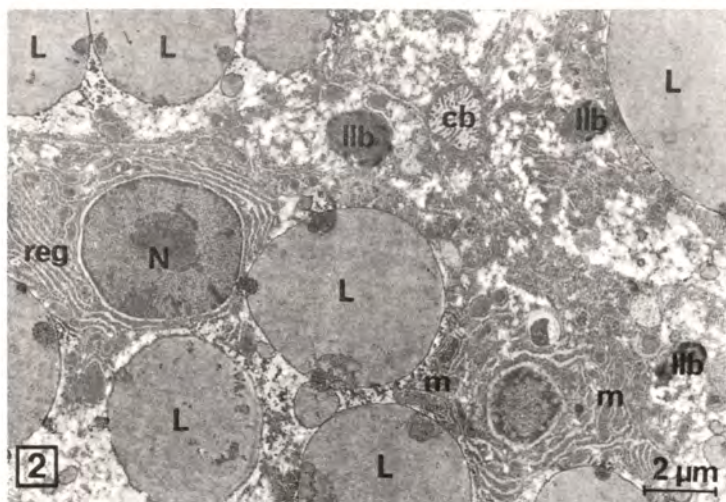
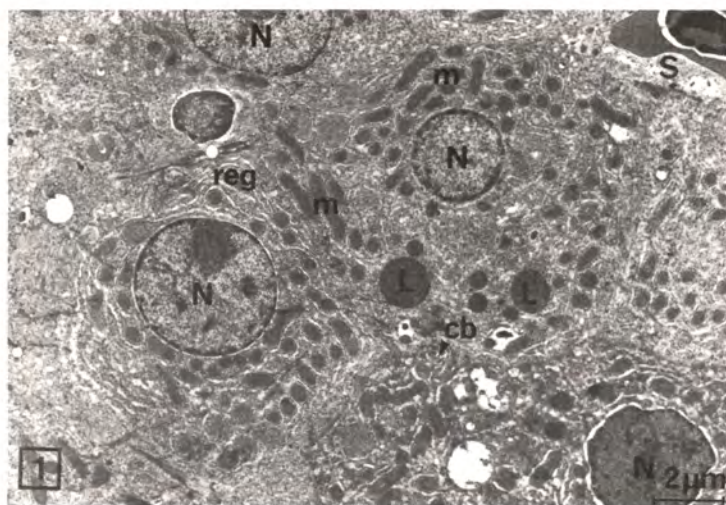


Fig. 1 : Loup sauvage ( $L_T = 21.7$  cm,  $P_T = 93$  g). X 6000.

Fig. 2 : Loup d'élevage ( $L_T = 11$  cm,  $P_T = 13$  g). X 6000.

cb : canalicule biliaire  
 fm : figure myélinique  
 gly : glycogène  
 L : Liposome  
 llb : lysosome-like-body

m : mitochondrie  
 N : Noyau  
 reg : réticulum endoplasmique granulaire  
 S : Sinusoïde



## PLANCHE 2

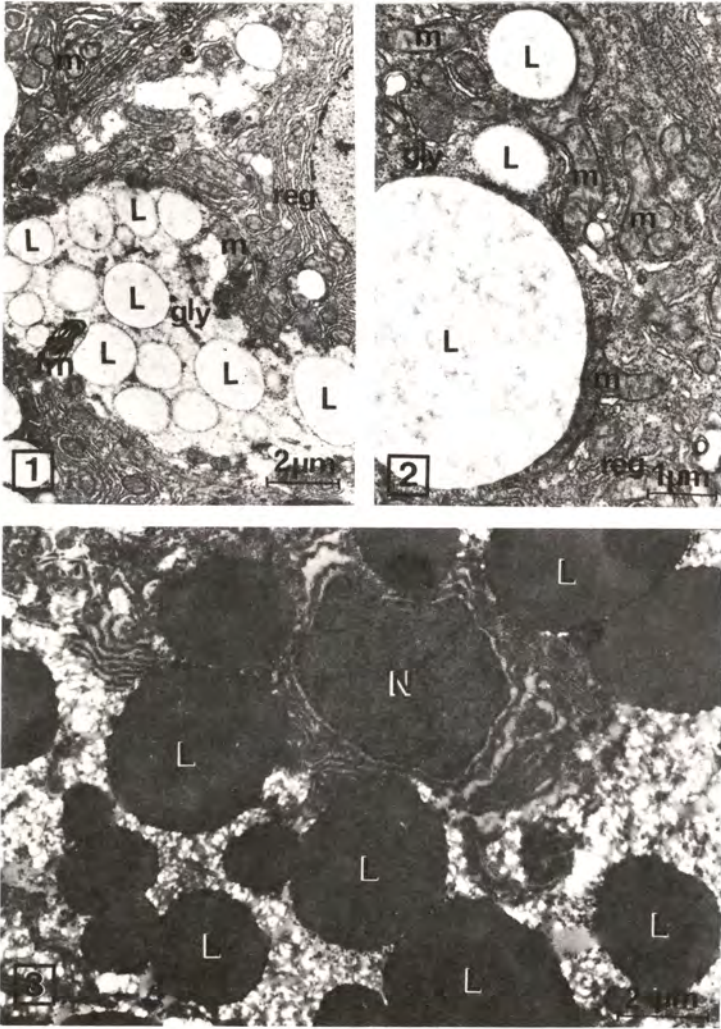


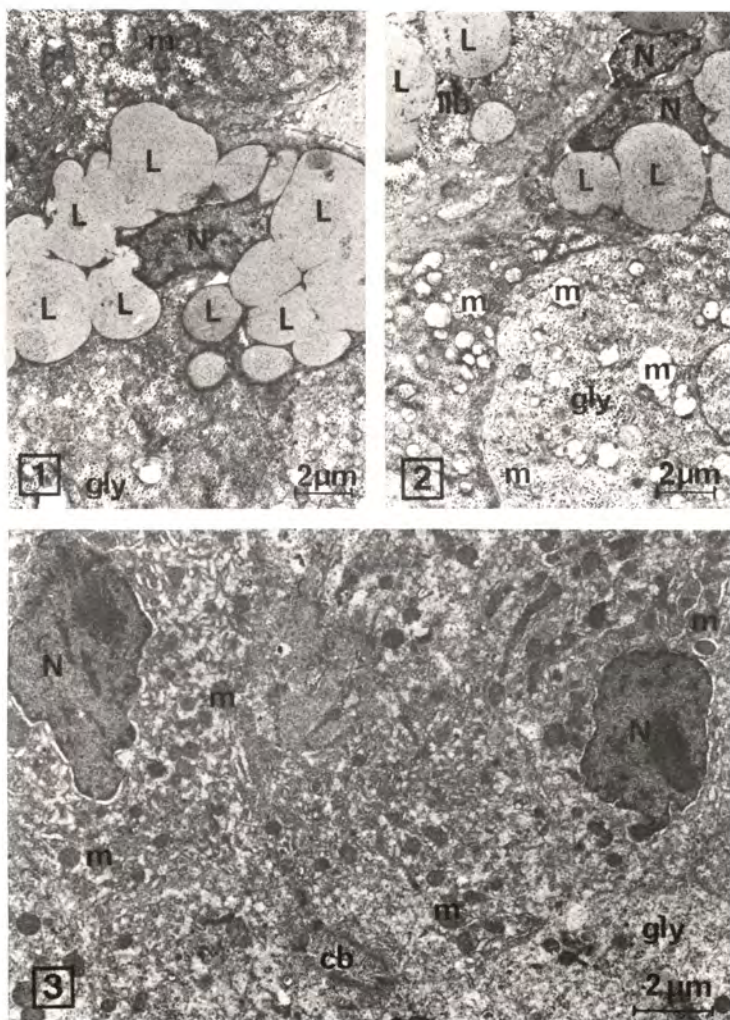
Fig. 1 : Daurade d'élevage ( $L_T = 8.3$  cm,  $P_T = 7.6$  g).  
foie de couleur pâle. X 6000.

Fig. 2 : Daurade d'élevage ( $L_T = 9.0$  cm,  $P_T = 10.0$  g). X 12000.

Fig. 3 : Daurade d'élevage ( $L_T = 9$  cm,  $P_T = 10$  g). X 8000.



## PLANCHE 3



**Fig. 1 & 2 :** Anguille d'élevage au foie de boeuf ( $L_T = 27.0$  cm,  $P_T = 26.18$  g). X 5000.

**Fig. 3 :** Anguille d'élevage à la pâte commerciale "Aqualim" ( $L_T = 27.0$  cm,  $P_T = 26.56$  g). X 7000.

INCIDENCE DE LA SALINITE SUR LES EQUILIBRES DE DISTRIBUTION  
HYDRIQUE ET IONIQUES ET SUR LE METABOLISME RESPIRATOIRE DANS LE  
MUSCLE BLANC, LE MUSCLE ROUGE ET LA BRANCHIE CHEZ LE MUGE  
CHELON LABROSUS.

J.L. GALLIS, S. PIQUEMAL, J.N. LAMBERT, P. SERGENT  
et V. ROUSSEAU

Laboratoire de Biologie Marine, Université de Bordeaux I,  
avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

Résumé

La consommation d'oxygène, et les contenus en eau,  $K^+$  et  $Na^+$ , sont mesurés dans le muscle blanc, le muscle rouge et l'épithélium branchial du muge *Chelon labrosus*, en fonction de la durée d'adaptation (jusqu'à 30 jours) à l'eau douce ou à l'eau de mer à 1500mOsm. Les activités respiratoires unitaires (quantité d' $O_2$  consommée par unité de temps et par unité de poids sec) de la branchie et du muscle rouge sont respectivement 5 et 3 fois plus élevées que celle du muscle blanc. Le rapport  $K^+/Na^+$  péricellulaire des trois organes diminue avec la durée de l'adaptation à l'eau douce. Dans la branchie, le rapport  $K^+/Na^+$  intracellulaire reste très stable, alors que ce paramètre diminue fortement dans le muscle blanc. L'évolution comparée de  $K^+$ ,  $Na^+$  intracellulaire permet de mettre en évidence un mécanisme d'échange compétitif entre les deux ions pour des sites d'adsorption intracellulaire. Les résultats sont discutés en terme de coût énergétique dû à la régulation homocellulaire et à la régulation homoépithéliale.

Abstract

Oxygen consumption, water,  $K^+$  and  $Na^+$  contents were measured in white muscle, red muscle and gill epithelium in the mullet *Chelon labrosus* in relation with the duration of fresh water or sea water (1500mOsm) adaptation. The unit respiratory activities (amount of  $O_2$  consumated per unit of time and per unit of dry weight) in gill and red muscle where respectively 5 and 3 timesmore elevated than in white muscle. The pericellular  $K^+/Na^+$  ratio of the 3 tissues decreased with the fresh water adaptation duration. In the gill, the intracellular  $K^+/Na^+$  ratio was stable while the parameter decreased strongly in the white muscle. The comparative evolution of intracellular  $K^+$  and  $Na^+$  allows to show a competitive exchange between the two ions for intracellular adsorption sites. The results are discussed in relation to energetic cost of homocellular regulation and homoepithelial regulation.

Mots clefs : eau, ions, consommation d'oxygène, osmorégulation, mullet.

Key words : water, ions, oxygen consumption, osmoregulation, mullet.



## INTRODUCTION

Lors des transferts progressifs du muge Chelon labrosus, de son milieu originel marin vers l'eau douce ou vers les milieux sursalés, la natrémie et la chlorémie varient de 30 à 40%. La kaliémie et la volémie sont aussi très fortement affectées. Ces modifications ont un effet direct et certain sur les processus de régulation iso-osmotique intracellulaire (Lasserre et Gallis, 1975). En première approximation, le coût énergétique de ces mécanismes adaptatifs dépend étroitement de l'importance des gradients électrochimiques présents entre les compartiments intracellulaire et péricellulaire. Il importe donc de connaître les évolutions de l'eau et des principaux ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) intra et extracellulaires associés à la mesure du métabolisme oxydatif (activité respiratoire tissulaire). A partir de la quantification directe de chacun des compartiments nous avons mesuré ces paramètres sur trois structures tissulaires différentes par leur aspect morphofonctionnel et leur métabolisme respiratoire (muscle blanc, muscle rouge et épithélium branchial). la cellule musculaire est un type cellulaire sans asymétrie morphologique et fonctionnelle où la régulation ionique est qualifiée "d'homocellulaire". L'épithélium branchial est constitué de structures cellulaires asymétriques dans lesquelles la régulation homoépithéliale spécifique aux mécanismes de translocation ionique et hydrique transcellulaire est obligatoirement compatible avec la régulation homocellulaire (Gallis et Beauvie, 1982).

## MATERIEL ET METHODES

Les muges (poids moyen 100g), Chelon labrosus (Risso 1826) sont pêchés dans les réservoirs à salinité et température variables du Domaine de Certes (Bassin d'Arcachon). Avant toute expérimentation, les poissons sont stabulés au laboratoire dans des bassins d'eau de mer (s‰ = 28 à 30). Des lots de 6 poissons au minimum sont adaptés à l'eau douce ou à l'eau de mer sursalée (1500mOsm) par dilution ou concentration progressive du milieu en une semaine. Après sacrifice des animaux, des fragments de tissus (100mg) sont rapidement prélevés en vue des dosages immédiats.

La quantification des compartiments intra et péricellulaires est obtenue par centrifugation à 1000g (5 minutes à 0-4°C) selon la technique de Ling et Walton (1975) modifiée par Gallis (1980). Le dosage de  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  est effectué par spectrophotométrie de flamme. L'activité respiratoire est évaluée par la consommation



d'oxygène avec une électrode de Clark (oxygraphe Gilson) dans une solution physiologique correspondant au plasma de poissons adaptés à l'eau de mer (Gallis, 1980).

Les données correspondant à chaque échantillon sont compilées et traitées directement sur ordinateur.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Globalement, tous milieux et toutes durées d'adaptation confondus (eau de mer, eau douce et eau de mer 1500mOsm), les activités respiratoires unitaires (mesurées *in vitro* dans une solution physiologique identique) de la branchie et du muscle rouge sont respectivement 5 et 3 fois plus élevées que celle du muscle blanc. A la diminution de l'activité respiratoire unitaire (branchie > muscle rouge > muscle blanc) correspond un accroissement du ratio intracellulaire  $K^+/Na^+$  (Fig. 1), évolution consécutive à une diminution du  $K^+$ , et une augmentation du  $Na^+$ , lorsque l'on compare les teneurs respectives des trois organes.

Les trois tissus montrent une diminution de  $K^+/Na^+$  péricellulaire avec la prolongation du séjour en eau douce (Fig. 2a et 2b). Cependant face à cette variabilité, la branchie est caractérisée par une bonne stabilité des teneurs en  $K^+$  et  $Na^+$  intracellulaires (Fig. 2a). A l'encontre, dans le muscle blanc, le rapport  $K^+/Na^+$  intracellulaire diminue progressivement avec la durée d'adaptation en eau douce (eau de mer = 8 ; eau douce=1). En outre dans le muscle blanc, l'analyse des variations des teneurs en  $K^+$  ou  $Na^+$  intracellulaires, avec la durée du séjour en eau douce et en fonction du rapport  $K^+/Na^+$  péricellulaire (Fig. 3), permet de mettre en évidence un processus d'échange compétitif entre les deux ions, vis à vis de sites d'adsorption cellulaires (45 à 50 sites pour 100g de poids sec) (Fig. 3). Ceci correspond à un mécanisme d'échange légèrement autocoopératif (Karreman, 1973 ; Gallis et Beauvie, 1982). A l'inverse, la branchie est caractérisée par une évolution parallèle du contenu intracellulaire en  $K^+$  et  $Na^+$  avec la durée du séjour en eau douce.

Si on rapproche ces résultats de ceux relatifs au métabolisme oxydatif, il est possible de considérer que l'activité respiratoire élevée observée dans la branchie est probablement liée aux mécanismes de transfert ionique et hydrique transcellulaire. La régulation homocellulaire, qui reposerait en grande partie sur l'existence d'un état d'équilibre métastable à haute affinité pour le  $K^+$  (Ling, 1977) serait très peu dépendante du métabolisme oxydatif. Ce serait le cas du muscle blanc dans des conditions physiologiques normales (eau de mer, séjours courts inférieurs à un mois en eau douce et en eau de mer 1500mOsm).

Gallis J.L., 1980 - Recherches sur un épithélium transporteur à fonction réversible : le tissu ionosécréteur de la branchie d'un téléostéen amphihalien Chelon labrosus (Risso 1826). Aspects biochimiques, biophysiques et morphologiques. Modélisation. Thèse d'Etat, Bordeaux, AO 665, 189 p.

Gallis J.L., Beauvie C., 1981-82 - Etat physique de la cellule vivante : un équilibre dynamique ou un équilibre métastable. Séminaire Ecole Biologie Théorique, CNRS, publications Université de Rouen, p. 213-294.

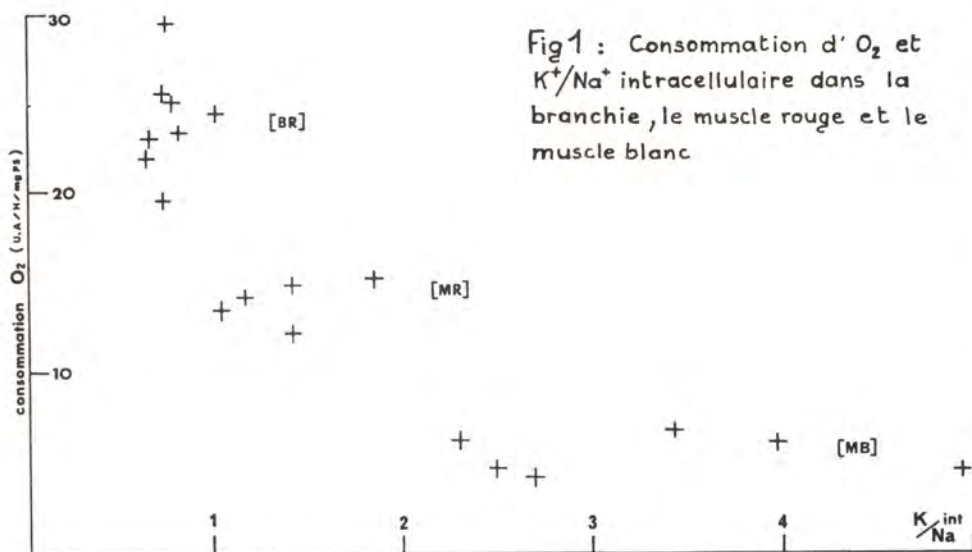
Karreman G., 1973 - Cooperative specific adsorption. Ann. New-York Acad. Sc., p. 323-409.

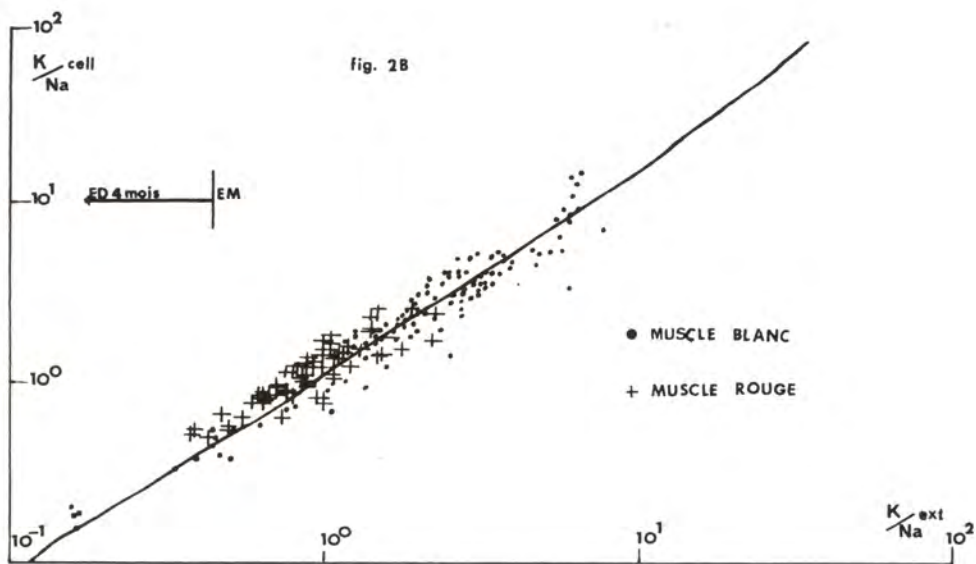
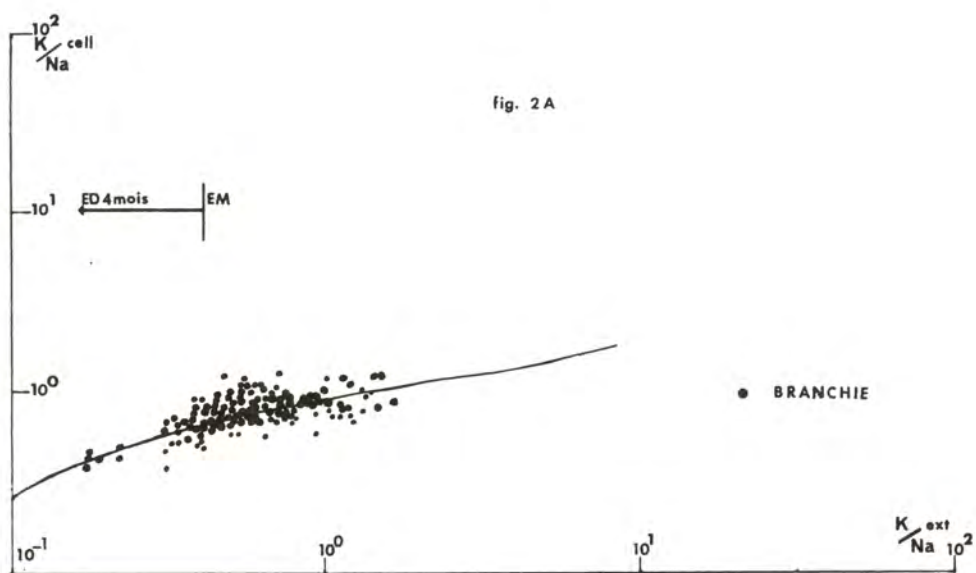
Lasserre P., Gallis J.L., 1975 - Osmoregulation and differential penetration of 2 mullets Chelon labrosus (Risso) and Liza ramada (Risso) in estuarine fish ponds. Aquaculture, 5, p. 323-344.

