



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Le cadmium et les Ca⁺⁺ ATPases dans la smoltification du saumon atlantique *Salmo salar* L

Devos, Emmanuel

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

**Le cadmium et les Ca^{++} ATPases dans la
smoltification
du saumon atlantique *Salmo salar* L.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

DEVOS EMMANUEL
Septembre 1991

Je remercie le Professeur P. Devos de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

A Gérard Trausch, co-promoteur de ce mémoire, pour ses judicieux conseils, ses encouragements et son aide inlassable tout au long de l'année, j'adresse mes sincères remerciements.

J'exprime aussi ma reconnaissance à l'ensemble des membres de l'Unité de Biologie Animale pour leur présence et leurs encouragements toujours renouvelés.

Je tiens également à remercier Alain Gillet pour son aide tout au long de ce travail.

Enfin que maman, mes soeurs trouvent ici l'expression sincère de ma reconnaissance pour le soutien et les encouragements qu'ils m'ont manifestés pendant ces années universitaires.

Merci à Monsieur M. Bracke.

Merci à France.

Le cadmium et les Ca^{++} ATPases dans la smoltification du saumon atlantique *Salmo salar* L.

DEVOS Emmanuel

Résumé

Notre travail met en évidence qu'il est possible de simuler en laboratoire la smoltification, ensemble de modifications physiologiques et comportementales se déroulant chaque année au printemps chez le saumon atlantique *Salmo salar* L. .

L'évolution de deux indicateurs de smoltification permettent d'affirmer que les saumons atlantiques ont smoltifié. Entre le 11 mars et le 21 mai 1991, le coefficient de condition a diminué jusqu'à une valeur inférieure à 0,9 et l'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale a augmenté.

Nous avons constaté que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité évolue de la même façon que l'activité de la Na^+/K^+ ATPase. Nous pensons que, comme l'augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase prépare le saumon atlantique à affronter les fortes concentrations marines en sodium, l'augmentation de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pourrait préparer le saumon atlantique aux concentrations marines élevées en calcium.

Nos résultats indiquent que le $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a un effet inhibiteur sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au niveau de plusieurs organes dont les branchies.

De plus, nous constatons que la prise de calcium en l'absence de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ est plus importante dans les filaments branchiaux que dans tous les autres autres organes prélevés. Nos résultats indiquent également que l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au niveau des organes prélevés n'est pas différente entre les saumons smolts et non-smolts.

Nous n'avons pas pu observer que le $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ influence de façon différente l'inhibition des flux calciques branchiaux chez les saumons atlantiques smolts et non-smolts.

Nos résultats suggèrent que cet effet peut être lié à l'effet inhibiteur du $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ sur l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Septembre 1991

Promoteur : P. DEVOS

Co-Promoteur : G. TRAUSCH

Liste d'abréviations usuelles.

%	:	pourcent
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADP	:	adénosine 5' diphosphate
ATP	:	adénosine 5' triphosphate.
cm	:	centimètre
CPM	:	coups par minute
EGTA	:	éthylène glycol-bis-(amino éthyl éther) N-N-N'-N' acide tétra acétique
F.W.	:	fresh water - eau douce.
g	:	gramme
kg	:	kilogramme
Km	:	constante de Michaelis-Menten
l	:	litre
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mM	:	millimolaire
N	:	normal
nM	:	nanomolaire
nm	:	nanomètre
Pi	:	phosphate inorganique
RPM	:	tours par minute
SW	:	sea water - eau de mer
T3	:	tri-iodo-thyronine
T4	:	tétra-iodo-thyronine ou thyroxine
Tris	:	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane.
°C	:	degré Celcius
μci	:	microcurie
μg	:	microgramme
μl	:	microlitre
μM	:	micromolaire

TABLE DES MATIERES

<u>CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	p. 1
1: ECOPHYSIOLOGIE DE LA SMOLTIFICATION	p. 1
A. BIOLOGIE DU SAUMON ATLANTIQUE.	p. 1
1. Position systématique.	p. 1
2. Répartition géographique.	p. 1
3. Cycle biologique.	p. 2
B. LA SMOLTIFICATION .	p. 4
1. Définition.	p. 4
2. Base physiologique de la smoltification.	p. 5
a. Modifications morphologiques.	p. 5
b. Changements physiologiques et biochimiques.	p. 6
3. Contrôle hormonal de la smoltification.	p. 8
a. Les hormones thyroïdiennes.	p. 9
b. Hormone de croissance et prolactine.	p. 10
c. Les corticostéroïdes.	p. 11
4. Facteurs influençant la smoltification.	p. 12
a. L'effet de la taille.	p. 12
b. Effet de la photopériode.	p. 13
c. Effet de la température.	p. 15
d. Autres paramètres.	p. 16
C. Osmorégulation et smoltification.	p. 17
1. Osmorégulation générale.	p. 17
a. Pression osmotique et milieu.	p. 17
b. Les organes osmorégulateurs.	p. 18
2. Osmorégulation branchiale.	p. 19
a. Description de la branchie.	p. 20
b. Transport ionique.	p. 21
c. les ionocytes (cellules à chlorure) et leur système Na ⁺ /K ⁺ ATPasique.	p. 23

2 : LES CA ⁺⁺ ATPASES.	p. 28
A. L'importance de l'ion calcium dans la cellule.	p. 28
1. Le signal calcium.	p. 28
2. Le calcium comme messenger secondaire.	p. 30
3. L'interaction calcium/calmoduline.	p. 31
B. Le transport du calcium et les Ca ⁺⁺ ATPases.	p. 32
C. Le contrôle hormonal sur le transport du calcium.	p. 37
D. Le calcium et le cadmium.	p. 39

CHAPITRE 2 : ORIENTATION DU TRAVAIL. p. 43

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES p. 45

1. MATERIEL BIOLOGIQUE.	p. 45
A. Elevage.	p. 45
B. Prélèvement des organes.	p. 46
1. Prélèvement des filaments branchiaux.	p. 46
2. Prélèvement du sang.	p. 46
3. Prélèvement du foie.	p. 46
4. Prélèvement des reins.	p. 47
2. LES DOSAGES .	p. 47
A. Homogénéisation des filaments branchiaux.	p. 47
B. Dosage des protéines.	p. 47
1. Le principe.	p. 47
2. Les solutions.	p. 48
3. Le mode opératoire.	p. 48

C. Dosage des phosphatases dépendantes du Ca^{++} .	p. 49
1. Le principe.	p. 49
2. Les solutions.	p. 50
3. Mode opératoire.	p. 50
D. Dosage de la Na^+/K^+ ATPase et de la Mg^{++} ATPase .	p. 51
1. Le principe.	p. 51
2. Les solutions.	p. 52
3. Le mode opératoire.	p. 53
E. L'analyse statistique des résultats .	p. 54
3. LA PRISE DU CALCIUM .	p. 55
1. Le principe.	p. 55
2. Les solutions.	p. 55
3. Le mode opératoire.	p. 55
4. L'analyse statistique des résultats.	p. 56
<u>CHAPITRE 4 : RESULTATS.</u>	p. 58
1. MISE EN EVIDENCE DE LA SMOLTIFICATION CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE.	p. 58
A. Elevage et smoltification.	p. 58
B. Na^+/K^+ ATPase et smoltification.	p. 62
C. Ca^{++} ATPases et smoltification.	p. 64
D. Evolution de l'activité de la Mg^{++} ATPase.	p. 67
2. INFLUENCE DU CADMIUM SUR LA PRISE DE CALCIUM CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE SMOLT ET NON SMOLT.	p. 68

3. INFLUENCE DU CADMIUM SUR L'ACTIVITE
DES Ca⁺⁺ATPases.

p. 73

**CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS GENERALES
ET PERSPECTIVES.**

p. 75

CHAPITRE 6 : BIBLIOGRAPHIE.

p. 81

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1: ECOPHYSIOLOGIE DE LA SMOLTIFICATION

A. BIOLOGIE DU SAUMON ATLANTIQUE.

1. Position systématique.

Le saumon atlantique (*Salmo salar* L.) fait partie de la classe des téléostéens, superordre des Protacanthopterygii, famille des Salmonidae. Cette famille comprend outre le genre *Salmo* (saumons et truites atlantiques) plusieurs autres genres : *Thymallus* (ombres), *Salvelinus* (ombles), *Coregonus* (corégones), *Oncorhynchus* (saumons et truites pacifiques).

Le saumon atlantique est un migrateur actif qui se reproduit en eau douce et l'essentiel de sa phase de croissance se déroule en eau de mer : c'est donc une espèce euryhaline capable de supporter des milieux de salinité variée.