Ling G.N., 1977 - Physical state of water and ions in living cells and a new theory of the energization of biological work performance by ATP. Mol. Cell. Biochem., 15(3).

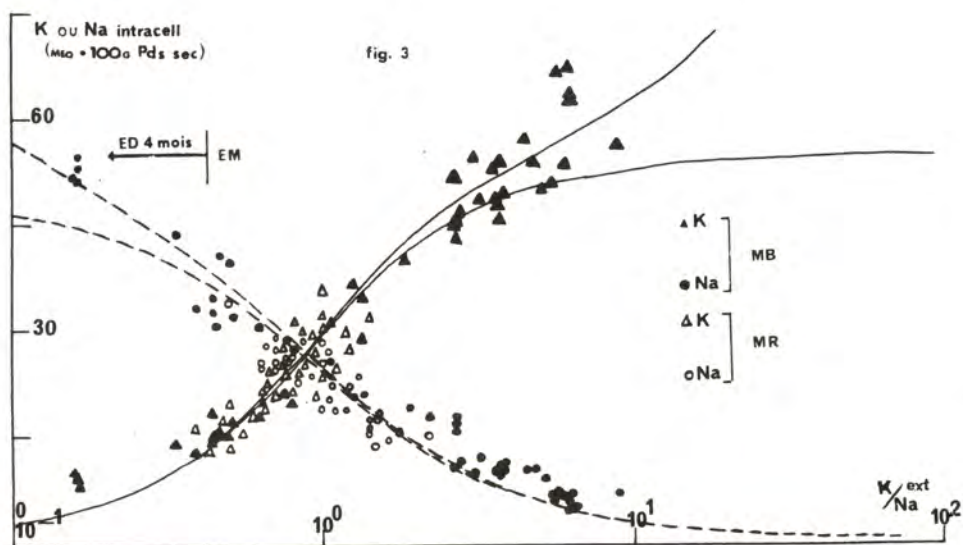
Ling G.N., 1980 - Underestimation of Na permeability in muscle cells : implications for the theory of cell potential and for energy requirement of the Na pump. Physiol. Chem. and Physics, 12.

Ling G.N., Walton C.L., 1975 - A simple, rapid method for the quantitative separation of the extracellular fluid in frog muscles. Physiol. Chem. and Physics, 7.









L'ANALYSE DES POINTS DE BLOCAGE DANS L'ELEVAGE MARIN DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL  
EN BRETAGNE

Jean Pierre CARVAL  
Biologiste - AQUACOOP  
29213 PLOUGASTEL-DAOULAS

Depuis 1975, de nombreux essais (1) sur l'élevage en milieu marin de la Truite Arc-en-Ciel (*Salmo Gairdneri* - Richardson) ont permis de mettre au point des structures d'élevage (2) adaptées aux sites du littoral français et de définir un cycle de production qui a débouché en 1979-1980 sur la mise en marché de 400 tonnes de "truites élevées en mer".

Cette production stagne. Des points de blocage surtout d'ordre biologiques empêchent un véritable décollage de cette activité nouvelle.

Certains pays comme la Norvège ont pu donner à cette profession les moyens d'avancer dans ce domaine aquacole puisqu'elle a produit en 1982 12 000 tonnes de salmonidés en élevage intensif.

Ce savoir faire technique et biologique a été partiellement transposé en France, mais des conditions spécifiques, tant dans la phase en eau douce qu'en eau de mer, ont défini un schéma d'exploitation particulier et qui demeure fragile.

I - L'ELEVAGE DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL

I-1 Conditions générales d'exploitation

La côte bretonne, découpée, offre un certain nombre de sites favorables à l'élevage des salmonidés. Ces emplacements, généralement abrités des vents dominants, sont bien renouvelés grâce aux courants de marées permettant un échange appréciable de la masse d'eau. Le marnage important, 7 à 8 mètres en moyenne, impose des contraintes puisqu'il implique un éloignement de la côte au delà de la zone de balancement des marées dans un secteur offrant au minimum une profondeur de 4 à 5 mètres au zéro des cartes.

Les conditions très tempérées qui caractérisent le large de la région ouest des côtes françaises, en raison de l'influence prépondérante du Gulf Stream, déterminent des variations thermiques de l'eau de mer de 5 à 6° en hiver à 19 à 20° C en été. Ces variations sont plus marquées dans les zones estuariennes plus chaudes l'été et plus fraîches en hiver. Des fluctuations similaires s'observent pour la salinité, constante dans la zone côtière exposée au large (34 à 36 ‰), très variable en milieu estuarien (15 à 33 ‰ l'hiver et 33 à 35 ‰ l'été).

(1) "Résultats préliminaires de grossissement de saumons et truites Arc-en-Ciel en eau de mer" - H. HARRACHE - 1974 - CNEXO.

(2) "Les cages flottantes en Rade de Brest" - CNEXO - TDI - 1976.

## I-2 Le cycle d'élevage

L'objectif que s'est fixé ce type d'élevage découle de l'analyse effectuée sur les exigences du marché. En effet, il est souhaitable que la production marine de salmonidés vienne accroître globalement les apports français, et par conséquent, ne se substitue pas à la production de truites d'eau douce, et d'autre part, puisse concurrencer les importations par la production de poissons de qualité équivalente, essentiellement de taille comprise entre 1,5 et 2,5 kilos.

De cette analyse, des exigences biologiques de l'espèce et des disponibilités au niveau de l'approvisionnement, a découlé le cycle d'élevage actuel.

Il débute au mois de novembre par le transfert sans acclimatation préalable de truites de 200 à 300 grammes issues de piscicultures. La vente du cheptel intervient dès que les poissons atteignent 800 grammes à un kilo, impérativement avant le mois de juillet, c'est à dire après 7 mois d'élevage en mer avant que le réchauffement des eaux n'induise des mortalités importantes.

### 1-2.1 Le transfert en eau de mer

Le passage de l'eau douce à l'eau de mer s'intègre "dans le cadre de physiologie générale de l'organisme, mettant en jeu des mécanismes complexes de nature neuro-endocrinienne" (3) ; il pose un problème physiologique important au niveau du maintien de la concentration du milieu intérieur. Le poisson aurait tendance à perdre son eau dans le milieu ambiant. Divers mécanismes d'osmorégulation se mettent alors en place sous la dépendance du système hormonal.

Cette transformation physiologique se réalise dans une période précise, au moment des jours les plus courts et pendant la phase d'accroissement de la phase diurne, c'est à dire du mois de novembre au mois de mai. La température de l'eau doit être basse ou peu élevée (8 à 15° C). La taille minimale du poisson, variable selon l'espèce, est aussi un critère pour le passage en eau de mer.

En intégrant ces impératifs physiologiques, la seule "fenêtre" exploitable par l'éleveur demeure le passage en novembre de truites de 200 à 300 grammes.

Les mortalités dues au passage se situent entre 2 et 3%, les individus matures et notamment les mâles ne résistent pas à ce transfert, ce qui nécessite le tri préalable en eau douce.

### 1-2.2 L'approvisionnement

La demande intervient dans une période où la pisciculture d'eau douce ne dispose pas en quantité de truites adaptées au transfert en mer. En effet, la maturation et le cycle de production imposé par le débit des rivières limitent la production de truitelles de 200 à 300 grammes durant la période favorable (novembre).

Dans l'état actuel du développement de la salmoniculture marine ces contraintes ne sont pas insurmontables et les progrès récents réalisés grâce aux travaux dans le domaine de la cytogénétique permettront d'envisager la production d'animaux stériles mieux adaptés à la demande.

### 1-2.3 L'élevage en mer

Placés dans des enceintes en filet de 200 m<sup>3</sup> avec des densités variant de 10 à 20 kilos / m<sup>3</sup>, les poissons reçoivent une alimentation artificielle correspondant à leurs besoins.

(3) P. LUBET - "Etude expérimentale du transfert des truites de l'eau douce en eau de mer" - rapport UER - CAEN - 1975.



Cet apport énergétique élevé permet une croissance mensuelle de 30 % et un taux de conversion de 2, ce qui permet à l'éleveur de réaliser 3 fois le poids d'ensemencement en 8 mois d'élevage.

Ces performances nous semblent insuffisantes et ne permettent pas de réaliser l'objectif fixé.

En effet, le cheptel doit être vendu avant qu'il n'atteigne le poids idéal de 1,5 à 2,5 kilos. Cette situation est imposée par les conditions climatiques qui, dès le mois de juillet, s'avèrent inacceptables pour le poisson.

Si la phase d'élevage "hivernal" (novembre - juin) nous semble maîtrisée puisque les maladies comme la vibriose sont enrayerées efficacement, il n'en demeure pas moins que l'impossibilité de poursuivre cette activité au-delà de la période estivale (juillet - octobre) inhibe son développement.

## II - LES POINTS DE BLOCAGE

Si l'approvisionnement et les performances de l'élevage vis-à-vis notamment des préventions contre les maladies restent des points qu'il faut améliorer, le point de blocage essentiel demeure l'élevage estival.

Les différentes approches n'ont pas permis, à ce jour, d'établir de façon précise les causes de mortalités enregistrées en été. Cependant, l'analyse des observations effectuées permettent d'exposer quelques problèmes auxquels est confrontée la Truite Arc-en-Ciel durant cette période.

### II-1 Influence du milieu

Placée dans des conditions de température et de salinité élevées (18 à 20° C - 34 à 36 ‰) la truite présente un déséquilibre de la pression osmotique et des ions chlorures ainsi qu'un épuisement des réserves puisque le glycogène hépatique baisse (4). Cet état d'affaiblissement général induit un amaigrissement du poisson et provoque des mortalités élevées dont l'agent final est variable (lésions, vibriose, parasites, ...) mais dont la cause primaire semble être une détresse physiologique des animaux sur le plan de l'osmorégulation et de la respiration.

Dans ces conditions, le métabolisme de la truite est élevé, ce qui se traduit par des besoins accrus en oxygène et en énergie. La truite a la possibilité d'utiliser au mieux sa surface d'échange représentée par les branchies pour faire face à ce besoin en oxygène, mais de ce fait, s'expose à une pénétration des ions inorganiques (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, etc...) qu'elle ne peut combattre tout à fait puisque un déséquilibre de la pression osmotique est toujours constaté. Ces mécanismes régulateurs sont sous la dépendance du système hormonal influencé lui-même par les conditions externes (température, photopériode).

### II-2 Influence de l'alimentation

Les besoins énergétiques sont importants mais sont-ils couverts par l'apport de nourriture ? En effet, à haute température (supérieure à 17° C) l'éleveur ne peut distribuer qu'une ration alimentaire limitée, en général voisine de 1 % du poids vif, alors qu'à 14°C le poisson accepte sans problème une ration allant de 2 à 2,5 % du poids vif ; cet apport couvre alors ses dépenses et permet une croissance appréciable (30 % mensuel).

L'alimentation "classique" est-elle adaptée aux besoins de la truite en été ? Dans l'hypothèse où il serait nécessaire d'élaborer une nouvelle formule alimentaire, cet apport énergétique adapté suffirait-il à améliorer la survie estivale ?

(4) contrat CNEXO-CEREOPA N° 82/6853 - 1983 - "Etude de la mortalité de la truite "Arc-en-Ciel" sur plusieurs sites d'élevage marin pendant l'été 1982".

### II-3 Influence de la maturation

Chez les espèces migratrices, la préparation physiologique de l'animal est assez longue. Les processus rendant possible la maturation, qui vient à son terme en novembre / décembre, se déclenchent plus tôt en saison et vraisemblablement durant l'été. Compte tenu de l'influence que peut avoir ce mécanisme physiologique sur le métabolisme général, il nous est apparu essentiel d'étudier l'influence de la maturation sur la survie estivale. Cette expérience a été possible grâce à l'utilisation d'animaux particuliers, stériles (5). Nous n'avons pas constaté d'amélioration sensible du comportement des animaux stériles par rapport aux lots témoins (6). Par conséquent, il ne semble pas que dans des conditions marines strictes en été (température et salinité élevées) l'utilisation d'animaux stériles puisse permettre une survie estivale meilleure, mais ce résultat demande à être confirmé et testé en milieu dessalé.

### II-4 Adaptation de la truite

Maintenues en mer durant l'été, nous enregistrons 10 à 20 % de survie sans pouvoir déterminer ce qui permet à ces individus de résister. Ils présentent en fin d'hiver une maturation normale avec obtention de pontes viables.

Placées en milieu dessalé caractérisé en été par des températures plus élevées de 1 à 2°C, une salinité inférieure (30 à 33 ‰ en moyenne) et un renouvellement de la masse d'eau plus important, donc un apport d'oxygène supérieur, les truites présentent une meilleure résistance. La survie est améliorée, elle se maintient entre 50 et 75 %.

Ces résultats nous semblent intéressants. Il nous paraît que la survie estivale est un problème que l'on doit pouvoir résoudre.

### CONCLUSION

Les différentes questions que se posent l'éleveur, en fonction des informations disponibles établies par des travaux réalisés sur cette espèce nous semblent justifier les recherches envisagées pour la résolution de ce problème.

Il nous paraît cependant important qu'elles puissent s'initier dans un esprit de concertation entre les différentes équipes de recherche tant elles impliquent une analyse de spécialistes de compétences complémentaires faisant intervenir des disciplines comme la génétique, la physiologie et la nutrition. Les études à entreprendre devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes qui régissent le comportement estival de la truite Arc-en-Ciel et d'envisager, à terme, des solutions pour réaliser notre objectif, c'est à dire le transfert en mer de salmonidés au printemps, période la plus favorable pour maîtriser l'approvisionnement, élevage durant l'été et prolongement de la phase de croissance pour obtenir un produit de grande taille adapté à la demande.

---

(5) B. CHEVASSUS - E. QUILLET et D. CHOURROUT - Note technique INRA "Obtention d'animaux triploïdes chez la truite Arc-en-Ciel" - Mars 1983.

(6) Programme d'amélioration génétique des salmonidés destinés à l'aquaculture marine - INRA - AQUACOOP S.A. - résultats à paraître.



L'ACTIVITE DE DEPLACEMENT ET LE REPERAGE DE LA NOURRITURE  
CHEZ LE BAR JUVENILE CAPTIF

M. ANTHOUARD<sup>(1)</sup> et J. PARIS<sup>(2)</sup>

R E S U M E

L'activité de déplacement et le repérage de la nourriture sont étudiés dans une optique dynamique ayant pour objectif la mise en évidence des capacités d'adaptation comportementale du jeune Bar face à une situation nouvelle. Le rôle joué par les conditions antérieures d'élevage est éprouvé, le facteur susceptible d'intervenir étant le niveau des stimulations (courants associés à la nourriture). Les données montrant les effets favorables d'un tel traitement, sont à rapprocher des travaux réalisés chez les Vertébrés Supérieurs qui ont mis en lumière l'importance des stimulations précoces dans l'ontogénèse comportementale ainsi que sur le niveau d'émotivité et les capacités d'adaptation des sujets devenus adultes.

S U M M A R Y

Movement activity and localization of food were studied dynamically with the objective of establishing the capacities of behavioural adaptation of the young Bar faced with a novel situation. The role played by previous rearing conditions was demonstrated, with the level of stimulation being a sensitive intervening factor (currents associated with the food). The data show the favourable effects of such treatment, and are in agreement with work carried out on higher vertebrates, which have brought to light the importance of early stimulation in behavioural ontogeny with respect to emotionality as well as capacities of adaptation in subjects reaching adulthood.

M O T S - C L E S : *Dicentrarchus labrax*, activité de déplacement, comportement alimentaire, réponse à la nouveauté, apprentissage, expérience précoce.

K E Y W O R D S : *Dicentrarchus labrax*, movement activity, feeding behaviour, response to novelty, learning, early experience.

(1) Laboratoire de Psychophysiologie, UER des Sciences du Comportement et de l'Environnement, U.L.P., 7 rue de l'Université, 67000 STRASBOURG.

(2) Station de Biologie marine et lagunaire, U.S.T.L., Quai de la Daurade, 34200 SETE.



## I N T R O D U C T I O N

Quelle que soit leur destination, élevage intensif, élevage extensif ou repeuplement du milieu naturel, les alevins nés en captivité sont amenés à subir, au cours de leur croissance, un certain nombre de changements de milieu qui peuvent constituer des phases délicates, en particulier au niveau de leur adaptation aux nouvelles conditions d'environnement.

L'objet de cette étude est double : il s'agit dans un premier temps d'analyser la réponse de la forme juvénile du Bar placé dans un nouveau milieu, et de suivre l'évolution de l'adaptation des poissons à cet environnement en prenant comme critère leur activité générale, la modalité d'occupation de l'espace disponible ainsi que leur comportement alimentaire. Nous étudierons également leur réactivité en les soumettant à des stimulations de nature variée tout en les maintenant dans l'enceinte à laquelle ils se sont habitués.

Ce travail est à rapprocher des études réalisées chez les Vertébrés Supérieurs qui ont montré (Mitchell, 1976) que les réactions d'évitement actif constituent l'une des formes les plus courantes de réponse à la nouveauté, leur fonction étant apparue comme ayant valeur de protection à la fois de l'individu et de l'espèce. Fuite vers le fond, confinement en zone périphérique des espaces disponibles sont reconnus comme des réponses habituelles chez des Poissons soumis à des stimulations non familières (Warren & coll., 1976).

Une seconde forme de réponse à la nouveauté est constituée par le comportement d'exploration lorsque le niveau des stimulations issues du milieu est perçu comme moins nociceptif. Sa fonction est la familiarisation qui met en jeu un ensemble de processus complexes regroupés sous le vocable d'habituation (Thorpe, 1963), que l'on s'accorde à considérer comme une forme d'apprentissage sans renforcement défini.

Dans un deuxième temps, il s'agit d'éprouver le rôle que peuvent jouer les conditions de vie antérieure sur les adaptations comportementales en milieu nouveau. Les critères sont les mêmes que ceux utilisés précédemment.

Une telle étude doit être considérée comme une recherche préliminaire concernant l'influence des stimulations précoces sur les capacités d'adaptation ultérieures des poissons, domaine auquel de nombreux travaux sont actuellement consacrés, chez les Vertébrés Supérieurs, qui mettent en évidence l'éventail des influences favorables de telles stimulations. (Greenough, 1974 ; Hunt, 1979 ; Rosenzweig, 1977)

## C O N D I T I O N S   E X P E R I M E N T A L E S

Les observations portent sur des alevins âgés de 4 mois au début de l'expérience, provenant de la Station de biologie marine de Sète. Le transfert en aquarium s'est fait à l'âge de 3 mois ; les poissons sont élevés en eau de mer artificielle à 18° par groupes de 100 sujets.

Deux séries d'observations sont réalisées à partir de populations de même âge, traitées initialement de la même manière. Chacune des deux séries comporte elle-même deux phases successives : la première, correspondant à une période de mise en condition des poissons, se

réalise en soumettant ces derniers à des conditions - relative à la modalité de présentation de la nourriture - différentes d'une série à l'autre. La seconde, correspondant à une période test, se réalise en plaçant les poissons dans une situation nouvelle par rapport aux conditions précédentes de maintenance, cette situation étant la même pour les deux populations.

- La première phase expérimentale a lieu en prélevant de la population initiale un groupe de 15 sujets qui sont soumis aux conditions de maintenance durant six semaines : les poissons sont placés dans des aquariums de verre collé comportant une circulation sur filtre extérieur ; toutes les conditions (salinité, température, éclaircissement...) sont analogues pour les deux groupes testés, hormis, le mode de présentation de la nourriture qui est exclusivement composée d'*Artemia* congelées.

Situation A. La mangeoire est placée à proximité de l'arrivée d'eau, dans une situation telle que la nourriture se trouve progressivement et en grande partie dispersée par les courants.

Situation B. La mangeoire est placée en dehors des turbulences dues aux courants, de sorte que la nourriture est davantage retenue au niveau de la mangeoire même.

L'étude détaillée des conduites mises en oeuvre au moment du transfert des poissons dans les deux situations décrites (Anthouard, en préparation) a montré que les jeunes Bars s'adaptent aux conditions imposées en développant des modèles comportementaux différenciés dont les caractéristiques se mettent en place progressivement, et qui deviennent stables après cinq semaines de familiarisation à l'environnement.

Modèle A. Activité de déplacement stéréotypée, d'un niveau élevé et régulier, en particulier localisée dans la zone des courants, prédation sur proies dispersées essentiellement, exploitation de la mangeoire peu développée, compétition alimentaire fréquente en pleine eau, rarement constatée aux mangeoires, cohésion du groupe assez marquée.

Modèle B. Activité de déplacement moins régulièrement répartie dans le temps comme dans l'espace, d'un niveau inférieur à celui du modèle A et plus souvent localisé près du substrat en dehors des périodes de nourrissage. Structuration des comportements plus lente à se mettre en place, modalité d'exploitation de la nourriture disponible différente, le prélèvement direct à la mangeoire devenant obligatoire, peu de compétition alimentaire, taux de capture des proies plus faible que dans le modèle précédent, cohésion de groupe moins marquée.

- A l'issue de cette première phase, les poissons sont soumis aux conditions de test : un contingent de 5 sujets est prélevé de chaque groupe précédent et introduit dans une enceinte annulaire de 3m67 de longueur moyenne, 36 cm de hauteur d'eau et 10 cm de large. Le choix d'une telle forme est justifié par la possibilité d'une identification à un milieu illimité, les sujets pouvant effectuer des déplacements continus pendant de longues périodes, sans rencontrer d'obstacle, comme ils pourraient le faire en milieu naturel.

Six colonnes de quatre capteurs à infra-rouge sont régulièrement disposées le long de cette enceinte. Les activités manifestées à un même niveau sont cumulées : quatre niveaux sont contrôlés : la strate



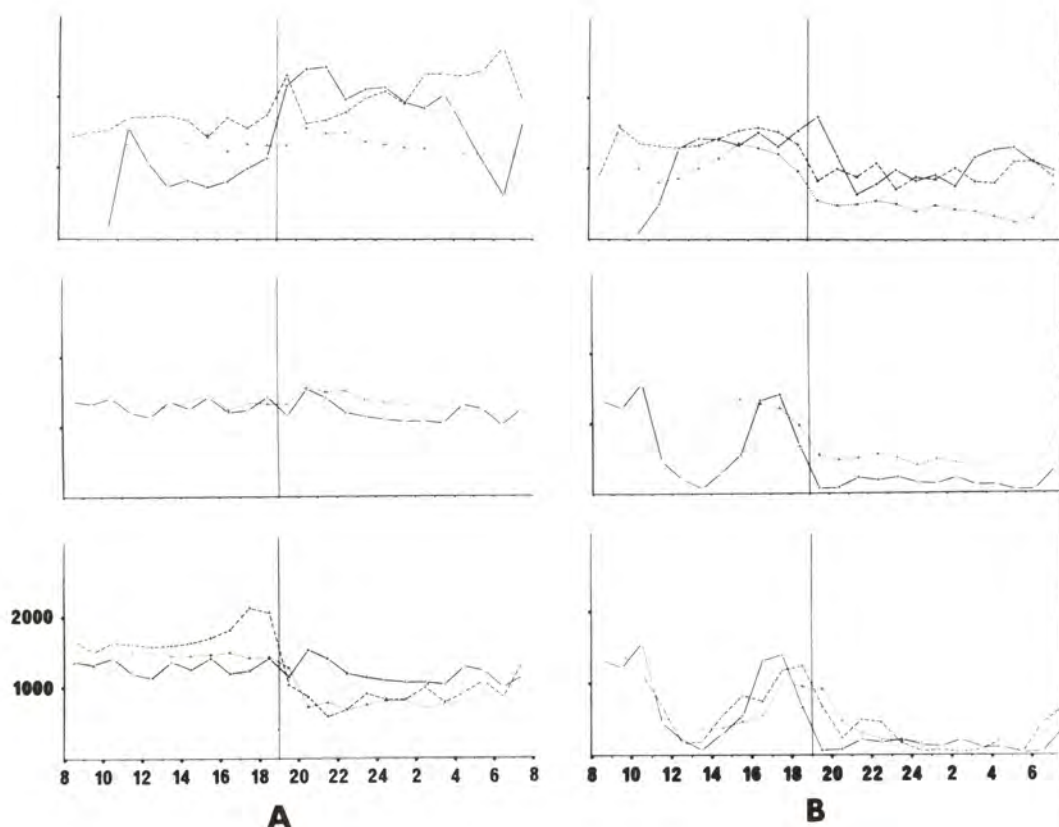


Fig. 2

Mise en place de modèles d'activité générale après transfert dans un milieu inconnu et influence de stimulations nouvelles, en fonction des conditions antérieures de maintenance.

Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulation,

Situation B : sujets témoins.

Axe des abscisses : heures de la journée

Axe des ordonnées : niveau d'activité générale enregistrée sous forme d'interruptions des faisceaux infra rouge.

Début de la phase nocturne : 19 heures.

- 1 - trait plein : 1er jour après l'introduction des poissons dans leur nouveau milieu
- tirés : 2e jour
- pointillés : moyenne des jours suivants (3 à 15)
- 2 - pointillés : moyenne des jours suivants (3 à 15)
- trait plein : 17e jour (stimulation par courants)
- 3 - trait plein : 17e jour
- tirés : 19e jour (stimulations visuelles)
- pointillés : moyennes des jours suivants (20 à 23).





proche du substrat, 2 strates intermédiaires et la strate superficielle. Celle-ci est réservée à l'évaluation de l'activité trophique : en effet, six mangeoires sont installées en surface (même modèle que précédemment) au niveau des capteurs les plus superficiels ; l'enregistrement des déplacements et activités locales des poissons est réalisé en continu, 24 heures sur 24.

Une isotropie relative est obtenue en isolant les sujets de la pièce voisine par des caches installés à la périphérie de l'enceinte : des caches identiques sont placés du côté intérieur pour éviter que les poissons ne puissent se voir s'ils sont placés en des points diamétralement opposés.

L'eau de l'enceinte est constamment renouvelée. L'admission se faisant par deux buses contiguës équipées de coudes orientés en opposition créant ainsi des courants divergents ; l'évacuation se fait en un point diamétralement opposé à l'admission.

Toutes les autres conditions sont maintenues constantes conformes à celles de la période antérieure.

Deux interventions sont effectuées au 16<sup>e</sup> jour et 18<sup>e</sup> jour de test. La première consiste à disposer les deux coudes d'arrivée d'eau dans la même direction, ce qui a pour effet non seulement de modifier l'organisation des courants d'eau dans l'enceinte, mais également de doubler leur intensité dans la direction choisie. La seconde consiste à enrichir l'environnement visuel des poissons en supprimant les caches périphériques, élargissant ainsi leur champ de vision.

## R E S U L T A T S

### A) Etude de l'activité globale.

#### 1) Modalités d'exploration, adaptation au nouveau milieu, réactivité aux stimulations après habituation (Fig. 1)

Les données actographiques observées au 1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup>, 17<sup>e</sup>, 19<sup>e</sup> jour ainsi que les moyennes obtenues du 3<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour et du 20<sup>e</sup> au 23<sup>e</sup> jour, permettent de dégager les faits suivants :

- La réponse initiale des poissons introduits dans un environnement non familier est une réaction d'inhibition, qui est également manifestée quelle que soit les conditions de maintenance antérieures ; ces résultats confirment ceux qui ont été observés dans des circonstances voisines chez ces mêmes sujets moins âgés (Anthouard, en préparation).

- La levée de l'inhibition initiale est plus précoce chez les sujets qui ont manifesté antérieurement une plus grande activité de déplacement acquise au cours de la phase de maintenance (A) ; toutefois, une seconde phase d'inhibition apparaît chez ces mêmes sujets, après une première période d'exploration ; elle peut être attribuée à l'effet de contraste, les poissons ne retrouvant pas, après une première recherche, les stimulations qui leur étaient familières (courants).

- Ultérieurement, les poissons du groupe A manifestent de nouveau une forte activité générale qui se maintient constamment à un niveau supérieur à celui manifesté par leurs congénères du groupe B.

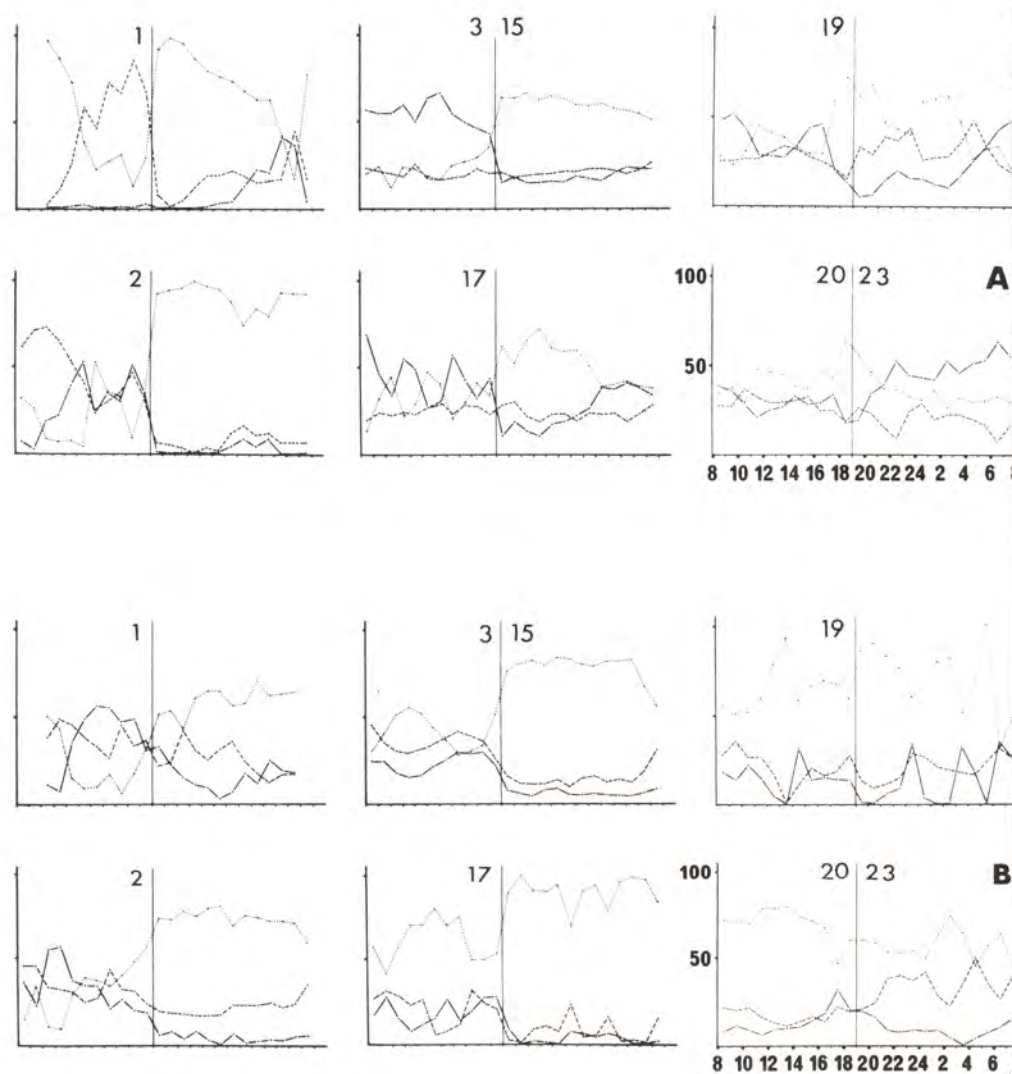


Fig. 2

Evolution des modalités d'occupation des différentes strates du milieu et influences de stimulations nouvelles, en fonction des conditions antérieures de maintenance.

Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulations  
 Situation B : sujets témoins.

axe des abscisses : heures de la journée

axe des ordonnées : % d'occupation des différentes strates

- trait plein : strate intermédiaire superficielle
- tirés : strate intermédiaire profonde
- pointillés : strate proche du substrat

1 : 1er jour ; 2 : 2e jour ; 3 à 15 : moyenne des jours suivants, 3 à 15 :  
 17 : stimulation par courants ; 19 : stimulations visuelles ; 20 à 23 :  
 moyenne des jours suivants 20 à 23.



Autrement dit, les poissons qui avaient acquis un modèle de comportement actif conservent ce modèle lors d'un transfert dans un nouveau milieu, avec tous les avantages potentiels qu'il représente pour leur adaptation aux conditions nouvelles.

- Une modification de la répartition et de la force des courants est perçue avec plus d'acuité pour le groupe qui a précédemment développé un modèle comportemental indépendant des courants (B), une telle stimulation ayant valeur inhibitrice. En revanche, les poissons qui ont été familiarisés à des stimulations de cette nature durant la phase de maintenance ne manifestent aucune réponse de ce type.

- Si l'on s'adresse à la seconde modalité sensorielle impliquée, la vision, il apparaît qu'une augmentation du niveau de stimulation, qui n'a aucun effet sur les sujets les moins actifs, en revanche favorise globalement les déplacements des plus actifs (A).

Ces données indiquent que malgré le handicap du groupe A qui ne retrouve pas les mêmes stimulations familières fondamentales (courants), lors de son transfert dans le nouvel environnement, celui-ci manifeste une activité globale constante importante qui représente un avantage certain pour la familiarisation au milieu et la recherche de la nourriture.

#### B) Répartition spatiale des activités : modalité d'occupation des différentes strates du milieu (Fig. 2)

Les données actographiqués sont analysées en tenant compte des différents niveaux d'occupation de l'espace. Le niveau de surface est exclu de cette étude et sera repris ultérieurement : il s'agit du niveau des mangeoires. Ainsi, trois niveaux sont considérés ici : niveau 1, proche du substrat ; niveau 2, intermédiaire profond ; niveau 3, intermédiaire de surface.

De l'ensemble des données, il est possible de dégager les faits suivants :

- L'inhibition initiale observée dans les deux groupes correspond à un confinement en zone proche du substrat, réponse qui n'est pas dépendante de l'histoire vécue.

- Une augmentation de l'activité générale traduisant la levée de l'inhibition initiale ne se manifeste pas forcément par une exploration immédiate des différentes strates. L'effet de contraste (groupe A) tend à retarder l'exploration des zones superficielles ainsi que l'établissement du rythme circadien.

- Le modèle comportemental stable qui se met en place est différent suivant l'histoire vécue : les poissons tendent à reproduire en milieu nouveau le modèle acquis antérieurement : activité en pleine eau et en zone superficielle pour le groupe A, séjour prolongé proche du substrat en dehors de la période de nourrissage, pour le groupe B.

- Une stimulation par les courants, sans augmenter le niveau global de l'activité des poissons du groupe A, en revanche favorise les déplacements d'une strate à l'autre, tendant à une meilleure exploitation possible de l'espace. Remarquons que le modèle que ces poissons développaient antérieurement avait également pour caractéristique un changement rapide dans les niveaux superficiels et intermédiaires. Pour le groupe B, cette même stimulation nettement inhi-



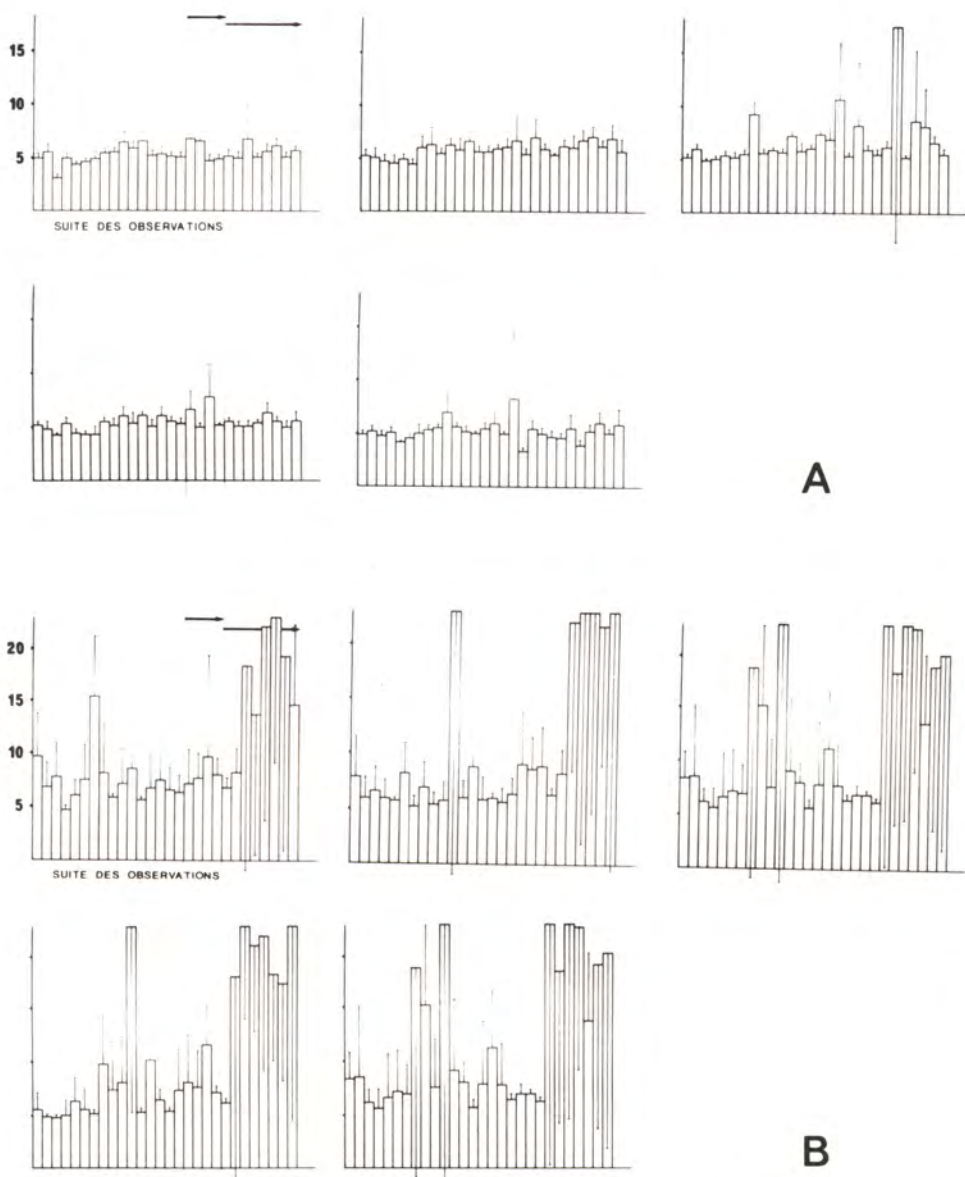


Fig. 3

Evaluation des vitesses individuelles de nage et cohésion de groupe.

Situation A : Sujets ayant été élevés sous stimulations,

Situation B : Sujets témoins.

première flèche : stimulations par courants,

deuxième flèche : stimulations visuelles.

en ordonnées : temps, en minutes, nécessaire pour parcourir 100 mètres.

bitrice comme nous l'avons vu précédemment, provoque un confinement des activités en zone proche du substrat.

- Une augmentation du niveau des stimulations visuelles apparue comme activatrice sur le plan quantitatif manifeste les mêmes propriétés sur le plan qualitatif pour le groupe A, confirmant le niveau de vigilance plus élevé de ces poissons. En revanche, les poissons du groupe B sont maintenus dans leur confinement en zone proche du substrat, confirmant leur réactivité aux modifications imposées dans leur environnement.

Il apparaît par cette analyse du mode d'occupation de l'espace que les poissons réagissent très différemment d'un groupe à l'autre; ceux qui appartiennent au groupe A manifestant de nouveau un avantage dans le niveau d'exploration des différentes strates du milieu.

#### C) Evaluation des distances parcourues et synchronisation des déplacements au sein du groupe (Fig. 3)

Parallèlement à l'étude actographique, nous avons procédé à une étude des déplacements individuels qui consiste à chronométrer les délais séparant deux passages consécutifs en un même point de l'enceinte annulaire. Dix relevés successifs sont effectués pour chaque sujet au cours d'une même session. Seize sessions sont réparties sur la période de 3 à 15 jours à raison de 1 ou 2 par jour; quatre sessions sont réalisées après changement des courants; huit sessions après l'enrichissement de l'environnement visuel.