2. Répartition géographique.

La répartition géographique du saumon atlantique s'étend sur les régions tempérées et arctiques de l'Hémisphère Nord des deux côtés de l'océan Atlantique. En Amérique du nord, sa distribution est limitée au sud par la rivière Connecticut et le Labrador. Au nord, elle s'étend jusqu'à la baie d'Ungaver (Québec) et la partie sud du Groënland. En Europe, il s'étend de la Mer Blanche et de l'Islande au nord, passe par la Mer du Nord et la Baltique jusqu'à la rivière Reino (Portugal) au sud.

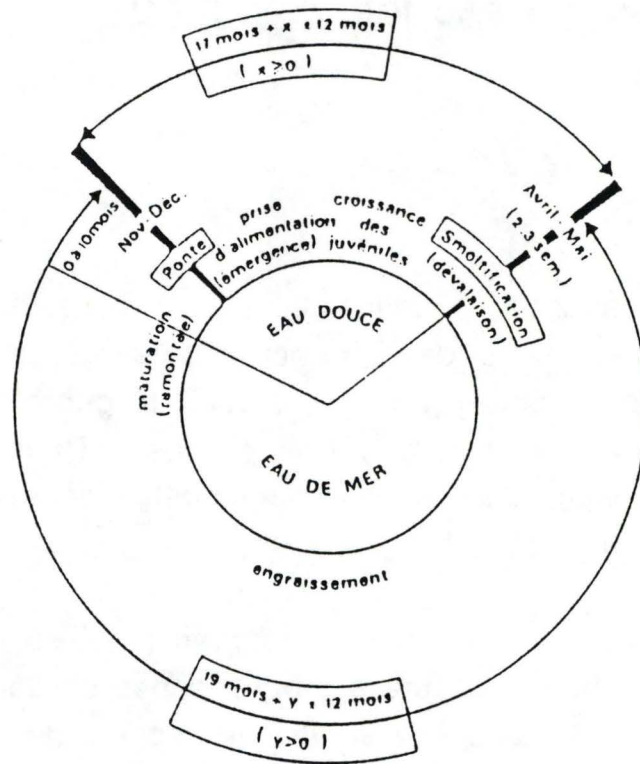


Figure 1 : Cycle biologique du saumon atlantique (Gaignon, 1988).

3. Cycle biologique.

Le saumon atlantique (*Salmo salar*) est un poisson de mer effectuant sa reproduction en eau douce. Le cycle biologique du saumon se caractérise par deux phases : une phase de croissance en mer, une phase de reproduction et de croissance juvénile dans les cours d'eau froids, rapides et bien oxygénés.

En rivière, les oeufs fécondés, d'une taille de 5 à 7 mm, sont enfouis dans les gravières dont la granulométrie est telle qu'elle permet le passage d'un flux d'eau suffisant pour assurer une bonne oxygénation. L'éclosion s'effectue deux à quatre mois après la ponte selon la latitude. Après éclosion, les alevins vivent sur leurs réserves vitellines au sein des gravières. Ils n'en sortent qu'en fin de résorption c'est-à-dire 4 à 5 semaines plus tard. Ils commencent alors à se nourrir de larves d'insectes, principalement de diptères. Les risques de prédation à ce stade étant élevés, la mortalité est très importante (90-99%).

La croissance est fonction de nombreux facteurs tels que la température, la quantité de nourriture disponible, les facteurs physico-chimiques et le débit, par exemple. Elle aboutit rapidement à une grande disparité de tailles parmi les tacons ou "parrs" (nom que l'on donne aux jeunes saumons en eau douce).

Dès qu'ils ont atteint une taille suffisante (12 à 15 cm), soit après 1 à 4 ans suivant la température et la croissance, ils subissent au printemps une transformation morphologique et physiologique appelée SMOLTIFICATION.

Un certain nombre de tacons ne smoltifient pas mais acquièrent une maturation sexuelle telle qu'ils participent alors à la reproduction des géniteurs anadromes. Les smolts ou saumoneaux (tacons transformés) vont alors dévaler les rivières en direction des estuaires où ils se familiarisent avec l'eau salée. De l'estuaire, les jeunes saumons gagnent en haute mer les zones d'engraissement (Groënland, Feroes).

La durée du séjour avant le premier retour en eau douce dure quelques mois (pour les petits saumons de 1 à 2 kg appelés castillo), à 2-3 ans (pour les vrais saumons de 4 à 20 kg).