Les données indiquent une importante différence dans les comportements individuels des poissons des deux groupes éprouvés. Pour le groupe A, une grande homogénéité apparaît d'une session à l'autre, d'un sujet à l'autre et chez un même sujet au sein d'une même session, à l'inverse de ce qui est obtenu pour le groupe B. Cette observation rend compte d'une plus forte cohésion du groupe social manifestée dans la condition A.

La présence de courants plus forts déclenche une hétérogénéité dans les modalités de déplacement des poissons du groupe A, d'une session à l'autre, mais la cohésion du groupe n'est pas entamée, - les déplacements étant souvent synchronisés. Ces fluctuations temporelles se superposent à celles observées précédemment dans l'occupation de l'espace à la même période. La réponse du groupe B, à l'inverse, est une tendance à la synchronisation des déplacements et à leur régulation dans le temps se surajoutant au confinement en zone profonde observée précédemment.

Une stimulation de nature visuelle reconnue précédemment comme activatrice pour le groupe A, ne produit aucun effet sur les longs déplacements. On en déduit que l'activation observée affecte le niveau local, confirmant la fréquence observée précédemment des changements de strates.

En revanche, une importante réponse est obtenue pour le groupe B, après un temps de latence, on observe un ralentissement considérable des déplacements. L'activité devient sectorielle, s'ajoutant à la localisation près du substrat qui a été mise en évidence précédemment.

Une telle sédentarisation qui se généralise pour tous les poissons du groupe peut être considérée comme un handicap certain,

la perte de mobilité et le confinement allant à l'encontre d'une maximisation de l'exploitation du milieu.

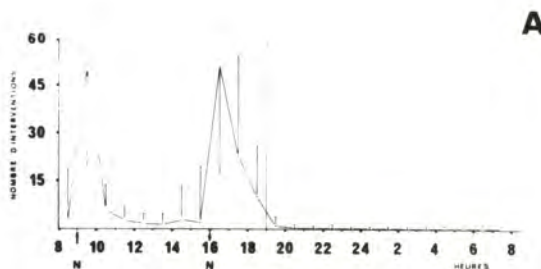
Au delà de ces faits, il est possible également de se faire une idée des vitesses que pourrait atteindre le jeune Bar, en absence d'obstacle et sur substrat régulier. Les vitesses de croisière stabilisée, les plus fortes enregistrées sont de 1,165 km/h pour le groupe A et 1,029 km/h pour le groupe B.

#### D) Etude de l'activité aux mangeoires

Cette étude est réalisée à partir de données actographiques non encore prises en compte (niveau 4).

##### 1) Répartition dans le nyctémère des visites aux mangeoires (Fig. 4)

Les données journalières cumulées indiquent que les explorations des mangeoires sont maximales au moment de la réalimentation de celles-ci, quel que soit le groupe testé ; toutefois remarquons que les poissons du groupe A tendent à prolonger l'exploitation des mangeoires au-delà de la première heure qui suit la présentation de la nourriture. De plus, leur activité trophique nocturne est nettement moins marquée que pour leurs congénères du groupe B. Enfin, les visites entre les périodes de nourrissage sont loin d'être négligeables, les mangeoires sont constamment visitées. On peut se demander si elles ne le seraient pas plus intensément dans la mesure où les approvisionnements seraient plus fréquents : ces données montrent la disponibilité des poissons à exploiter toute source de nourriture en dehors des heures habituelles, de nourrissage.

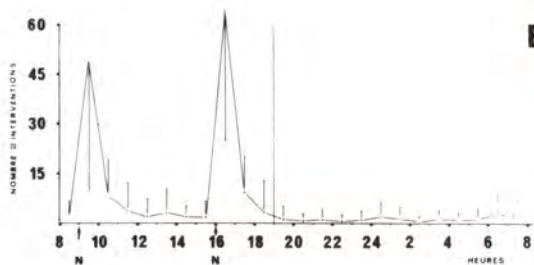


**A**

Fig. 4

Activités aux mangeoires au cours du nyctémère : résultats cumulés de 22 jours de test.

- Les mangeoires sont alimentées chaque jour à 9h et 16h. (N)



**B**

- Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulations.

- Situation B : sujets témoins.



2) Différences entre matin et après-midi dans la réponse à la présentation de la nourriture (Fig. 5)

L'étude des taux de visites enregistrées le matin et l'après-midi au sein d'une même journée montre que les différences sont fluctuantes d'un jour à l'autre, dans leur amplitude comme dans leur sens ; toutefois, elles tendent à être, globalement, en faveur de l'après-midi.

Les stimulations testées n'ont pas d'effet sur la répartition des explorations aux mangeoires.

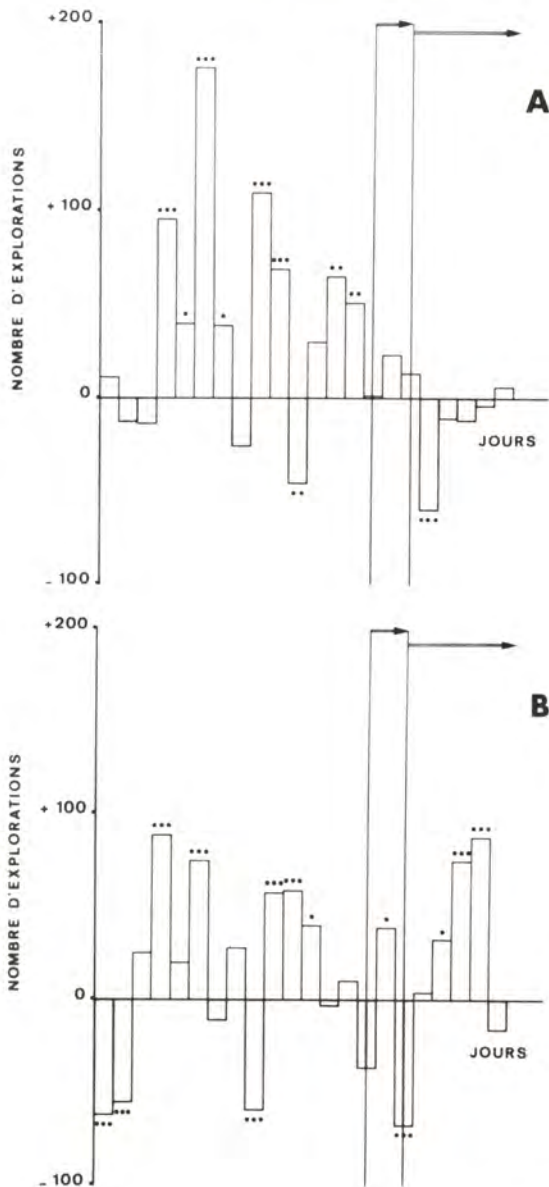


Fig. 5

Différences entre matin et après-midi observées dans la réponse à la présentation de la nourriture.

Les différences journalières sont exprimées en nombre de visites aux mangeoires : elles sont positives si les mangeoires sont plus fréquentées l'après-midi et négatives en cas contraire.

Sont prises en compte les visites répertoriées dans la période de 3 heures qui suit l'approvisionnement de la mangeoire.

- Flèches : stimulations par courants, puis stimulations visuelles.
- \*, \*\*, \*\*\*, : Différences significatives au seuil de 5 %, 1 %, 1 %.
- Situation A : Sujets ayant été élevés sous stimulations.
- Situation B : Sujets témoins.

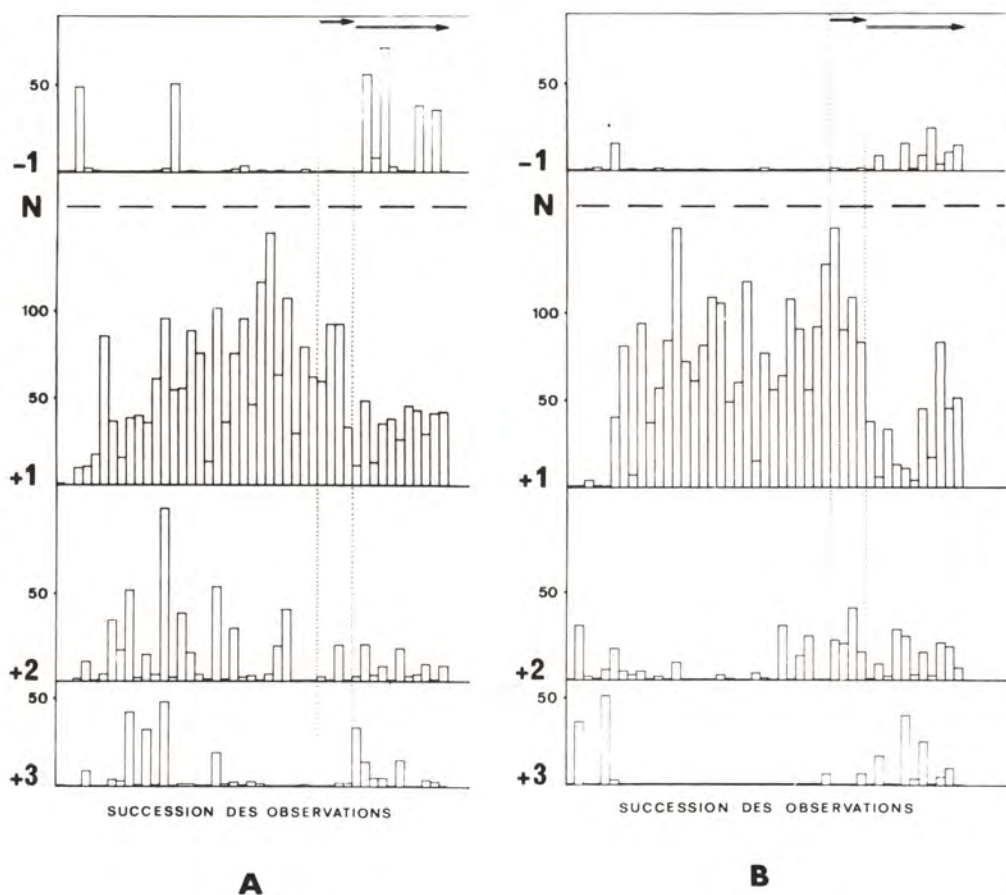


Fig. 6

Evolution du niveau des activités aux mangeoires dans l'heure qui précède (-1) et dans les trois heures qui suivent (+1, +2, +3) la présentation de la nourriture (N).

- axe des ordonnées : nombre de visites aux mangeoires,
- flèche : stimulations par les courants, puis stimulations visuelles.

Situation A : Sujets ayant été élevés sous stimulations,  
 Situation B : Sujets témoins.

### 3) Evolution dans le temps du niveau des activités aux mangeoires (Fig. 6)

Cette étude porte sur la seule période pour laquelle il est observé un fort niveau d'activité trophique, c'est-à-dire, dans les conditions décrites, au moment où la nourriture est présentée : elle concerne les activités enregistrées au niveau 4 au cours des 45 sessions d'observation.

Les principales observations sont les suivantes :

- Dans la première heure qui suit l'approvisionnement des mangeoires, le nombre d'interventions des poissons augmente progressivement depuis le premier jour qui suit leur transfert dans le nouveau milieu, mettant en évidence un processus d'apprentissage. Ce dernier semble plus rapidement établi pour le groupe B qui avait antérieurement acquis un comportement de trophique par prélèvement direct à la mangeoire plus élaboré que le groupe A.

- Cet apprentissage se matérialise également au niveau de la seconde et troisième heure au cours desquelles les visites aux mangeoires sont de moins en moins fréquentes.

- Remarquons une nette différence entre les activités des deux groupes, à ces mêmes niveaux : le groupe A maintient globalement un taux d'exploration plus important que le groupe B. Autrement dit si l'exploration est plus précoce pour les uns (B), l'exploitation tend à être plus prolongée et plus soutenue pour les autres (A).

- Si la présence de courants plus forts ne semble pas perturber les activités aux mangeoires ; en revanche, un changement dans le niveau des stimulations visuelles a pour effet immédiat de perturber le modèle d'exploitation mis en place : ce dernier se trouve nettement étalé dans le temps. De plus, alors que les visites aux mangeoires étaient rares dans l'heure qui précède leur réapprovisionnement, ces mêmes stimulations produisent une augmentation des visites inopérantes.

### 4) Evolution de la modalité d'exploitation des mangeoires : importance des premières dix minutes (Fig. 7)

L'analyse détaillée de la répartition temporelle de l'activité trophique manifestée pendant la période étudiée englobant le moment du nourrissage, montre une activité phasique désordonnée polymorphe dans les premiers jours qui suivent l'introduction des poissons dans leur nouvel environnement.

Ultérieurement on observe une structuration temporelle de l'activité aux mangeoires marquée par une prédominance des visites dans les 10 premières minutes qui suivent leur approvisionnement.

L'aspect polyphasique de l'exploitation de la source réapparaît à la suite de l'application de stimulations, surtout marqué si l'on fait appel à la modalité visuelle : un désordre important apparaît dans ce cas, quel que soit le groupe.

Si nous confrontons ces données avec celles obtenues dans le cadre de l'analyse de l'activité générale, nous constatons qu'à une augmentation de l'activité de déplacement globale correspond une augmentation du niveau des visites aux mangeoires pour le groupe A.



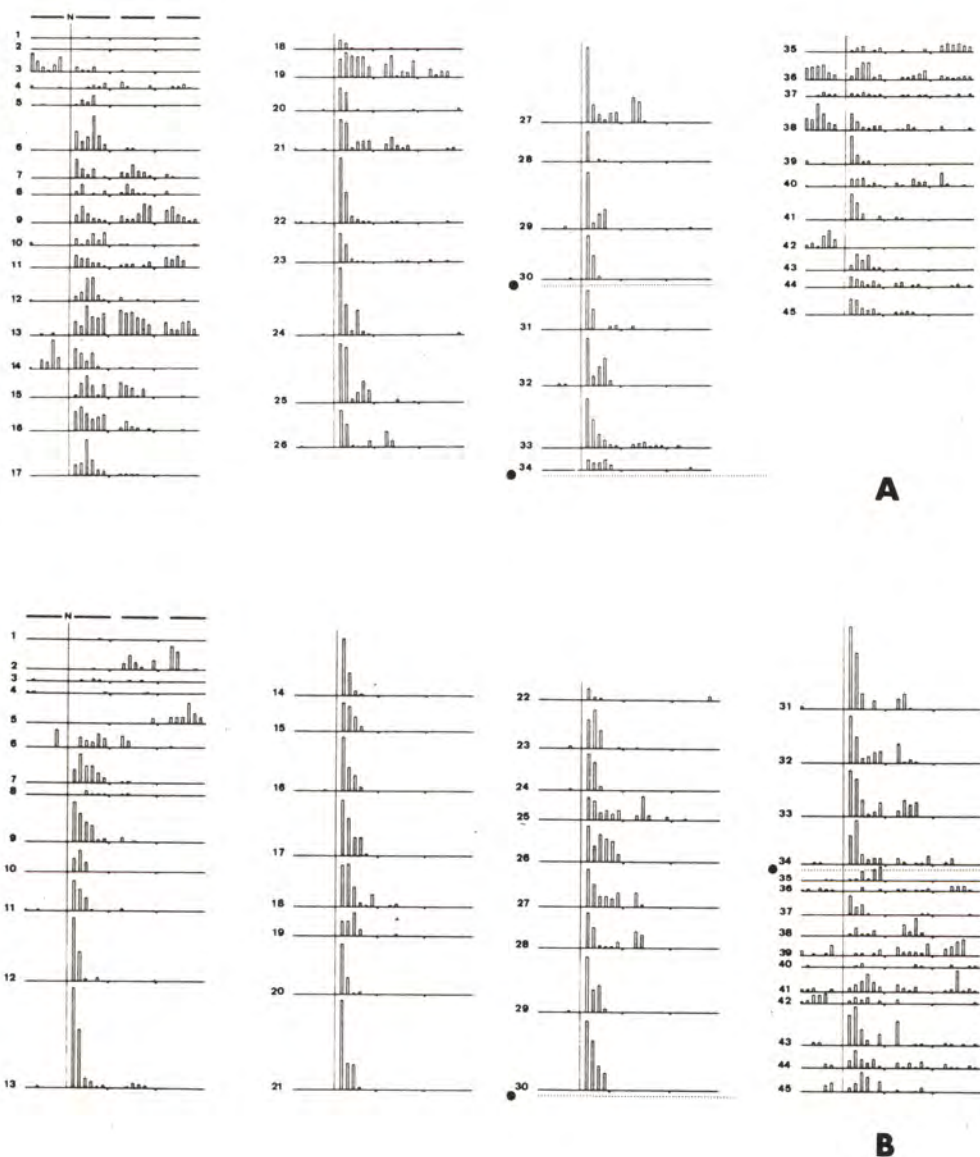


Fig. 7

Evolution de la modalité d'exploitation des mangeoires : importance des dix premières minutes qui suivent la présentation de la nourriture.

Situation A : Sujets ayant été élevés sous stimulations

Situation B : Sujets témoins

Stimulations par courants entre la 30e et 31e session,  
Stimulations visuelles entre la 34e et 35e session.

N : Nourriture ; les visites aux mangeoires sont comptabilisées de 10 minutes en 10 minutes dans l'heure qui précède et les trois heures qui suivent la présentation de la nourriture.

La corrélation n'est pas aussi nette pour le groupe B qui reproduit ici le modèle antérieurement acquis avec alternance entre séjour en zone proche du substrat et séjour à la mangeoire.

Les stimulations de l'environnement, sont apparues perturbatrices autant au niveau des modalités de déplacement que des modalités d'exploration des mangeoires, quel que soit le groupe étudié.

Remarquons que cette analyse des visites aux mangeoires est globale et ne tient pas compte du fait que une seule, sur les six mangeoires disponibles, est approvisionnée à chaque session.

#### E) Capacité de discrimination de la mangeoire approvisionnée

L'étude qui suit tient compte de la localisation des visites et permet d'évaluer l'acuité discriminative des poissons : elle porte sur les premières 30 minutes qui suivent la recharge des mangeoires.

##### 1) Concordance entre la première mangeoire explorée et la mangeoire approvisionnée (Tableau 1)

Les données montrent que les poissons manifestent une très bonne faculté de discrimination initiale ; le groupe A réalisant un meilleur score que le groupe B.

Situation	A	B
Nombre total de sessions	45	45
Sessions exclues	2	4
Sessions prises en compte	43	41
Concordance observée entre première mangeoire explorée et mangeoire approvisionnée	42	38
Non concordance	1	3

Toutefois, si les réponses sont initialement concordantes, en général, il arrive souvent que, par la suite, d'autres mangeoires soient l'objet d'une tentative d'exploitation, de telles conduites devenant alors inopérantes.

##### 2) Cas où d'autres mangeoires sont explorées

###### a) Fréquence d'un tel comportement inadapté

L'étude de la répartition des sessions en fonction de la nature des mangeoires explorées (approvisionnée ou non) montre que les poissons constituant le groupe A visitent moins souvent les mangeoires vides que leurs congénères du groupe B ( $X^2 = 11,11$ , 1 dd1,  $P < 0,001$ ).

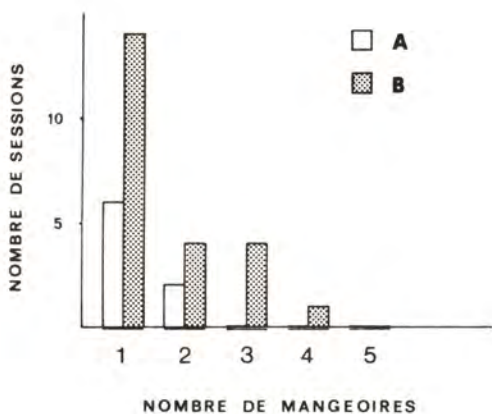


Fig. 8

Répartition des fréquences des sessions en fonction du nombre de mangeoires non approvisionnées qui font l'objet d'une tentative d'exploitation.

1... 5 : nombre de mangeoires explorées au sein d'une même session.

Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulation,  
 Situation B : sujets témoins.

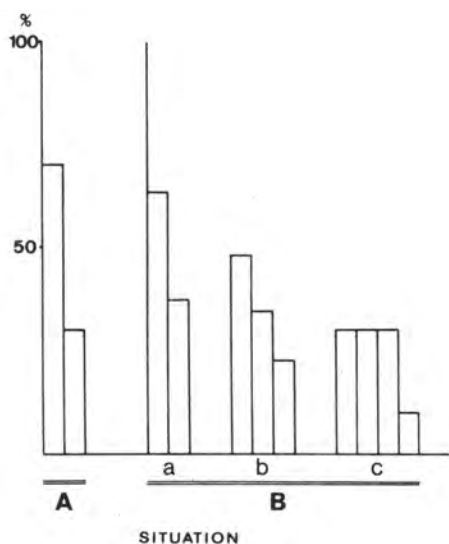


Fig. 9

Taux des activités manifestées à chaque mangeoire non approvisionnée en fonction du nombre de celles-ci explorées par session.

a,b,c, : 2,3 ou 4 mangeoires visitées lors d'une même session.

Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulation.  
 Situation B : sujets témoins.



Situation	A	B
Fréquence des sessions dans lesquelles une ou plusieurs mangeoires autres que celle qui est approvisionnée est, ou sont explorées	8	23
Fréquence des sessions dans lesquelles aucune autre exploration n'est enregistrée en dehors de la mangeoire approvisionnée	25	18
Nombre total de sessions prises en compte	43	41

b) Amplitude d'un tel comportement inadapté (Fig. 8)

L'étude de la répartition des sessions en fonction du nombre de mangeoires visitées lors d'une même session montre que, quel que soit le groupe, la totalité des mangeoires disponibles n'a jamais été visitée.

De plus, le groupe B manifeste une tentative d'exploitation d'un nombre de mangeoires non approvisionnées supérieur à celui manifesté par le groupe A.

Enfin, quel que soit le groupe, il est plus fréquent de ne voir qu'une seule mangeoire visitée au cours d'une même session.

En cas contraire, on peut se demander comment se répartissent les visites lorsque plus de deux mangeoires font l'objet d'une tentative d'exploitation.

c) Modalité de répartition des explorations (Fig. 9)

Les données indiquent que lorsque plusieurs mangeoires font l'objet d'une visite, l'une d'entre elles paraît privilégiée, quel que soit le groupe.

Toutefois ce n'est pas le cas si plus de trois mangeoires sont explorées.

On peut alors se demander si de telles conduites ne sont pas dictées par la présence d'une trace mnésique qui oriente les poissons, en-dehors de la mangeoire approvisionnée, vers les mangeoires qui étaient récemment mises en service dans les sessions qui ont précédé.

d) Relation entre le niveau de tentative d'exploitation des mangeoires et la proximité temporelle de leur utilisation antérieure (Fig. 10)

Pour chacune des sessions successives, les mangeoires non approvisionnées qui font l'objet d'une visite sont réparties en fonction de l'ancienneté de leur utilisation antérieure. Chacune d'elles est affectée d'un indice (1 si la mangeoire était fonctionnelle dans la dernière session, 2 si elle l'était dans l'avant dernière, et ainsi de suite...).

Nous constatons que le maximum d'ancienneté observé est différent d'un groupe à l'autre, le groupe A n'explorant que les mangeoires qui avaient été très récemment mises en service.

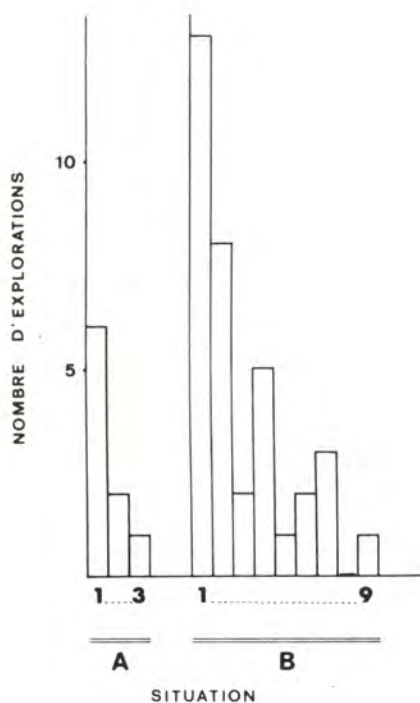


Fig. 10

Répartition des fréquences d'exploration des mangeoires non approvisionnées en fonction de leur ancienneté d'utilisation.

1...3 ; 1... 9 = niveau d'ancienneté d'utilisation des mangeoires explorées.

Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulation.

Situation B : témoins.

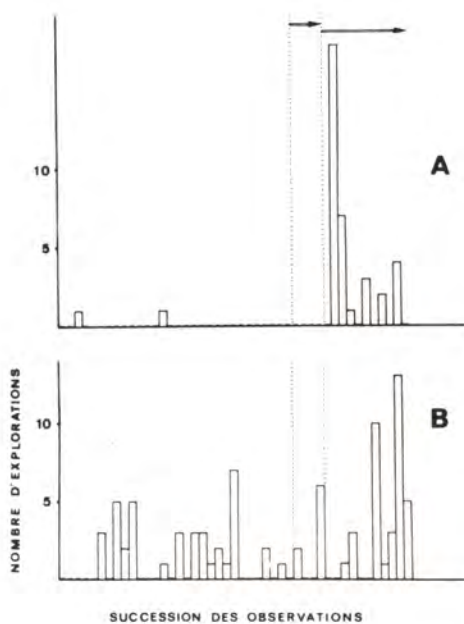


Fig. 11

Evolution dans le temps de la fréquence d'exploration des mangeoires non approvisionnées

Flèches : stimulations par courants puis stimulations visuelles

Situation A : sujets ayant été élevés sous stimulation.

Situation B : sujets témoins.

Quel que soit le groupe, le taux des visites est maximum pour la mangeoire la plus récemment utilisée, ce taux diminuant progressivement au fur et à mesure que l'indice d'ancienneté augmente.

Il apparaît indiscutablement que ces tentatives d'exploitation se trouvent être placées sous le contrôle d'une mémoire de nature à la fois spatiale et temporelle.

e) Signification du comportement d'exploration des mangeoires non alimentées (Fig. 11)

On aurait tendance à penser que les explorations inopérantes des mangeoires non alimentées pourraient être considérées comme des "erreurs comportementales" que les poissons pourraient apprendre à corriger au cours des sessions successives : une telle modification dans leur comportement traduirait alors une capacité d'apprentissage aboutissant à une amélioration de la "rentabilité" de leurs explorations.

L'étude des débits de réponse aux mangeoires non approvisionnées manifestés par les deux groupes montre qu'en dehors de toute stimulation nouvelle, les poissons se comportent très différemment les uns des autres.

Dans le premier cas (A), les rares explorations enregistrées se situent exclusivement dans la première moitié de l'épreuve. Cette observation, limitée toutefois, tend à indiquer que les sujets sont capables d'apprentissage, améliorant au fil du temps le rendement de leurs comportements dans la zone des mangeoires.

Dans le second cas (B), le taux des explorations inopérantes, tout en étant variable d'une session à l'autre, reste globalement à un niveau important ne manifestant aucune évolution : aucun apprentissage n'est décelable chez ces sujets.

La présence de stimulations issues du milieu provoque une facilitation de ce type de conduites erronées, quel que soit le groupe. Toutefois, pour le groupe A, non seulement le comportement aux mangeoires vides n'est pas modifié, si la stimulation est de nature familière (courants) mais encore lorsqu'une stimulation non familière vient accroître le niveau de ces conduites inopérantes, l'adaptation qui suit est très rapide et le niveau de ces tentatives baisse d'une manière significative.

Une telle adaptation n'apparaît pas dans les résultats manifestés par le groupe B, malgré l'absence du renforcement alimentaire.

Une nouvelle fois apparaît l'avantage que manifeste le premier groupe vis-à-vis du second.

#### C O N C L U S I O N

De l'ensemble de ces données, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

- Le transfert d'un environnement familier à un milieu inconnu se traduit pas une inhibition comportementale avec confinement en zone proche du substrat accompagné d'un blocage de l'activité trophique.



- La levée totale de l'inhibition initiale est plus rapide si le contraste entre les conditions anciennes et nouvelles est moins important : elle se traduit par une exploration des strates moyennes et superficielles ainsi que par une reprise de l'activité trophique.

- Les caractéristiques des comportements qui se développent dans un nouvel environnement - niveau d'activité, localisation, cohésion du groupe, modalité d'approche des mangeoires - sont calquées sur celles des modèles comportementaux que les poissons avaient antérieurement acquis, mettant en évidence l'importance de l'histoire vécue.

- De plus, les capacités d'adaptation face à des stimulations non familières sont placées sous le contrôle des acquisitions antérieures : les poissons élevés sous stimulation par les courants sont plus aptes à exploiter correctement un nouveau milieu et tout laisse à croire que de telles possibilités acquises ne peuvent qu'être favorables au développement et à la survie des individus.

Ces données, qui mettent en évidence à la fois la sensibilité des jeunes Bars aux perturbations de leur environnement et les facultés d'acquisition de conduites orientées, incitent à s'engager dans la détermination des conditions de maintenance optimales qui doivent présenter des niveaux de stimulations correctement dosées sur le plan quantitatif et qualitatif afin de permettre la mise en place de modèles comportementaux définis en fonction d'une stragégie. Il apparaît clairement que les conditions d'élevage en Aquaculture pourraient être pensées globalement et que les conduites à acquérir pourraient ne pas être les mêmes si les poissons sont destinés à être maintenus en bassins ou à être réintroduits dans le milieu naturel.

Enfin, il reste à définir s'il existe, chez les Poissons des périodes de la vie juvénile, post larvaire voire larvaire, qui sont plus sensibles que d'autres à l'intervention de telle ou telle stimulation, à rapprocher des *périodes critiques* telle qu'elles ont été mises en évidence chez les Vertébrés Supérieurs et dont on reconnaît de plus en plus l'importance dans l'ontogénèse comportementale.

---

Anthouard M. (en préparation) Modalités d'acquisition de comportements adaptés chez le jeune Bar (*Dicentrarchus labrax*).

Greenough W.T., 1974 -Enduring brain effects of differential experience and training. Conf. on Neural mechanisms of learning and memory. Asilomar., June 23-29/74.

Hunt Mc V. 1979 - Psychological development : Early experience. Ann. Rev. Psychol., 30, 103-143.

Mitchell D., 1976 -Experiments on neophobia in wild and laboratory rats : a reevaluation. J.comp.physiol.Psychol., 90, 190-197.

Rosenzweig M.R. et Bennett E.L., 1977 - Effects of environmental enrichment or impoverishment on learning and on brain values in rodents. In Genetics, Environment and Intelligence; ed. A. Oliverio 163-196 ,Amsterdam : North. Holland Biomedical.

Thorpe W.H., 1963 - Learning and instincts in animals. London Methuen.

Warren E.W. & Callaghan Sh. 1976 - The response of male guppies (*Poecilia reticulata*, P.) to repeated exposure to an open-field. Behav. Biology, 18,499-513.

LES CHAINES ALIMENTAIRES NATURELLES ET L'AQUACULTURE

Gilbert BARNABE

Université des Sciences et Techniques du Languedoc  
Station de Biologie Marine et Lagunaire  
Quai de la Daurade  
34200 - SETE

RESUME

C'est sur la manipulation des chaînes alimentaires naturelles qu'est basée l'aquaculture, mais la connaissance et la maîtrise des réseaux trophiques aquatiques ne sont que fragmentaires.

Parallèlement aux voies d'étude qui visent à reconstituer certaines phases de ces processus (production de microalgues, de zooplancton herbivore) d'autres potentialités ont été examinées :

- Utilisation des bactéries photosynthétiques;
- Extraction et emploi du phytoplancton issu de bassins de lagunage;
- Collectes et utilisation du zooplancton de bassins de lagunage et de zones humides;
- Essai d'exploitation de la productivité naturelle des eaux néritopélagiques.

Ces diverses utilisations des chaînes alimentaires naturelles sont exposées ainsi que les applications industrielles auxquelles certaines ont déjà donné lieu.

MOTS-CLES    Plancton - Bactéries photosynthétiques  
                 Mollusques - Aquaculture en mer

---

Si l'on excepte la consommation directe par l'homme de végétaux aquatiques, l'aquaculture de production consiste en la manipulation des chaînes alimentaires naturelles pour la production d'espèces utiles à l'homme.

A la différence de l'aquaculture traditionnelle (pisciculture en étang, conchyliculture), l'aquaculture nouvelle a entrepris de maîtriser non seulement le cycle complet de l'espèce élevée, mais également toute la chaîne alimentaire qui y conduit.

Les voies utilisées pour atteindre un tel but sont nettement divergentes : dans les pays anglo-saxons dont les conditions de température et d'ensoleillement naturelles sont rarement optimales, l'accent a été mis très tôt sur la reconstitution artificielle en milieu contrôlé de telles chaînes dont le point de départ est constitué par la culture "artificielle" des micro-algues.

A l'autre bout du monde, les Japonais opéraient de façon plus pragmatique, mêlant techniques de terrain et de laboratoire pour aboutir aux résultats que l'on sait.

L'exemple anglo-saxon a davantage inspiré l'aquaculture française que ne l'a fait l'exemple japonais malgré le grand nombre d'observateurs qui ont visité ces réalisations. Ainsi, les Japonais maîtrisent l'élevage intensif des micro-algues ou des rotifères à l'échelle du grand volume (quelques dizaines à quelques centaines de m<sup>3</sup>), tandis que cette maîtrise ne dépasse guère le m<sup>3</sup> en Europe.



Depuis une décade, il n'y a pas eu à proprement parler de progrès significatif dans cette technologie et l'émergence au plan de la production économique de l'aquaculture dite nouvelle n'a pas eu lieu. Le principal point de blocage, identifié depuis longtemps (BARNABE et RENE, 1972, HOUDE, 1973, FUJITA, 1973) tient à ce que la production de juvéniles exige justement de disposer en quantité de micro-algues ou de zooplancton pour nourrir les fragiles larves jusqu'à l'état de juvéniles plus robustes, que l'on pourra confier au milieu naturel (repeuplement) ou à l'engraissement (élevage intensif).

Les solutions les plus diverses ont été essayées pour tenter de surmonter cet obstacle. Nous en avons pour notre part testé quelques-unes. Certaines sont à peine sorties de la phase prospective, d'autres sont utilisées au stade artisanal ou industriel.

#### UTILISATION DES BACTERIES PHOTOSYNTHETIQUES POUR L'ELEVAGE DE LARVES DE MOULES \*

Cette expérience, tout à fait limitée, a eu lieu du 15.12.1981 au 04.01.1982 à partir de bactéries photosynthétiques issues du lagunage de Mèze et concentrées par centrifugation. Selon BALEUX et TROUSSELLIER (1982) l'espèce dominante s'apparente à *Thiocapsa roseopersicina* et la densité de ces bactéries pourpres (Bactéries Sulfo-oxydantes) atteint  $10^9$  b/ml, conférant à l'eau une couleur rouge-lie de vin.

Il n'est en tout cas pas rare d'obtenir un culot de centrifugation représentant 1 % du volume initial. Même dans les cas d'extrême abondance bactérienne, les micro-algues ne sont jamais absentes (elles sédimentent avant les bactéries et sont aisément repérables dans le culot).

Les larves de moules ont été élevées à 20°C dans des cônes de Himhoff de 1 l à la densité de 20000 individus/l. Une diffusion d'air à la pointe du cône assurait un brassage léger. Un témoin nourri de micro-algues centrifugées, issues d'un bassin isolé de 5000 m<sup>2</sup> situé sur le lagunage de Mèze, a servi d'élément comparatif. Dans les deux essais, nous avons introduit de la nourriture (culot de centrifugation) une fois par jour jusqu'à atteindre une densité optique (mesurée à la trousse HACH) de 0,15.

Les résultats de croissance en fonction du régime alimentaire sont les suivants :

Age : 6 ème jour :	Micro-algues	97,5 u ± 4,3
	Bactéries pourpres	102,6 u ± 3,6
18 ème jour :	Micro-algues	116,7 u ± 5,25
	Bactéries pourpres	153,2 u ± 4,9
20 ème jour :	Bactéries pourpres	159 u ± 10,1

L'expérience est arrêtée le 18 ème jour pour les larves nourries de micro-algues : de nombreuses pertes de larves ont eu lieu lors des changements d'eau, la floculation spontanée de ces algues piège de nombreuses larves dans les floccs, la mortalité enfin, bien que non évaluée, a été très importante.

Les résultats méritent d'être comparés à ceux qu'a obtenu LE ROUX (1975) à l'aide de divers régimes d'algues sur *Mytilus edulis* dont l'oeuf est plus gros (100 µ de diamètre contre 60 à 70 µ pour *Mytilus galloprovincialis*). A l'âge de 20 jours, les tailles moyennes des élevages recevant les meilleures espèces d'algues vont de 150 à 180 µ.

L'expérience a été arrêtée pour des raisons pratiques, et si la mortalité n'a pas été évaluée, elle a été bien moindre que dans le témoin nourri de micro-algues. Une observation sans doute subjective mérite d'être rapportée : la vitesse de nage des larves nourries de bactéries pourpres paraît bien plus grande que celle de leurs congénères du témoin.



L'intérêt des bactéries du cycle du soufre dépasse les limites de l'aquaculture puisque les Japonais proposent de les utiliser pour l'obtention de produits nobles (vitamine B, etc.) à partir de déchets industriels (KOBAYASHI et TCHAN, 1973), mais la découverte des phénomènes d'hydrothermalisme sous-marin a démontré que des mollusques pouvaient prospérer avec, comme seule source nutritive, des bactéries utilisant également le soufre (de façon chémosynthétique). Une revue exhaustive de cette question a été réalisée par LAUBIER 1982. S'il n'est guère possible d'entrer dans le détail de cette intéressante question (JANNASH, 1979, JANNASH et WIRSEN, 1981, RUBY et coll., 1981) notons que ces bactéries du soufre se rencontrent dans les abysses et dans les lagunages à des concentrations de  $10^5$  à  $10^9$  b/ml. Cette corrélation en appelle une autre : dans les deux cas, les croissances observées sont exceptionnelles (à l'âge de 6 ans 1/2, une moule issue du rift des Galapagos a une longueur de 22 cm).

Ce sont sans doute des considérations de ce genre qui ont poussé JANNASH (1979) à proposer un système d'aquaculture basé sur l'oxydation du  $SH_2$  par les bactéries chémosynthétiques, notamment pour la production de mollusques. Nos données préliminaires montrent que les bactéries photosynthétiques présentent les mêmes avantages pour l'aquaculture et sont déjà disponibles. La coloration qu'elles confèrent à l'eau n'est malheureusement pas appréciée. Nous avons donc dû définir une procédure pour les éliminer du lagunage de Mèze et nous priver ainsi de la possibilité de continuer cette intéressante étude.

#### EXTRACTION ET EMPLOI DU PHYTOPLANCTON ISSU DE LAGUNAGES \*

Il est actuellement admis que la technique de production de micro-algues la plus économique est celle du lagunage (SOEDER, 1981); l'utilisation d'une telle production primaire selon les techniques de la pisciculture d'étang est d'ailleurs déjà engagé dans plusieurs pays à grande échelle.

Au plan conceptuel, la connaissance puis la maîtrise de l'écosystème étang est loin d'être acquise, aussi avons nous proposé d'en séparer les divers niveaux trophiques (BARNABE, 1980). Pour l'aquaculture nouvelle, cette nécessité est encore plus impérieuse : les structures de base, c'est-à-dire les écloséries et les nurseries destinées à produire les sujets d'élevage peuvent être conçues comme des structures d'élevage intensif (compte tenu de la petite taille et du grand nombre de juvéniles que l'on peut y élever dans des volumes d'eau réduits mais contrôlés); il faudra toujours fournir à ces stades larvaires des proies en quantité et qualité adéquate. Les micro-algues constituent le point de départ traditionnel conduisant à ces élevages (Mollusques, Crustacés, Poissons) au travers de filières différentes. Il est donc nécessaire de "compartimenter" les divers maillons trophiques pour les nécessités des élevages, mais cela permet également d'assurer à chaque stade les meilleures conditions d'environnement.

La séparation physique des micro-algues de l'eau de lagunage est un pas vers cette production compartimentée. Nous en avons exposé les premiers résultats par ailleurs (BARNABE, 1982, BARNABE-PERIGAUT, 1983). Nous n'en reprendrons que les grandes lignes en les actualisant : une centrifugeuse industrielle automatique, d'une puissance de 4 kW et capable de traiter 1800 à 2000 l d'eau par heure (eau issue d'un bassin de lagunage) permet d'obtenir 757 g/h de micro-algues (poids humide) soit 182,7 g/h en poids sec, ce qui représente plus de 18 kg de phytoplancton frais par jour et dépasse la capacité des plus grandes salles de production d'algues opérationnelles à ce jour.

Ce phytoplancton a déjà été utilisé pour le prégrossissement de mollusques (500.000 huitres stockées en bassin recyclé au lagunage de Mèze). Il n'a pas encore été utilisé à l'échelle de l'éclosérie pour ce même groupe d'animaux.

La conservation par congélation et à l'état vivant du phytoplancton permet le stockage, évite les contraintes liées à un fonctionnement permanent des structures de culture ou de collecte, et pallie aux pannes ou pénuries. Ce phytoplancton dulcaquicole survit dans des eaux atteignant une salinité de 20‰.