La migration du retour a pour finalité la reproduction en eau douce. La quasi-totalité des saumons reviennent dans les rivières d'origine : c'est le phénomène du "homing".

Trois hypothèses sont émises pour expliquer ce phénomène : la première présentée par Hasler (1951), propose que l'orientation des saumons repose sur la mémorisation de l'empreinte odorante de la rivière dans laquelle ils sont nés. Cette empreinte est alors constituée de "l'odeur" du sol, de la végétation etc... propre à la rivière. La deuxième hypothèse émise par Harden et Jones (1969), propose une "mémorisation" séquentielle de l'empreinte olfactive de la rivière par les saumons lors de la dévalaison au printemps. Les saumons pourraient mémoriser ces différentes empreintes à toutes les confluences et les retracer lors du chemin de retour (Quinn, 1990). La dernière hypothèse se base également sur l'odorat mais l'odeur reconnue lors de la remontée est ici du type phéromonal. Les saumons qui remontent seraient attirés et guidés par la libération de phéromones des tacons ou des smolts qui dévalent les rivières (Nordeng, 1971).

Au cours de leur migration de reproduction, les saumons ne se nourrissent pas ; ils perdent ainsi continuellement du poids au profit du développement de leurs organes sexuels. La ponte s'effectue en novembre et en décembre.

Bien que le genre saumon atlantique puisse se reproduire plusieurs fois, la mortalité des géniteurs surtout mâles est malgré tout importante, au contraire du genre saumon pacifique (*Oncorhynchus*) qui meurt irrémédiablement après l'accouplement. Les survivants redescendent vers la mer, se nourrissent et effectuent une ou plusieurs migrations de reproduction vers l'eau douce (Mills, 1986).

B. LA SMOLTIFICATION .

1. Définition.

Le saumon atlantique doit subir une adaptation pour passer de la rivière à l'eau de mer. Cette adaptation s'appelle la smoltification.

La smoltification est un ensemble de profondes modifications que subit le jeune saumon sur les plans anatomique, morphologique, physiologique et biochimique qui fait que le parr se préadapte à sa future vie en mer. Dans la nature, cette phase transitoire qui dure plusieurs semaines aboutit à la migration active vers la mer. C'est le déséquilibre physiologique du smolt qui conditionne son comportement migratoire. Les tacons qui ne sont pas parvenus à ce déséquilibre physiologique, resteront en eau douce. Ils pourront se transformer en smolt une ou plusieurs saisons plus tard (Boeuf, 1987).

Le phénomène de la smoltification est régulé par un ensemble de paramètres externes et internes. Aux nombres des facteurs externes, on compte la température, la photopériode et la taille du saumon. Pour les paramètres internes, il s'agit surtout d'interactions hormonales qui déclenchent la smoltification.

Pour permettre cette migration, le tacon doit changer son comportement.

Les saumons en eau douce ont un comportement territorial marqué ; ils vont le perdre pour une tendance grégaire en fin de smoltification (Mills, 1989). L'activité augmente, l'appétit est stimulé et l'animal s'agite constamment. Ils deviennent semipélagiques, c'est-à-dire qu'ils préfèrent vivre dans les eaux de profondeur moyenne grâce notamment au gonflement de leur vessie natatoire.

2. Base physiologique de la smoltification.

a. Modifications morphologiques.

Les principales modifications morphologiques observées lors de la smoltification touchent essentiellement la peau du saumon, celle-ci ayant une importance fondamentale dans l'osmorégulation.

La première modification de la peau est son changement de texture.

En eau douce, milieu hypoosmotique, elle est très épaisse et riche en mucus ce qui empêche ainsi les entrées d'eau trop importantes.

En eau de mer, milieu hyperosmotique, le saumon perd son mucus et les écailles s'individualisent fortement évitant ainsi les fuites d'eau.

Au cours de la smoltification, le tacon acquiert une coloration argentée ; celle-ci va de pair avec le poids du tacon. Cette observation faite par Virtanen en 1987, indique que les parrs les plus gros s'argentent très tôt dans le processus de smoltification.

Cette livrée argentée apparaît au niveau du derme de *Oncorhynchus kisutch* grâce principalement à deux purines : la guanine et l'hypoxanthine (Market et Vanstone, 1966). Leurs présences résultent d'un changement dans le métabolisme des purines (Hoar, 1988).

En fait, les purines se déposent dans deux couches bien distinctes de la peau. La première couche est directement en dessous des écailles et la deuxième est au niveau du derme adjacent aux muscles.

Enfin, cette livrée argentée provoque l'acquisition d'une couleur de camouflage propre aux poissons pélagiques marins.

D'autres changements sont caractéristiques de la smoltification chez le saumon *Salmo salar*. Par exemple,

- Les nageoires caudales et pectorales développent en particulier une marge noire distincte (Wedemeyer *et al.*, 1980).

- Le coefficient de condition diminue. Ce coefficient représente le rapport du poids par unité de longueur au cube ($100 \times \text{poids en gramme} / \text{longueur au cube exprimé en centimètre}$). Durant la smoltification, le tacon s'aminçit considérablement : le coefficient de condition des parrs passe d'une valeur supérieure à 1 à une valeur inférieure à 0,9. Cette diminution correspond à une forte utilisation des réserves lipidiques et protéiques (Gaignon, 1988 ; Hoar, 1988).

b. Changements physiologiques et biochimiques.

Les changements observés lors de la smoltification sont très nombreux. Ils visent tous à augmenter le taux de croissance. Ainsi , Baraduc et Fontaine (1955) constatent une augmentation de 30% de la consommation d'oxygène chez *Salmo salar* en cours de smoltification.

Une étude fort complète de Virtanen (1987) montre chez *salmo salar* différentes corrélations entre le métabolisme, la balance ionique et les indices externes de smoltification.

On constate par exemple que le taux de glycogène dans le foie diminue au cours de la smoltification ce qui indique que la demande d'énergie est supérieure à l'énergie ingérée par la nourriture.

De plus, la diminution du glycogène hépatique est inversement proportionnelle à la mise en place de la livrée argentée.

Ce même auteur observe que l'élévation du glucose sanguin est corrélée avec la diminution du glycogène hépatique tout au long de l'année sauf au début de la smoltification. A cette période, la glycémie décroît, elle est alors associée à un coefficient de condition faible et à une hypochlorémie.

L'absence de corrélation au début de la smoltification entre le glucose sanguin et le glycogène hépatique peut être expliquée par deux phénomènes. D'abord, il existe une relation importante entre la température de l'eau et le glucose sanguin : une élévation de la température fait décroître la glucose dans le sang.

La smoltification se passe au printemps en période d'élévation de la température, celle-ci peut donc cacher les effets de la smoltification.

Autre explication, c'est d'observer la corrélation négative entre la concentration faible en protéines plasmiques et la concentration élevée en glucose. Une partie de ces protéines et acides aminés seraient probablement utilisés pour la néoglucogénèse (Virtanen, 1987).

Enfin, il constate également une diminution de la concentration plasmique en ions Cl^- et Na^+ au tout début de la smoltification. Il remarque également une diminution de la concentration en ions Ca^{++} et Mg^{++} plasmique mais qui n'est pas simultanée avec la diminution des concentrations de Cl^- et Na^+ .

Cette modification des concentrations plasmiques de Cl^- et de Na^+ est liée au développement de la capacité d'hypoosmorégulation nécessaire à la future vie marine du saumon atlantique.

Ce mécanisme interne permet en effet au saumon d'excréter des sels dans un environnement marin hyperosmotique, maintenant ainsi la concentration en électrolytes plasmiques à environ un tiers de la concentration de l'eau de mer.

La corrélation entre une faible concentration en Cl^- plasmique, un coefficient de condition bas et une élévation en glucose sanguin au début du printemps, sans qu'il y ait livrée argentée, indique que les modifications osmotiques sont associées aux premières étapes de la smoltification.

D'autres paramètres biochimiques évoluent : la teneur en lipides corporels totaux se modifie non seulement quantitativement (diminution des lipides) mais également qualitativement (Hoar, 1988).

Les travaux menés par Sheridan (1985) montrent que les smolts de *Salmo gairdneri* possèdent une grande quantité de longues chaînes d'acides gras polyinsaturés et une faible quantité d'acide linoléique. Ces changements de la teneur en lipides dans les tissus sont probablement une adaptation significative à un habitat marin. Ils interviennent dans le contrôle de la perméabilité membranaire (Hoar, 1988).