Les micro-algues concentrées peuvent être utilisées à des densités supérieures à celles habituellement rencontrées même dans les cultures les plus denses; c'est, par exemple, ce que nous avons fait pour nourrir des rotifères *Brachionus plicatilis*. A l'échelle du laboratoire et du pilote (bassin de 500 l) des densités dépassant 700 *Brachionus*/ml ont été obtenues. N'y a-t-il pas quelque analogie entre ce constat et les fortes croissances de mollusques signalées dans des milieux où la densité bactérienne était très élevée ?

La présence des algues dans un milieu d'élevage induit un effet "stabilisateur" vis-à-vis de la dégradation du milieu; il joue un rôle peut-être plus important que le facteur trophique dans les hautes densités de rotifères obtenues.

La collecte de micro-algues à partir de lagunages n'intéresse pas que les écloséries ou les nourriceries. En Asie, des chlorelles sont cultivées et centrifugées pour la consommation humaine directe : la production dépasse 1000 tonnes par mois (poids sec) et leur prix était de 48 F/kg en 1980 au Japon (BEHR et SOEDER, 1981). Pour l'aquaculture et l'alimentation de la volaille, le marché était de 2000 tonnes avec un prix de production de 30.000 F/tonne. Les auteurs estiment que le marché atteindrait 0,8.10<sup>6</sup> tonnes si le prix baissait à 3000 F. La centrifugation bien adaptée à la collecte de phytoplancton vivant peut être remplacée par des techniques moins coûteuses telle la floculation, selon l'objectif visé.

L'incorporation d'algues floculées (au sulfate d'Alumine) dans les rations animales a été étudiée en Israël (SANDBANK et EHPHER, 1980) : le sel d'Al n'a pas d'effet toxique et il n'y a pas accumulation d'Al dans les tissus. Il est vrai que le phosphate d'Al est utilisé à dose massive pour le traitement des maux d'estomac !

Les données de PRAT (1982), relatives au lagunage de Mèze, indiquent que les biomasses atteignent 9,4 tonnes/ha en été. Une production annuelle de 50 à 70 tonnes/ha/an, chiffre souvent avancé pour les lagunages de nos régions, est donc tout à fait probable et mérite d'être comparée à celle des terres cultivées (production moyenne 6,5 tonnes/ha/an). La teneur moyenne en protéine des micro-algues est de 55 %, ce qui les rapproche davantage des farines de poisson que des productions végétales.

#### COLLECTES ET UTILISATION DU ZOOPLANCTON \*

Envisagée et expérimentée depuis longtemps (Revue bibliographique sommaire dans BARNABE, 1979), cette technique a fait des progrès spectaculaires grâce à la définition de collecteurs autonomes et peu coûteux (BARNABE, 1977 - 1979 - 1980). Actuellement, la première production de l'aquaculture méditerranéenne nouvelle est celle du zooplancton (*Artemia*, Copépodes, Daphnies, Rotifères). Nous l'estimons proche de 100 tonnes et ses potentialités sont bien supérieures. Deux types de milieux fournissent des espèces bien caractéristiques :

- Les lagunages, flux d'eaux oligohalines eutrophes, produisent des rotifères et des daphnies et accessoirement des copépodes. La biomasse des daphnies a atteint au lagunage de Mèze 2,8 g/l (poids humide) et la production a été estimée sur ce même site à environ 5 tonnes/ha/mois (de Mai à Octobre) par ARGENCE (Communication personnelle).



Le principal problème qui reste posé avec ce type de zooplancton est celui du stockage : la congélation, relativement coûteuse, ne permet pas d'absorber les pics de production estivaux et la qualité bactériologique du produit est mauvaise. La meilleure solution paraît être l'ensilage (BARNABE, 1981). A partir de daphnies ensilées, VENCHARD (1983) a préparé et utilisé avec succès un aliment de sevrage pour les larves du Loup *Dicentrarchus labrax* (L.).

- Les zones humides littorales (marécages, anciens salins) constituent des pièces d'eau stagnantes qui connaissent des "blooms" saisonniers de production : les rotifères, le copépode *Eurytemora velox* et l'*Artemia salina* en constituent les principaux représentants zooplanctoniques dont l'utilisation en aquaculture est bien connue.

Cet intérêt n'est pas seulement lié à la disponibilité quantitative mais surtout à la valeur qualitative de cette nourriture, prouvée à la fois par les constatations des éleveurs et par les travaux de biochimistes japonais; on sait que les acides gras polyinsaturés sont au centre du problème.

Sans insister sur ces collectes largement exposées par ailleurs (BARNABE, 1979 - 1980), il faut souligner qu'elles ne constituent qu'une nouvelle forme de pêche. Il n'y a guère d'aménagement, d'enrichissement visant à orienter la production vers une activité aquacole. De multiples possibilités existent : entre les lagunages qui fournissent des espèces d'eau douce et ces pièces d'eau inexploitées et sursalées, il y a place pour des bassins de production de plancton, mais cette potentialité n'a même pas été envisagée au plan expérimental !

Bien que l'état de la technique ne soit pas ce qu'il pourrait être au niveau de la production et de la récolte de plancton, c'est sur la base de telles collectes que fonctionnent, partiellement ou totalement, plusieurs fermes de production de Loup.

#### ESSAI D'EXPLOITATION DE LA PRODUCTIVITE NATURELLE DES EAUX COTIERES \*

Les réalisations ou les perspectives que nous avons évoquées jusqu'à présent concernent des chaînes alimentaires aquatiques mais non franchement marines. Nous envisagerons l'aquaculture en mer "ouverte" littorale mais en excluant l'élevage en cage de poissons, décrit par ailleurs (BARNABE et coll. 1980, BARNABE et CHRISTIANI, 1980) et ne faisant pas intervenir de chaîne alimentaire naturelle.

Notons tout d'abord que les techniques séparatives utilisées pour récolter le plancton des pièces d'eau abritées n'ont jamais donné de résultat significatif en eau marine : la rareté du zooplancton, la présence de matériel particulaire et d'hydrocarbures constituent, avec l'agitation des eaux, les facteurs limitants de ces collectes dans notre région.

Nous nous sommes intéressés en priorité aux Mollusques (Bivalves) pour plusieurs raisons :

- A la différence des Poissons et Crustacés, l'obtention de juvéniles en grande quantité peut être réalisée en milieu naturel pour l'huître et la moule, par collecte ou captage, et quelques écloséries produisent de façon fiable du nais-sain d'autres espèces.

- Les mollusques extraient leur nourriture des eaux environnantes et transforment donc la production primaire, bactérienne ou "particulaire", en produit consommable.

- Il s'agit là d'une chaîne alimentaire quasi inexploitée puisque la richesse des eaux du Golfe du Lion va de pair avec des fonds meubles et à peu près déserts.



On conçoit la diversité et l'étendue du sujet : nous l'avons abordé sous l'angle technologique car c'est dans ce cadre que nous avons pu obtenir des crédits d'étude. Cela ne doit pas faire sous estimer l'aspect biologique, les problèmes qu'il soulève et les perspectives de production qu'il sous-tend.

Les problèmes technologiques majeurs concernent le maintien des sujets d'élevage, que cet élevage s'effectue sur le fond ou en pleine eau. Les essais réalisés sur le fond par quelques conchyliculteurs, n'ont pas abouti et actuellement tous les efforts se portent sur les élevages de pleine eau (élevage en suspension).

Nous avons défini des structures constituées d'un pieu d'ancrage de type spécial (BARNABE, 1983), de cordes d'élevage d'une longueur de 10 m et de flotteurs vidangeables (bidons renversés). Chaque pieu et chaque flotteur sont communs à 2 cordes; ils sont espacés de 1 m au moins.

La mise en place d'une filière comportant 18 cordes de 10 m a été réalisée sur une concession expérimentale située au large du Cap d'Agde sur des fonds de 20 m (concession attribuée à Mrs BRETON et LICCIARDI, conchyliculteurs) le 09.05.1983. L'amarrage a été effectué en plongée. Les cordes d'élevage étaient constituées de filets tubulaires en polyéthylène (d'usage classique en mytiliculture), doublé d'un filin de polypropylène de 6 mm de diamètre. Ce filet contenait 2 kg/mètre de jeunes moules (poids moyen 2,2 g) récoltées sur le brise-lames du Port de Sète le 05.08.1983. Le poids apparent de ce naissain dans l'eau, mesuré sur plusieurs échantillons dépassant 20 kg de poids réel, varie entre 18 et 22 % de ce poids réel.

Le 25.08.1983, deux de ces cordes étaient prélevées pour pesée. Elles accusaient 54 et 54,5 kg.

Un nouvel ensemble de 2 cordes était prélevé le 26.10.1983, soit 5 mois 1/2 après leur mise à l'eau. Leur poids total était de 410 kg, (10 kg/mètre environ), une partie d'entre elles ayant atteint la taille commerciale.

Depuis le mois de mai, plusieurs tempêtes ont éprouvé structures et sujets d'élevage sans beaucoup de dégâts. En contrepartie, la croissance rapide exige de prévoir des réserves de flottabilité conséquentes. Lorsque ce n'est pas le cas, la base des cordes traîne sur le fond et les moules se détachent. Cette expérience a donné lieu à un pré-rapport (BARNABE et coll, 1983) et se poursuit actuellement.

Parallèlement aux expériences de grossissement, des essais de captage d'huitre plate ont eu lieu à partir du 21 juillet 1983 : 25 éléments verticaux de 8 à 10 m de long, espacés de 1 m, constitués de substrats divers, et maintenus en pleine eau par un flotteur, étaient amarrés sur une chaîne tendue sur le fond. La majorité de ces capteurs sont encore immergés à l'exception de capteurs d'huitres de marque ARMEP, plus connus sous le nom de "chapeaux chinois". Ces disques (diamètre 35 cm, espacement 5 cm) étaient empilés verticalement en 4 séries de 15, entre 18 et 13 m de profondeur. Le captage d'huitres était franchement mauvais (installation trop tardive des capteurs), mais nous avons récupéré après éxondation des capteurs, le 30.11, dans le fond du bateau 217 g de Crevettes (*Palaemon* sp.), 35 g de Crabes (*Macropipus puber*) et 2 petites Cigales (*Scyllarus* sp.). S'il est prématuré de rapporter ces biomasses à un volume ou une surface, on a là une preuve, à la fois de la "richesse" des eaux, et du rôle que peuvent jouer des substrats en situation pélagique.

Un autre constat mérite d'être rapporté : au mois de mai 1982 un prototype de flotteur (sphère de matériau plastique de 50 cm de diamètre) nous était confié pour essais; cette sphère était alors intégrée dans une filière utilisée par un professionnel pour le grossissement saisonnier de moules en mer, au large de la plage de Marseillan, sur des fonds de 20 m (concession expérimentale de Mr

MENOU). Cet ensemble était constitué de cordes à moules soutenues en pleine eau par des bouées immergées; les cordes étaient amarrées à leur base sur des blocs de béton de 80 et 350 kg (aux extrémités). En septembre, un important captage d'huitres plates (*Ostrea edulis*) était constaté sur l'hémisphère supérieur de cette bouée dont la profondeur d'immersion n'était pourtant que de 6,5 m. Au début du mois de novembre, une violente tempête (force 12, vents de 170 km/h) emporta l'ensemble de cette filière, avec notre bouée.

Nous avons retrouvé ces structures d'élevage le 30 juin 1983, à une distance de 6 km environ, sur des fonds de 24 m, à la hauteur de Port Ambonne (Agde). Cet ensemble observé en plongée, n'a pas été identifié tout de suite : il s'agissait en fait d'un amas de filins et de bouées recouverts de jeunes moules, à l'exception de la zone équatoriale des bouées. La coloration particulière de notre prototype a permis sa reconnaissance.

L'opération de récupération réalisée avec difficulté malgré des moyens de levage importants n'a pas permis d'apprécier la quantité exacte de moules fixées sur cette bouée : elle dépasse, à notre avis, la centaine de kg.

Au voisinage et entre les cordes et bouées, évoluaient plusieurs dizaines de loups (*Dicentrarchus labrax*) d'un poids estimé compris entre 1,5 et 6 kg. Au niveau du fond, nous avons constaté la présence de très gros congres et de pieuvres entre les corps morts entassés. La présence de bancs de plusieurs espèces de poissons (*Boops boops*, *Mugil sp.*, *Dicentrarchus labrax*) est quasi permanente. La dimension de ces rassemblements est en relation directe avec la taille des structures d'élevage.

Ces observations et d'autres, accumulées depuis 2 années sur les concessions conchylicoles expérimentales d'Agde et de Marseillan, constituent davantage qu'une collection d'anecdotes : nous avons là une nouvelle chaîne alimentaire engendrée par la simple mise en place, soit de substrats en situation pélagique, soit de filtreurs benthiques en situation pélagique (par colonisation des substrats la seconde situation se réalise naturellement sans intervention humaine).

On peut imaginer comme hypothèse provisoire le processus suivant :

- Production primaire, bactérienne et matériel particulaire dispersés dans la masse des eaux.
- Exploitation de cette production "diffuse" par les filtreurs fixés engendrant une biomasse mais aussi des substrats, des microhabitats nouveaux et modifiant l'hydrodynamisme des eaux à son voisinage.
- Apparition d'une épiflore et/ou d'une épifaune occupant cette nouvelle niche, essentiellement à partir de formes méroplanctoniques (algues diverses, vers, petits crustacés). Il peut s'agir de producteurs primaires, de filtreurs, mais aussi d'espèces brouteuses ou détritivores : la modification de l'hydrodynamisme entraîne le piégeage de matériaux en suspension dans les interstices entre les moules et au niveau de leurs byssus enchevêtrés.

Un tel microcosme exploite avant tout un substrat en situation exceptionnelle au sein de la masse des eaux, et la densité de petits crustacés que l'on découvre en exondant ces structures s'évalue en milliers par mètre : lors du ramassage de naissain de moules en plongée, cette microfaune se fixe sur les combinaisons isothermiques qui apparaissent uniformément blanchâtres.

L'effet attractif de structures de surface ou immergées sur la faune nectonique est connu : qu'il s'agisse des radeaux utilisés en Extrême Orient pour rassembler les poissons pélagiques ou de récifs artificiels "traditionnels", ce tigmotropisme est un fait de comportement indépendant de l'activité trophique (Ex : *Boops boops*, espèce abondante autour des filières, est planctonophage).



Cette recherche de repères visuels n'est pas la seule explication à la présence de Muges ou de Loups au voisinage des filières : les muges en train de "brouter" sur les cordes à moules sont fréquents. Pour les Loups, les petits crustacés constituent une proie préférentielle, ce qui expliquerait leur présence signalée depuis longtemps, sur les zones où les moules abondent (BARNABE, 1976).

Outre les fonctions que nous venons de signaler, les élevages de pleine eau en jouent d'autres ; les pontes de calmars y abondent au printemps, les alevins et juvéniles d'espèces de poissons non identifiées sont fréquents, notamment à la partie haute des structures.

La rencontre de seiches est épisodique tandis que chaque pieu d'an-crage constitué d'un tube creux sert de gîte à un poulpe.

On constate, en définitive, que la mise en place de naissain de moules en cordes d'élevage ou l'immersion de substrats en pleine eau ne doit pas être réduite à une simple opération de conchyliculture. Contrairement à ce qui advient dans l'Etang de Thau ou la prolifération de l'épifaune (*Ascidies*) conduit à une véritable impasse trophique, il y a sur les structures d'élevage marines une double chaîne alimentaire, fonctionnant en parallèle.

#### CONCLUSION

Malgré la diversité des approches expérimentales, toutes convergent vers une finalité commune : la maîtrise à grande échelle de chaînes alimentaires aquatiques.

La méthodologie et la technologie parfois très pragmatiques que nous avons utilisées ne constituent pas pour nous un engagement exclusif vers la production aquacole : c'est parce que nous avons longtemps pratiqué les méthodes et techniques mises en oeuvre à l'échelle du laboratoire que nous avons été conduits à les abandonner partiellement; dans beaucoup d'occasions, elles ne peuvent être transférées à l'échelle du pilote et encore moins du terrain; aussi, une autre approche doit être développée qui va du tube à essai jusqu'à l'écosystème, et vice versa, en privilégiant l'expérimentation in situ (Il est donc regrettable que des opérations du type "ECOTRON" n'aient pas été poursuivies).

Cette perspective se justifie déjà pour subvenir à l'alimentation des juvéniles que l'on ne sait pas encore produire en masse sans plancton vivant, mais l'enjeu dépasse ce cadre pour au moins deux raisons :

- L'alimentation de larves de poissons, de mollusques ou de crustacés, à partir de particules inertes, risque de se substituer rapidement au plancton vivant encore indispensable aujourd'hui.
- L'élevage intensif de poissons ou de crustacés qui s'installe de par le monde (Seriote japonaise, Loup) utilise des produits de la pêche ("faux poisson" congelé ou réduit en farine) ou de l'agriculture (Tourteau de Soja importé) et non la productivité des eaux).

Pourtant, les productions aquatiques sont exceptionnellement élevées (micro-algues 60 T/ha/an en lagunage, zooplancton (*Daphnies*) 30 T/ha/an, sur les mêmes sites, conchyliculture dans l'Etang de Thau 100 T/ha/an, 250 T/ha/an dans les rias de Galice), et il ne s'agit pas de ressources éloignées ou inaccessibles, mais des productions potentielles de zones humides ou de la frange cotière, proches de nos laboratoires.

N'y a-t-il pas là, pour l'aquaculture nouvelle, d'irremplaçables "bases biologiques" ?



## REMERCIEMENTS

L'expérimentation concernant la collecte de micro-algues a été réalisée dans le cadre d'un contrat C.E.M.A.G.R.E.F. - C.N.E.X.O.

Les études technologiques menées en mer ouverte font l'objet d'une aide à l'Innovation accordée par l'ANVAR à la suite d'un appel d'offres conjoint du Ministère de la Mer, de la Direction des Industries Agro-alimentaires et de l'Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR).

Ces études sont conduites en collaboration avec BARNABÉ-QUET R., CANTOU M., JUILLAN J.-F. et LE HUR L.

- 
- Baleux B. et Trousselier M., 1982 - Etude bactériologique, in : C.R. Activ. Scient. Lagunage de Mèze, Centre de Recherches. Rapport 1981-1982 : 59-84.
- Barnabé G., 1976 - Contribution à la connaissance de la biologie du Loup *Dicentrarchus Labrax* (L.) Poisson Serranidae. Thèse Doct. Etat mention Sciences, Univ. Sc. Techn. Languedoc, Montpellier : 426 pp.
- Barnabé G., 1977 - Dispositif de filtration et de microtamisage. Dossier ANVAR n° 14186 : 11 pp (non publié). Résumé dans le Marché de l'Innovation n° 30, p 27.
- Barnabé G., 1979 - Utilisation des chaînes alimentaires naturelles et du recyclage des eaux usées dans la production à grande échelle de juvéniles pour l'aquaculture. Actes de Colloque n° 7, CNEXO, Paris : 221-238.
- Barnabé G., 1980 - Système de collecte du zooplancton à l'aide de dispositifs autonomes et stationnaires. In : "La pisciculture en étangs", R. Billard Ed., INRA, Publ. Paris : 215-220.
- Barnabé G., 1981 - Collecte et utilisation du plancton. In : C.R. Activ. Scient. Lagunage de Mèze, Centre de Recherches. Rapport 1980-1981 : 112-132.
- Barnabé G., 1982 - Lagunage et Aquaculture. In C.R. Colloque : l'épuration par lagunage, communications scientifiques, CERETE Ed., Montpellier : 52-59.
- Barnabé G., 1983 - Pieu ancreur, in : Dossier ANVAR 50434 : 3 pp (non publié).
- Barnabé G. et René F., 1972 - Reproduction contrôlée du Loup *Dicentrarchus labrax* (L.) et production en masse d'alevins. C.R. Acad. Sc. Paris, 275, D : 2741-2744.
- Barnabé G., Cantou M., Christiani G. et Henry M., 1980 - Mise en grossissement de poissons marins en cage immergée. Rapport technique, Mare Corsu : 8 pp.
- Barnabé G. et Christiani G., 1980 - Des Loups en cage pour les Corses. Océans, 80 : 28-29.
- Barnabé G. et Périgault C., 1983 - Collecte et utilisation du phytoplancton produit dans les étangs de lagunage de Mèze : données préliminaires. C.R. Travaux GIS-ARM, Vol. 1 (sous presse).
- Barnabé G., Barnabé-Quet R., Cantou M., Juillan J.-F. et Le Hur L., 1983 - Mise en oeuvre de technologies nouvelles pour la conchyliculture en mer ouverte; Rapport d'avancement des Travaux. Contrat ANVAR A 8207039 J 030 0 : 17 pp (non publié).
- Behr W., Soeder C.J., 1981 - Commercial aspects of utilizing Microalgae with special reference to animal feeds, in : Wastewater for aquaculture. University of the O.F.S. publication, Bloemfontein. Ser. C (3) : 63-72.