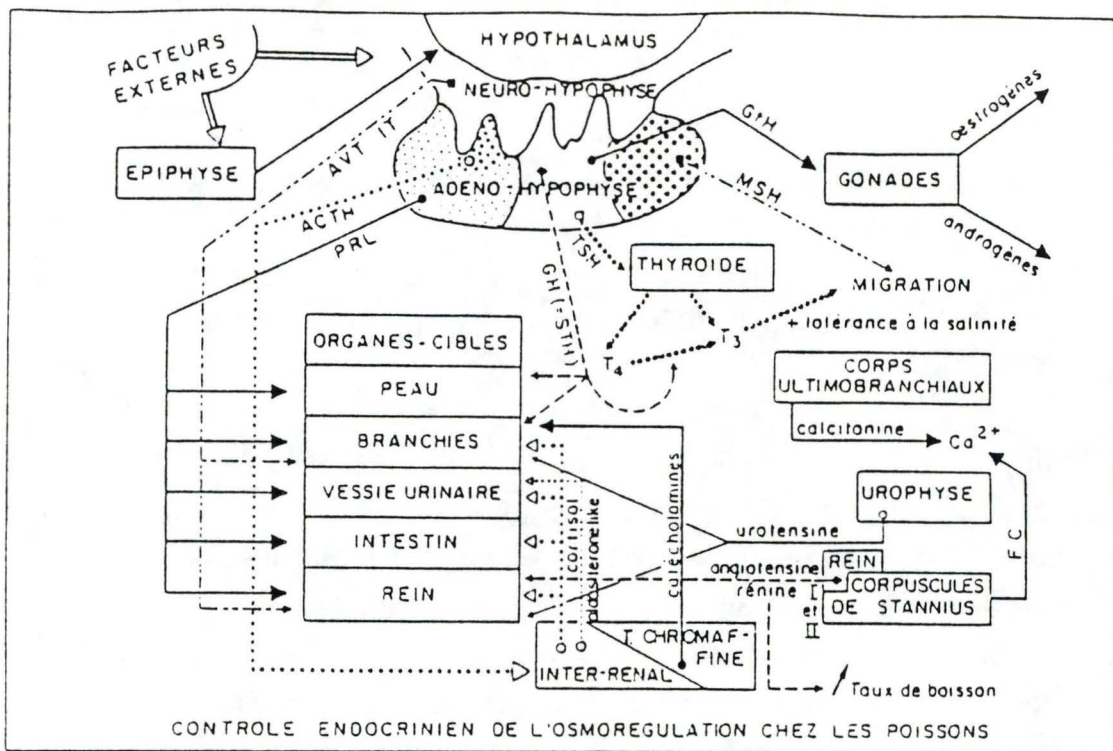


Figure 2 : Contrôle endocrinien de l'osmorégulation chez les poissons (Boeuf, 1987).

AVT : arginine vaso-locine IT : isotocine ACTH : hormone corticotrope
 PRL : prolactine GH : hormone gonadotrope TSH : hormone thyro-stimulant
 MSH : hormone stimulante de la mélatonine GH : hormone de croissance hypophysaire

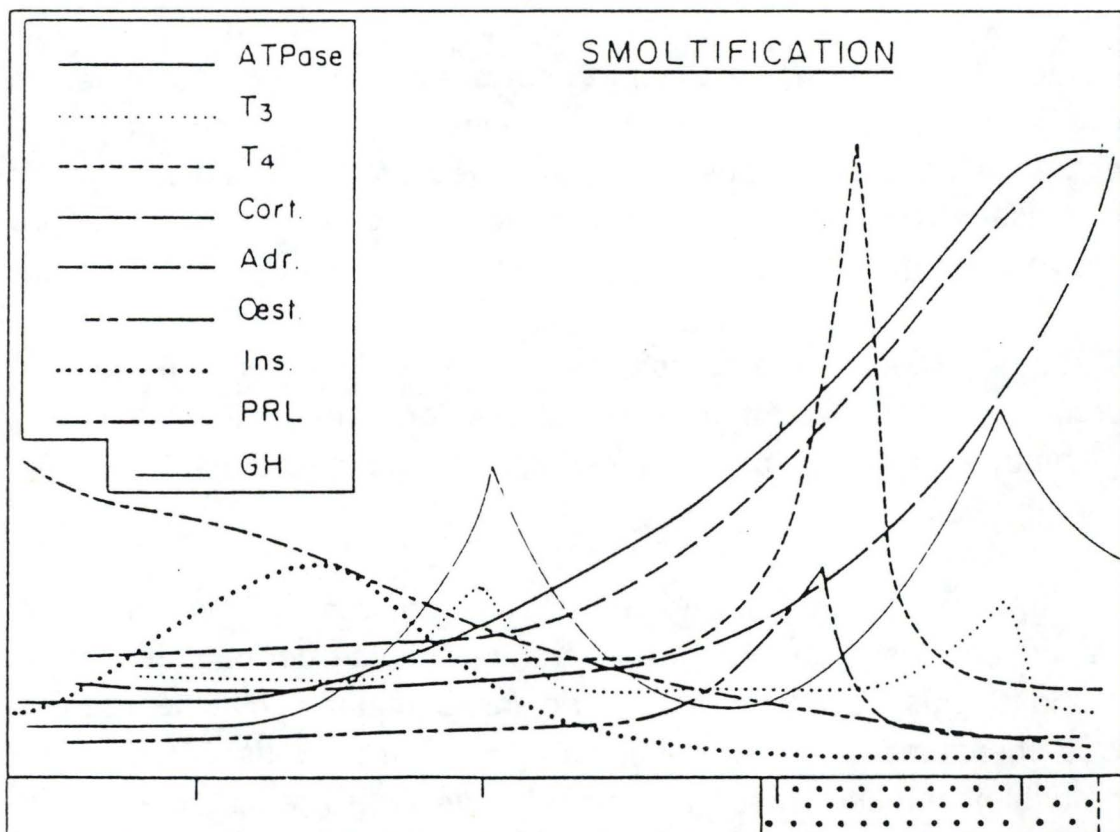


Figure 3 : Schéma théorique des connaissances actuelles sur l'évolution des hormones circulantes en cours de smoltification (Boeuf, 1987).

ATPase : activité Na^+/K^+ ATPasique branchiale (système enzymatique pris en référence) T3 : tri-iodo thyronine T4 : thyroxine Cort. : cortisol
 Adr. : adrénaline oest. : œstradiol Ins. : insuline PRL : prolactine
 GH : hormone de croissance hypophysaire

Enfin, il y a une modification importante du système enzymatique régulant la balance ionique. Le meilleur exemple est la modification de l'activité branchiale de la Na⁺/K⁺ ATPase au cours de la smoltification.

Ce furent Zaugg et Mc Lain (1970) qui, les premiers, montrèrent ce changement de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase. D'autres enzymes présentent une modification de leur activité.

Langdom et Thorpe (1985) montrent, par exemple, que l'activité de la succinate déshydrogénase branchiale augmente au cours de la smoltification de *Salmo salar*.

3. Contrôle hormonal de la smoltification.

Les hormones jouent un rôle primordial lors de la smoltification. Elles régulent, avec les paramètres extérieurs, le déclenchement et la bonne marche de celle-ci. Leurs actions complexes et multiples commencent seulement à être comprises (figure 2 et 3).

En condition naturelle, ce sont les paramètres extérieurs (température, photopériode, cycle lunaire) qui influent sur le système hormonal pour déclencher la smoltification. Sous condition d'obscurité totale et de température constante par exemple, le phénomène de smoltification apparaît de façon endogène (Wagner, 1974).

C'est l'ensemble du système hormonal qui agit lors de la transformation parr-smolt.

Dans ce paragraphe, je traiterai des principales hormones responsables de ce phénomène. Elles sont au nombre de quatre : les hormones thyroïdiennes, l'hormone de croissance, la prolactine et les corticostéroïdes.

a. Les hormones thyroïdiennes.

Le premier à montrer une modification de l'activité de la thyroïde lors de la smoltification du saumon atlantique fut Hoar en 1939.

Les deux hormones, sécrétées par la thyroïde, qui interviennent au niveau de la transformation parr-smolt, sont la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3). Elles agissent sur différentes fonctions et organes tels que : la croissance, la pigmentation de la peau, l'osmorégulation, le comportement et les branchies.

On pensa d'abord que c'était l'hormone de la smoltification mais après expériences de stimulation sur des poissons hors période de smoltification, on remarqua que les poissons ainsi stimulés ne présentaient que quelques aspects de la transformation parr-smolt (Milne et Leatherland, 1978).

Les hormones thyroïdiennes agissent sur la croissance et cela de concert avec l'hormone de croissance. L'impact général sur la croissance se fait par l'action sur différents métabolismes.