- Fujita S., 1973 - Importance of zooplankton mass culture in producing fish seed for fish farming. Bull. Plankton Soc. Japan, 20 (1) : 49-53.
- Houde E.D., 1973 - Some recent advances and unsolved problems in the culture of marine fish larvae. In : Proceedings of the world mariculture Society, 1972, 3 : 83-223.
- Jannash H.W., 1979 - Chemosynthetic production of biomass : an idea from a recent oceanographic discovery. Oceanus, 22 : 59-63.
- Jannash H.W. et Wirsen C.O., 1981 - Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. Appl. Environ Microbiol., 41 (2) : 528-538.
- Kobayashi M. et Tchan Y.T., 1973 - Treatment of industrial waste solutions and production of useful by products using a photosynthetic bacterial method. Water Research, 7 : 1219-1224.
- Laubier L., 1982 - Les communautés animales associées à l'hydrothermalisme sous-marin, in : Naissance des Océans. Rev. Palais Découverte, 10 (97) : 22-39.
- Le Roux S., 1975 - Valeur comparée de diverses algues monocellulaires pour l'alimentation des larves de *Mytilus edulis* (L.) en élevages expérimentaux. Thèse 3ème cycle, Univ. Bret. Occ., Brest : 103 pp.
- Prat M., 1982 - Suivi du Phytoplancton, in : C.R. Activ. Scient. Lagunage de Mèze, Centre de Recherches. Rapport 1981-1982 : 86-122.
- Ruby E., Wirsen C.O. et Jannash H.W., 1981 - Chemolithotropic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos rift hydrothermal vents. Appl. Environ. Microbiol., 42 (2) : 317-324.
- Sandbank E. et Ehpher B., 1980 - Microalgae grown in waste-water as an ingredient in the diet of warmwater fish; in : Algae Biomass, Production and Use. G. Shelef and C.J. Soeder Ed. Elsevier, Amsterdam : 697-706.
- Soeder C.J., 1981 - Productivity of microalgal systems in : Wastewater for Aquaculture. University of the O.F.S. publication, Bloemfontein. Ser. C. (3) : 9-15.
- Venchar V., 1983 - Alimentation d'alevins de Loup *Dicentrarchus labrax* (L.) à partir de poissons ensilés. D.E.A. Biol. Physiol. Animale, Ecole Supérieure Agronomie, Toulouse : 34 pp.



SUR L'UTILISATION DES CRITERES COMPORTEMENTAUX  
POUR DETERMINER L'ETAT DE SANTE ET L'EVOLUTION PROBABLE  
DES ELEVAGES DE POISSONS MARINS.

1. CAS DES PRELARVES ET DES LARVES DE Diplodus sargus,  
Sparus aurata, Puntazzo puntazzo, Lithognathus mormyrus.

KENTOURI M. DIVANACH P.

Station de Biologie marine et lagunaire  
34200 SETE

R E S U M E

En aquaculture, et notamment en élevage larvaire ou le temps de latence entre le moment d'application d'un stress (terme générique) et l'apparition du point de non-retour est très court, les paramètres permettant de prévoir l'état de santé et l'évolution du stock sont d'une grande importance. Or, dans la chronologie des réponses aux agressions (terme générique) c'est la modification du schéma comportemental spécifique qui est l'une des premières notées et son identification précoce associée à un rétablissement des conditions adéquates n'entraîne généralement pas de séquelles physiologiques.

La connaissance éthologique étant la base de cette stratégie prévisionnelle, nous définissons dans cette étude un modèle comportemental simplifié des formes d'expressions larvaires de 4 espèces de sparidés dans une gamme de conditions compatibles avec la pratique de l'élevage. Parallèlement, nous précisons certains schémas comportementaux aberrants éventuellement corrélés avec des causes bien identifiées.

M O T S - C L E F S

Comportement; Larves de Sparidae; Diplodus sargus; Sparus aurata; Lithognathus mormyrus; Puntazzo puntazzo; Critères de santé; Prévisions d'élevage.

On the behavioral criteria to determinate health state and probable evolution of marine fish rearing ponds. 1. Prelarval and larval stages of Diplodus sargus Sparus aurata, Puntazzo puntazzo, Lithognathus mormyrus.

A B S T R A C T

In aquaculture and particularly during fish larval rearing when the time between moment of stress application and the non-return point acquisition is very limited, criteria which may provide health state and stock evolution are of great importance. Now, in stress response chronology, the specific behavioral scheme modification is first noted. This early identification, associated with initial conditions restoration, generally do not involve after effects.

Ethological knowledge being the basis of this forecasting strategy, we define in this study a simplified behavioral scheme of four sparid larval species in a range of physiological conditions. Otherwise we precise some aberrant behavioral schemes sometimes correlated with well identified causes.

K E Y - W O R D S

Behaviour; Sparid larval stages; Diplodus sargus; Sparus aurata; Lithognathus mormyrus; Puntazzo puntazzo; health criteria ; rearing previsions.



## 1 - INTRODUCTION

En aquaculture les paramètres prévisionnels de l'état de santé et de l'évolution du stock sont d'une grande importance. Chez les poissons en grossissement de nombreux critères empiriques connus de longue date lient une condition trophique ou physicochimique et une réaction comportementale (anoxie et montée en surface, maladie ou pollution et apathie, faim et excitation, etc.). Les pisciculteurs tiennent compte de ces avertissements et modifient en conséquence le cours de leurs élevages avant qu'il ne devienne irréversible. Chez les larves de poissons marins, il n'existe actuellement rien de semblable car tant le modèle éthologique normal que les points de transition entre états de bonne ou mauvaise santé sont encore inconnus. Trop souvent les modifications comportementales antérieures aux mortalités sont négligées ou mal interprétées et cette carence est d'autant plus grave que leur identification précoce correspond encore parfois à une période de réversibilité.

Au cours des 4 dernières années nous avons recherché les bases du modèle éthologique par le biais d'une étude analytique, ouverte extrêmement diversifiée s'adressant à l'ensemble des classes de taille entre l'éclosion et le stade juvénile de 4 espèces de Sparidae et assurant des conditions d'expression vastes (élevages extensifs réalisés en plein air ou dans des enceintes protégées) ou, au contraire, restreintes, sélectives et stressantes. La synthèse actuelle de l'ensemble de données permet de définir pour les larves ce modèle dans sa gamme de variabilité normale et pathologique.

La méthodologie d'approche décrite par Kentouri (1984) et Divanach (1984) est basée sur l'observation directe et indirecte du comportement des poissons en bassins et sur la comparaison de leurs réaction et de leurs performances au cours d'une centaine d'essais d'élevage détaillés dans les travaux de recherche des auteurs précités.

Lors de cette étude, les mots "agression" et "stress" sont pris dans leur sens générique de responsables de perturbation et leurs modèles d'action pharmacologiques, voisins de ceux utilisés en toxicologie humaine ont été élargis de façon à resituer le problème des élevages larvaires dans un contexte écophysiologique plus vaste.

## 2 - LE CONTEXTE DE CAUSALITE ET LES TYPES DE PERTUBATION PHYSIOLOGIQUE

L'interprétation du modèle comportemental comme base prévisionnelle de l'évolution des élevages ne peut pas être dissociée du contexte de causalité dont nous rapportons ci-après une version très simplifiée. Tout comme pour la majorité des systèmes biologiques, les modalités de réponse aux agressions (terme générique) des populations prélarvaires et larvaires de sar, daurade, marbré, charax, dépendent de plusieurs paramètres dont : le mode d'action physiologique et le temps d'exposition aux agressions (type de séquelles), les doses ou intensités de dommages encaissés, les seuils de résistance spécifique, les possibilités d'adaptation ou de récupération après convalescence.

Avec les agressions agissant par "accumulation d'effets" chaque unité de "dose active" encaissée est responsable d'un quota de destruction instantané ou différé et le mode de sensibilisation, généralement irréversible car touchant des tissus ou organes à faible taux de régénération, est fonction du nombre de quanta reçus et conduit progressivement après atteinte de différents seuils, à des perturbations comportementales puis physiologiques et enfin la mort (parfois séparée du moment d'atteinte du seuil léthal par une période de latence ou l'animal condamné, apparemment sain, développe les lésions irréversibles qui l'emporteront. Toutes les doses ayant un effet négatif, l'animal sort diminué de chaque épreuve et ne peut compenser les pertes que grâce à ses



facultés d'adaptation physiologiques ou comportementales. La fallacieuse impression d'amélioration au cours du temps après arrêt de l'agression ne résulte souvent que d'une augmentation naturelle de résistance liée à la croissance (augmentation des seuils de sensibilité avec l'âge) et d'une suppression des actions synergiques de type "accumulation de dose" que l'agression développait en parallèle sur d'autres parties du corps. A long terme, les performances biotechniques des animaux (indice de croissance et taux de conversion) sont amoindries et leur potentiel de survie plus faible en fait souvent des "morts en sursis" qui ne méritent pas d'être comptabilisés dans les productions présentes. La fréquence élevée d'animaux ne répondant pas aux normes de conformité à l'espèce augmente la fraction d'invendables lorsque l'anomalie, visible, rebute le consommateur potentiel ou au contraire le manque à gagner lorsque, sournoise et peu visible, elle est localisée au niveau de certains organes essentiels et perturbe les performances d'élevage ou sensibilise aux affections parasitaires et aux conditions de milieu proche des bornes létales (estivage ou hivernage).

Avec les agressions agissant par accumulation de doses, le mode de sensibilisation, dépend de la vitesse d'atteinte des différents seuils de modification comportementale, physiologique ou létale, eux-mêmes fonction du rapport vitesse d'encaissement des doses/vitesse de détoxification du corps, c'est-à-dire du nombre de doses reçues et des possibilités de régénération des tissus ou organes. Après arrêt de l'agression l'animal rentre en convalescence et récupère progressivement l'ensemble de ses facultés physiologiques puis comportementales si aucun seuil d'irréversibilité n'a été atteint. Dans le cas contraire (atteinte d'un seuil de destruction organique non létal) il développe des formes de compensation physiologiques ou comportementales identiques à celles du modèle précédent et pâtit souvent de la même sensibilisation aux agressions ultérieures. Entre ces deux extrêmes, il existe toute une gamme d'intermédiaires qui rendent difficile l'interprétation des modifications de l'état de santé des larves et les aspects prévisionnels qui en découlent. C'est le cas notamment des expositions simultanées à deux ou plusieurs agressions mineures agissant individuellement par "accumulation de doses" et séparément bien supportées dans la limite des seuils physiologiques (parasitisme en milieu naturel) mais dangereuses lorsque réunies (parasitisme en élevage) car l'affaiblissement de potentiel de réponse des individus leur donne alors un mode d'action par accumulation d'effets et une évolution souvent fatale ou l'action des "doses unitaires actives" est intégrée dans le temps.

En fait, comme avec la majorité des autres espèces, la définition de l'éthogramme des larves de sar, daurade, marbré, charax suppose une connaissance de deux facteurs : avec les individus en bonne santé, une prise en compte de la variabilité d'expression liée aux possibilités d'adaptation spécifiques non pathologiques (innées ou acquises) dans le milieu c'est-à-dire des précisions sur les conditions d'environnement; avec les individus en mauvaise santé, une intégration de leur histoire naturelle antérieure pour savoir s'ils ont été ou non sensibilisés et ont développé, outre les anomalies comportementales, reflet de l'état présent, des adaptations comportementales, aberrantes dans un contexte normal mais naturelles dans un contexte physiologique perturbé (nage en oblique et anomalie de vessie natatoire).

### 3 - LE SCHEMA COMPORTEMENTAL DE BASE ET LES DIFFERENTES FORMES D'EXPRESSION

Le bilan des observations et des essais en grand volume ou les animaux étaient soumis soit à des conditions de libre expression comportementale, soit à des conditions imposant une adaptation a montré que non seulement dès les premiers stades les poissons présentent la complexité de tous les organismes évolués mais encore qu'il existe une logique du système comporte-

mental ; une étho-logique en quelque sorte dont le modèle évolutif est résumé ci-après.

### 3.1 - Les prélarves

A l'éclosion, la prélarve est dotée d'un système neurosensoriel et musculaire fonctionnel. Sous des conditions adéquates elle manifeste très tôt une photosensibilité et un éveil sensoriel aux agressions mécaniques directes ou indirectes qui évolue vers des réactions d'évitement. La genèse de l'activité motrice suit un schéma assez précis dont l'évolution dans le temps dépend de la vitesse de maturation de l'animal elle-même reliée de façon hyperbolique inverse à la température du milieu. A ce stade les possibilités d'adaptation comportementales aux modifications éventuelles du milieu sont faibles et seul le critère " répartition spaciale " peut varier dans des proportions importantes. Toutefois, l'action de facteurs physiques modifiant passivement la répartition limite les conséquences prévisionnelles qui peuvent en résulter.

Au niveau des bornes physiologiques, la maturation comportementale est freinée, inhibée puis perturbée. Les réactions musculaires aux stimuli sensoriels se raréfient et la possibilité de réitération diminue. La durée du temps de repos par rapport au temps de nage augmente. D'une façon générale, les animaux présentent une régression comportementale avant de mourir et la non-évolution ou la réapparition de schémas comportementaux ayant préalablement disparu, sont suffisamment significatives pour être considérées comme prévisionnelles d'un mauvais état de santé. En mode calme, ces perturbations se traduisent par une tendance à la sédimentation et à une inhibition du réflexe de bascule et de retour dans le pelagos après contact avec le fond. Si aucun remède mécanique n'est apporté ( brassage du milieu) ce comportement est une cause directe de mortalité après attaque (ciliés, copépodes) des prélarves posées sur le fond. Tout comme il existe une notion de zéro biologique, il est possible de définir un seuil de "zéro comportemental" physiologiquement non mortel sous des conditions d'assistance technique adéquate mais létal en son absence. En élevage extensif, dans la région languedocienne, cette valeur est comprise entre 11 et 12°C de température moyenne journalière. Outre cette modification comportementale de base, certaines conditions de milieu responsables de malformations ou d'anomalies létales sont associées à des modifications de comportement typiques. C'est le cas des fortes turbulences qui causent des torsions corporelles, une érosion de la nageoire primordiale ou un décrochement du globule lipidique (qui flotte dans le vitellus) et sont visualisées par une position de repos spéciale, une nage en vrille caractéristique et des états de passivité persistants.

### 3.2 - Les larves à l'entrée dans la vie trophique

A l'entrée dans la phase hétérotrophe (2,9-4,1 mm de taille selon les espèces), les larves sont pélagiques. Elles présentent une activité de nage moyennement équilibrée et un éveil sensoriel important qui se manifeste sous forme de phototropisme intense, de rhéotropisme modéré, de réactivité instantané aux agressions directes et indirectes avec expression des comportements d'évitement orientés, d'intérêt pour les proies et, plus tard, de sélectivité alimentaire.

Dès cet instant, un apprentissage de chasse commence qui se poursuit jusqu'à 3,5-4,5 mm de taille. Son évolution est influencée par plusieurs paramètres parmi lesquels les conditions ambiantes antérieures, la qualité et l'accessibilité des proies, les conditions d'éclairement et de turbulence sont les plus importantes.



Cette période est fort délicate même dans des conditions d'élevage extensif. Au plan de l'évolution générale ultérieure les caractéristiques de réussite ou de l'échec se résument de la façon ci-après :

- Réussite
  - Préservation des réserves lipidiques → maturation comportementale (évolution constante ; réactivité élevée ; possibilités d'adaptation conséquentes)
  - Croissance rapide
  - Survie élevée
  
- Echec
  - Consommation des réserves lipidiques → aberration comportementale (transfert de l'activité de chasse, réflexes et activité de nage perturbés, comportements de parois ou de surface) → régression comportementale (reprise des positions et attitudes caractéristiques des prélarves)
  - Croissance faible ou négative
  - Mortalité chronique importante

La lumière conditionne la première prise de nourriture et, par la même le cours de l'apprentissage de chasse. Son action, essentiellement détectable lorsque les charges en proies et prédateurs sont faibles (élevages de type extensif) est la suivante :

- avec un éclairage direct, ponctuel et intense 45 à 90% (suivant la nature des planctontes existants) d'une population larvaire réussit à se nourrir le premier jour d'alimentation ;
- avec un éclairage suffisant (à partir de 50 watt/m<sup>2</sup>) et homogène, le taux d'animaux ayant mangé le premier jour oscille entre 10 et 45% du total ;
- enfin avec un éclairage diffus, un retard d'environ 2 jours est observé dans la première prise de nourriture qui semble conditionnée par un seuil d'intensité lumineuse minimale.

La température a un rôle important sur l'évolution générale mais qui peut, suivant les cas, être plus ou moins évident. A savoir que :

- dans la gamme des faibles températures constantes (< 12°C) le développement des réflexes de chasse est très lent, l'entrée dans la phase trophique perturbée et, la mortalité par inanition est massive vers le 15<sup>e</sup> jour après l'éclosion ;
- dans la gamme thermique supérieure, l'influence de la température n'est significative que si les autres conditions trophiques et celles trophiques sont adéquates.

Les turbulences et les courants affectent l'apprentissage de chasse mais leur impact dépend tout à la fois de leur intensité et du moment où ils ont été appliqués. Soit :

- les animaux qui se sont développés et ont survécu en présence des courants manifestent de très bons réflexes de chasse : au premier jour d'alimentation jusqu'à 90% d'une population peut se nourrir si les conditions trophiques le permettent ;
- chez les animaux développés en mode calme l'application de courants même faibles au moment d'entrée dans la phase trophique conduit à une perturbation momentanée du schéma alimentaire qui aboutit rarement à l'ingestion. Les raisons de ces échecs initiaux sont à rechercher dans une longue durée de positionnement avant l'attaque et de nombreuses tentatives de réajustement lorsque la proie est éloignée de la larve par les turbulences. Sous ces conditions, l'apprentissage de chasse peut durer jusqu'à deux jours pendant lesquels les poissons, sous-alimentés, présentent des comportements spéciaux de parois ;

- d'une façon générale, toute perturbation brutale de la courantométrie du bassin pendant la phase d'apprentissage conduit à des manifestations momentanées de comportements spéciaux.

L'influence des conditions trophiques sur l'apprentissage de chasse est énorme :

- une alimentation adéquate est annoncée par : une nage lente et prospective ; une croissance rapide ; une augmentation progressive du contenu stomacal moyen ; une maîtrise rapide des réflexes de chasse qui fait chuter la fréquence d'observations sans suite et de positionnements ainsi que celle d'abandons (après positionnement ou poursuite) d'échecs ou de régurgitations ;

- une alimentation inadéquate est annoncée par : une nage rapide, désordonnée et entrecoupée de périodes de repos qui évolue à court terme vers une passivité quasi totale ; des fréquences initiales d'observations, de positionnements et d'échecs élevées qui font place à un transfert de l'activité de chasse puis à un refus ultérieur de se nourrir ; des taux de réplétion stomacale hétérogènes où contrastent un fort pourcentage de vacuité avec un faible taux de sur-consommation (déformation abdominale).

### 3.3 - Les larves pendant la phase de transition

De 3,5 à 4,5 à 4,5-5,5 mm de longueur totale, les larves entrent dans la phase dite de transition. Elles ont alors une morphologie et une expérience plus développée qui leur permettent de s'adapter et de survivre dans des conditions précédemment considérées comme subléthales mais elles restent fragiles : elles maîtrisent la technique de chasse des proies rapides mais présentent encore une activité trophique perturbée en milieu fortement agité. Le comportement général ne présente pas de modifications majeures, soit :

- les conditions de répartition spatiale, les réponses aux agressions diverses, le mode de propulsion et d'orientation et le schéma trophique sont inchangés ;

- le mode de prospection s'affine grâce à une amélioration de l'exploration spatiale ;

- à partir de 4-5 mm de taille, l'activité de prospection ne peut plus être dissociée de l'activité de déplacement.

Pendant cette période, de nombreuses images ponctuelles de comportements préfigurant des formes ultérieures ou rappelant des formes antérieures et liées à des phénomènes adaptatifs momentanés sont enregistrées. Nous en retenons les cas suivants :

1. Sous certaines conditions de forte courantométrie, la larve exprime un rhéotropisme intense qui la fait cesser toute activité de prospection et l'épuise. Elle présente alors une alternance de périodes d'orientation active avec battement continu de la queue (comportement supra-normal) et de périodes de passivité en position de repos, caractéristique des prélarves (comportement régressif) ;

2. sous des densités en proies faibles ( $< 150/1$ ), la larve présente un comportement de prospection moins méticuleux que la normale et se livre à une nage ininterrompue dont les caractéristiques sont celles d'individus plus âgés. Inversement, lorsque la quantité de planctons augmente, la nage se ralentit au profit d'une prospection régulière plus attentive. La vitesse de nage peut, dorénavant, servir de critère de bonne ou mauvaise condition trophique d'un élevage.



### 3.4 - Le stade larvaire proprement dit

De 4,5-5,5 à 15,5 mm, les poissons subissent de grandes modifications morphologiques et sont de plus en plus aptes à recevoir et à traiter les informations provenant du milieu extérieur. Les principales caractéristiques de ce stade dit proprement larvaire se résument de la façon ci-après :

3.4.1. La formation progressive des organes natatoires conduit à une amélioration de nombreuses performances qui contrebalancent à moyen terme l'influence auparavant stressante ou néfaste de divers facteurs ambiants, Soit :

- la stabilité en milieu turbulent et la résistance aux courants augmentent ;
- la vitesse de nage, les trajets parcourus et le volume exploré sont de plus en plus importants ;
- la réactivité aux agressions est immédiate (nage "filée") et la facilité de capture (lors des opérations de vidange et de siphonage des bassins en particulier) diminue.

La plus grande évolution dans l'activité natatoire a lieu vers 8 mm de taille où la larve adopte le mode de progression décrit par WEIHS (1974) qu'elle conserve par la suite. Les trajectoires deviennent alors franchement rectilignes.

3.4.2. Le perfectionnement de l'activité natatoire est accompagné d'une évolution des systèmes optique et nerveux :

- la distance de perception des proies augmente de façon importante ;
- le schéma trophique évolue vers un arc réflexe permettant une discrimination rapide de la proie suivie d'une attaque immédiate ou, au contraire, d'un abandon sans positionnement préalable ;
- le réflexe de posture en S cesse d'être obligatoire ;
- le mode de prospection se simplifie et s'enrichit de formes statiques assimilables à des affûts pélagiques ;
- le territoire de chasse s'élargit vers les interfaces mais jusqu'à 10 mm, seule l'attaque à l'extrême surface est maîtrisée.

3.4.3. L'expression générale est nuancée par des nouvelles affinités et aptitudes qui sont notamment :

- l'atténuation du phototropisme au profit d'un rhéotropisme intense ;
- la genèse des premières relations intraspécifiques qui évoluent de l'interattraction (jusqu'à 12-14 mm) vers une dispersion qui est probablement annonciatrice d'un besoin physiologique d'espace vital individuel ;
- l'acquisition des comportements d'adaptation à des conditions inadéquates qui deviennent ainsi des critères prévisionnels de cas paraphysiologiques. Nous avons identifié les relations de cause à effet suivantes :

- . manque quantitatif ou inadéquation qualitative de nourriture et nage accélérée avec fréquentation des interfaces ;
- . courantométrie excessive et renforcement des relations intra-spécifiques avec fuite des zones perturbées ;
- . affaiblissement pour causes nutritionnelles et inhibition du rhéotropisme et des comportements sociaux ;
- . malnutrition prolongée et tournis (prémisse du point de non-retour)
- . début de maladie, ralentissement de l'activité de prospection et consommation sélective de proies de tailles inférieures aux optima dimensionnels ;



. état de maladie légèrement plus avancé et alternance de périodes de repos en zone calme avec des moments de suroxygénation (orientation active à contre-courant) ;

. état de maladie avancé ou de malnutrition irréversible (point de non-retour) et passivité totale.

3.4.4. Durant ce stade, l'impact de la température sur la vitesse d'évolution (croissance → expérience → perfectionnement) n'est significative que si les conditions trophiques sont adéquates.

3.4.5. En règle générale, le déroulement de ce stade dépend principalement des conditions d'alimentation et, la majorité de cas paranormaux sont le résultat d'une mauvaise gestion dans ce domaine.

L'acquisition d'un comportement trophique correct résulte de plusieurs processus complémentaires tels :

- la présence des stimuli déclencheurs par la nature des conditions trophiques existantes ;
- le renforcement des capacités potentielles d'apprentissage par la réussite des tentatives initiales des animaux encore "naïfs" ;
- l'amélioration des aptitudes physiologiques au cours de la morpho-génèse ;

Qu'il s'agisse des larves de 2,9-4,1 mm ou d'individus de taille supérieure la gamme d'expression de l'éthologie trophique est large si on se réfère au nombre de réponses adaptatives lors des diverses situations possibles mais relativement restreintes lorsque des bilans de croissance et de survie sont pris en considération à long terme. En dehors des gammes alimentaires compatibles avec leur physiologie les larves de différentes tailles présentent l'un ou l'autre des deux types de réponses suivants :

- en dessous de 6 mm, les possibilités d'adaptation sont faibles. Les individus ne changent pas de territoire de chasse. Les transferts comportementaux portent sur une accélération de la vitesse de prospection et sur l'attaque de proies ou particules à répartition pélagique qui seraient délaissées sous d'autres conditions ;

- de 6 à 15,5 mm les possibilités d'adaptation sont supérieures mais insuffisantes. Les transferts comportementaux portent sur la colonisation des interfaces mais le mode de chasse y est inadapté et, les attitudes manifestées y sont de 2 types :

a) surexcitation incontrôlée contre les interfaces ;

b) actes préfigurant des formes d'adaptation ultérieures mais qui aboutissent rarement à l'ingestion (tentatives d'aspiration du film superficiel jusqu'à 12 mm ; picorage des parois jusqu'à 15 mm ; prospection du sédiment entre 12 et 15 mm).

#### 4 - BILAN DES OBSERVATIONS

La synthèse des observations comportementales peut être résumée dans un contexte de causalité à deux types et 5 niveaux d'agressions comme défini dans l'organigramme ci-joint. D'une façon générale, lorsqu'un cheptel en bonne santé (niveau 0) c'est-à-dire caractérisé par une conformité physiologique et comportementale reçoit une agression, il passe presque toujours par un brève période de perturbation comportementale éventuellement suivie d'une perturbation physiologique plus ou moins importante.

Le premier niveau de "perturbation comportementale" (niveau 1) est caractérisé par une manifestation de réactions supranormales telles que l'apparition trop précoce de la nage filée (peur et fuite), l'augmentation de la vitesse de croisière (lorsque l'agression relève des domaines de toxicologie, de courantométrie ou d'alimentation) ou l'élargissement du territoire de chasse à des niveaux non conformes avec l'écologie des individus (lorsque l'agression conduit à une carence alimentaire de type quantitatif ou qualitatif). L'état de sensibilisation atteint à ce niveau est généralement faible et une convalescence récupérative est possible si les relations de cause à effet découvertes à temps ont été suivies d'actions curatives.

À un niveau d'agression supérieur c'est l'état physiologique lui-même qui est affecté. Les possibilités de diagnose se compliquent et ne sont pas encore toutes identifiées mais des pronostics relativement fiables peuvent quand même être fondés sur le seul fait de l'expression comportementale.

Une perturbation physiologique réversible (niveau 2) est souvent annoncée par une manifestation de comportements d'anticipation (colonisation d'interfaces chez les larves inférieures à 10 mm de taille; ingestion de particules de dimensions non conformes à la moyenne de la norme et/ou de transfert (ingestion des bulles et de scories; état agressif préfigurant du cannibalisme). L'état de sensibilisation atteint à ce niveau n'est pas encore trop grave et une convalescence récupérative est aussi possible si des dispositions curatives sont prises à temps. Dans le cas contraire, les animaux évoluent soit vers un état de mauvaise santé, soit vers un état intermédiaire de santé sensibilisée qui est le résultat exacerbé du pouvoir adaptatif physiologique et comportemental (tournis en surface ou effet de paroi et insuffisance trophique). Cette convalescence adaptative implique des soins intensifs si on persiste à vouloir sortir une production. Il entre dans cette catégorie les causes de stress provoquées par la majorité des essais d'élevage larvaire intensif actuels, notamment les densités élevées, le renouvellement d'eau insuffisant et l'inadéquation trophique qualitative et quantitative.

Une perturbation physiologique irréversible mais non létale (niveau 3) est souvent annoncée par l'élaboration de comportements de compensation (absence de vessie natatoire et répartition nectobenthique associée à une nage en oblique) ou de substitution (développement de malformations squelettiques et anomalies d'utilisation des pectorales rétablissant un fallacieux équilibre natatoire). L'état de sensibilisation atteint à ce niveau est important et le cheptel ne peut évoluer que vers un état de mauvaise santé ou de santé sensibilisée.

Enfin, à des niveaux d'agressions supérieurs les perturbations physiologiques létales à moyen terme (niveau 4) se traduisent par une acquisition progressive de comportements régressifs (augmentation de passivité, perte d'appétit, diminution des tailles des proies ingérées, sélectivité spécifique orientée vers des proies planctoniques à mouvement lent ou immobiles, sédimentation sur le fond) alors que les perturbations physiologiques létales à court terme (niveau 5) sont annoncées par des comportements à caractère généralement spasmodique parfois aberrant en préliminaires des précédents.

Un certain nombre d'exemples d'évolution prévisionnelle basés sur des relations de cause (agression) à effet (expression comportementale) sont rapportés dans la légende de l'organigramme.

## 5 - CONCLUSION

Dès les premiers stades, les sars, daurades, marbrés, charax expriment des comportements qui sont relativement spécifiques mais dont les



traits généraux communs traduisent l'unité de famille. Au cours du temps, cette expression comportementale évolue et se diversifie selon un schéma relativement précis (étho-logique de développement) qui est fonction des conditions d'environnement de l'état physiologique et de l'acquis et qui permet de déterminer l'état de santé puis l'évolution probable du cheptel. Certaines relations de causes à effets ont ainsi été identifiées entre des types "d'agressions" et des anomalies comportementales (associées ou non à des perturbations physiologiques) mais de nombreux travaux restent à faire pour relier plus précisément les concepts de "causalité directe" aux formes d'expression et aux séquelles.

Au plan appliqué, la conclusion de cette étude est que, jusqu'au niveau d'expression défini comme niveau 2 (perturbation physiologique réversible) l'étude du comportement permet tout à la fois de prévoir l'évolution d'un élevage, d'estimer l'importance des soins qu'il faut lui attribuer et, éventuellement de rattrapper une fausse démarche. Par contre, à partir du niveau 3 (perturbation physiologique irréversible létale ou non) où le cheptel est irrémédiablement touché dans son intégrité qualitative ou quantitative et où l'estimation des soins curatifs n'a aucun intérêt, les possibilités de prévision ne peuvent servir que dans une optique de gestion rationnelle du volume d'élevage par sacrifice éventuel et précoce des stocks condamnés ou non conformes.

---

DIVANACH P., 1984 - Contributions à la connaissance de la biologie et de l'élevage de 6 sparidés méditerranéens : *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo*.  
Thèse doctorat ès-science en préparation.

KENTOURI M., 1984 - Contribution à la connaissance de l'éthologie des jeunes stades de *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Lothognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (Pisces sparidae) en élevage.  
Thèse doctorat ès-science en préparation.

WEIHS D., 1974 - Energetic advantages of burst swimming of fish.  
J. Theor. Biol. 48, 215-229.



LEGENDE : CAS TYPIQUES IDENTIFIES DE :

1 - CONVALESCENCE RECUPERATIVE A PARTIR DU NIVEAU D'AGRESSION 1A :

- Larves de toutes tailles victimes momentanément d'une courantométrie excessive (activité natatoire supranormale responsable d'une baisse de l'activité de chasse).
- Larves de toutes tailles soumises momentanément à une inadéquation qualitative ou quantitative de la nourriture (activité natatoire supranormale; attaque sporadique de proies non conformes).

2 - CONVALESCENCE RECUPERATIVE A PARTIR DU NIVEAU D'AGRESSION 2A :

- Larves de toutes tailles soumises pendant quelques jours à des conditions de malnutrition responsables d'un amaigrissement momentané et qui développent des comportements d'anticipation (effet de parois et de surface chez des larves encore pélagiques inférieures à 10 mm; début de prospection et de chasse au niveau benthique chez les individus non encore métamorphosés de 10 à 15 mm) ou de transfert (ingestion de bulles, de scories de grains de pollen, et plus généralement de particules inertes; expression de comportements d'agressivité préfigurant des "intentions" cannibales).

3 - CONVALESCENCE ADAPTATIVE A PARTIR DES NIVEAUX D'AGRESSION 2A OU 2B :

- Larves de toutes tailles et alimentation non conforme avec les besoins métaboliques responsables d'un amaigrissement et d'une sensibilisation.

4 - CONVALESCENCE ADAPTATIVE A PARTIR DES NIVEAUX D'AGRESSION 3A OU 3B :

- Larves à l'entrée dans la phase trophique et insuffisance prolongée en lumière conduisant à un retard dans l'apprentissage de chasse responsable d'une résorption précoce des réserves lipidiques et d'une sensibilisation ultérieure.
- Larves à l'entrée dans la vie trophique et inadéquation alimentaire (qualitative ou quantitative) responsable d'une résorption précoce des réserves lipidiques et d'un affaiblissement ultérieur.
- Larves à l'entrée dans la vie trophique ne présentant pas une inflation de la vessie natatoire et développant ultérieurement des anomalies squelettiques (lordoses, etc...) une utilisation des pectorales anormale et un comportement de nage en oblique caractéristique, qui compense la flottabilité négative.
- Larves atteintes de calculoses (vessie urinaire), de lésions intestinales, hépatiques et autres (causes inconnues) responsables d'un état de sensibilisation permanent.

5 - ETAT DE MAUVAISE SANTE - RISQUES DE MORTALITES A PARTIR DES NIVEAUX D'AGRESSION 2 OU 3, A OU B :

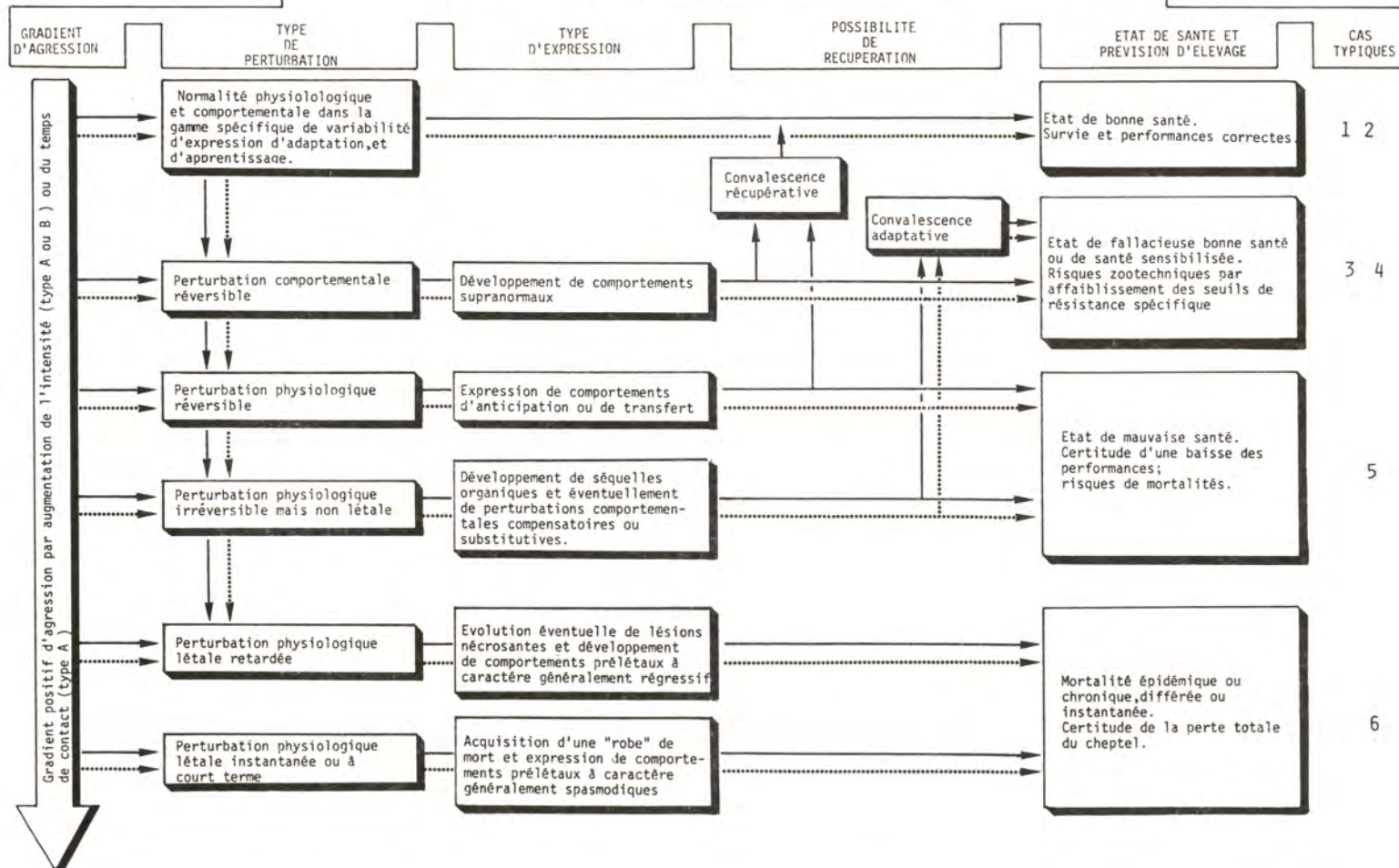
- Individus appartenant aux catégories 3 et 4 précédentes dès que les conditions de convalescence disparaissent.
- Prélarves "incubées" sous des conditions de brassage trop élevé présentant un globule lipidique libre dans le sac vitellin et un comportement spécial.
- Prélarves "incubées" sous des conditions thermiques inférieures à 12°C, présentant un retard dans l'évolution de l'éveil sensoriel et des activités motrice et trophique.
- Larves de toutes tailles en présence de certaines toxiques aux doses et temps de contact correspondant aux modes d'action.

6 - MORTALITE CERTAINE A PARTIR DES NIVEAUX 5 OU 6, A OU B :

- Prélarves ou larves soumises à des conditions supérieures aux limites physiologiques.
- Larves et certaines formes de parasitisme (copépodose).

ORGANIGRAMME SIMPLIFIE DE REPONSE AUX AGRESSIONS CHEZ LES LARVES DE SPARIDES EN ELEVAGE

A ou .....:Agression agissant par sommation d'effets  
 B ou —:Agression agissant par sommation de doses



Imprimé par INSTAPRINT  
264-268, rue d'Entraigues - 37059 TOURS - Tél. (47) 38.16.04

Dépôt légal : 2ème trimestre 1985



## ACTES DE COLLOQUES

1	1974	L'AQUACULTURE	BREST, 22-24 octobre 1973	472 p.	200 F
2	1974	OCÉANOGRAPHIE PHYSIQUE DE LA MER ROUGE	PARIS, 9-10 octobre 1972	313 p.	200 F
4	1977	TROISIEME RÉUNION DU C.I.E.M. «MARICULTURE»	BREST, 10-13 mai 1977	305 p.	250 F
5	1978	UTILISATION POUR L'OCÉANOLOGIE DES SATELLITES D'OBSERVATION DE LA TERRE Journées Nationales d'Études	BREST, 6-8 février 1978 - CNES - CNEOX	422 p.	290 F
7	1979	ECOTRON - Mécanisme et contrôle de la production biologique marine. Systèmes clos artificiels, écosystèmes littoraux	BREST, 3-6 juillet 1978	778 p.	320 F
8	1979	LE THON ROUGE EN MÉDITERRANÉE, biologie, pêche, aquaculture	SETE, 9-12 mai 1979	200 p.	100 F
9	1979	LES COTES ATLANTIQUES DE L'EUROPE (U.G.I.)	BREST, 15-16 mai 1979	303 p.	150 F
10	1980	PRODUCTION PRIMAIRE ET SECONDAIRE	MARSEILLE, 9-12 janvier 1979	202 p.	110 F
11	1981	TENUE DES OUVRAGES EN BÉTON A LA MER (ARBEM)	BREST, 8-10 octobre 1980	pages mult.	300 F
12	1981	AQUACULTURE EXTENSIVE ET REPEULEMENT	BREST, 29-31 mai 1979	198 p.	120 F
13	1982	DEUXIEME COLLOQUE DE MICROBIOLOGIE MARINE	MARSEILLE, juin 1971	181 p.	50 F
14	1982	INDICES BIOCHIMIQUES ET MILIEUX MARINS. Journées du GABIM	BREST, 18-20 novembre 1982	434 p.	90 F
15	1983	TENUE DES OUVRAGES EN BÉTON EN MER (ARBEMISE)	PARIS, octobre 1982	557 p.	220 F

*Service de la Documentation  
et des Publications (S D P)*

### IFREMER - Centre de Brest

B.P. 337 - 39273 BREST CEDEX  
Tél. (98) 45.80.55 - Télex 940 627 F



Siège social : 66 avenue d'Iéna - 75116  
Tél. 723.55.28 - Télex 610 775

ISSN : 0761-3962

PRIX : 150 F TTC