Au point de vue des lipides, on observe que l'action des hormones thyroïdiennes induit chez *Oncorhynchus kisutch* une mobilisation des réserves due à une augmentation de l'activité des lipases. La synthèse de protéines est également stimulée par la thyroïde (Gorbman, 1969).

Les hormones thyroïdiennes sont responsables du dépôt de purine et d'hypoxanthine dans le derme lors de la smoltification ; pour rappel, ce dépôt provoque l'apparition de la livrée argentée (Robertson, 1949).

Enfin, les avis sont partagés sur l'influence thyroïdienne dans l'adaptation du saumon atlantique à l'eau de mer. On a bien constaté une augmentation de la T4 précédant de peu un accroissement de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase (Boeuf *et al*, 1987) mais sans pouvoir prouver une relation de cause à effet.

b. Hormone de croissance et prolactine.

Toutes deux produites par l'hypophyse, l'hormone de croissance et la prolactine jouent différents rôles lors de la smoltification.

L'hormone de croissance est responsable comme son nom l'indique de la croissance. Dès 1959, Chartier-Baraduc a montré qu'un régime de 15 µg d'hormone de croissance par gramme de poisson et par semaine augmente significativement le poids de *Salmo gairdneri*.

L'hormone de croissance agit sur le métabolisme des protéines en stimulant l'anabolisme protéique et en diminuant le taux sanguin de protéines (McKeown, 1984).

L'hormone de croissance agit également sur le taux de glucose sanguin. Ainsi, on a constaté une corrélation entre un taux d'hormone de croissance élevé et un taux de glucose sanguin important (McKeown, 1984). On ne sait pas cependant comment l'hormone de croissance provoque chez les poissons une hyperglycémie.

En dehors de l'action sur le métabolisme général, l'hormone de croissance, la prolactine et les corticostéroïdes jouent un rôle important chez les salmonidés dans la faculté d'adaptation à l'eau de mer.

Ainsi, l'injection d'hormone de croissance de porc à des parrs de saumons atlantiques présmolts, juste avant leur transfert dans l'eau de mer augmente leur viabilité après ce transfert (Komourdjian *et al.* , 1976). L'action de l'hormone de croissance implique dans ce cas l'activation des mécanismes hypoosmorégulateurs du saumon atlantique qui n'est pas encore prêt physiologiquement à rentrer dans l'eau de mer (Rydevik *et al.* , 1990).

A l'inverse, cet auteur ne constate pas de modifications du taux d'hormone de croissance chez des saumons atlantiques smolts transférés en eau de mer.

Il en conclut que les saumons atlantiques qui possèdent toute leur capacité hypoosmorégulatrice n'ont plus besoin de changement dans leur taux d'hormone de croissance pour rentrer dans l'eau de mer.

Björnsson en 1989 a observé, *in vivo*, que l'augmentation saisonnière de la longueur des jours influençait de la même manière le taux d'hormone de croissance sanguine. Il conclut que la photopériode est un important facteur environnemental de régulation du taux sanguin d'hormone de croissance chez *Salmo salar*.

La température régule également le taux d'hormone de croissance dans le sang : lorsque la température est basse (6°C), le taux sanguin de l'hormone est réduit (Björnsson *et al.*, 1989).

Prunet et Boeuf (1985) ont comparé des truites arc-en-ciel non smolts et des saumons atlantiques smolts.

Ils constatent que le taux de prolactine dans le sang des truites diminue après le transfert de l'eau douce à l'eau de mer, au contraire des saumons atlantiques smolts qui présentent un taux de prolactine constant quelque soit l'environnement.

Quatre ans plus tard, Prunet et Boeuf (1989) ont mis en évidence une corrélation négative entre la diminution du taux de prolactine dans le sang et l'augmentation de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase branchiale chez *Salmo gairdneri*.

La prolactine aurait ainsi chez les salmonidés un effet inhibiteur sur l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase.

c. Les corticostéroïdes.

Les corticostéroïdes et principalement le cortisol jouent un rôle important dans l'osmorégulation. Ils stimulent l'activité ATPasique et surtout l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase des cellules à chlorure (Mc Cormick, 1990).

Ce point sera d'ailleurs développé dans la partie consacrée à l'osmorégulation branchiale.

Lors du stress induit par l'arrivée en eau de mer, la libération du cortisol parce qu'il stimule l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase, permet ainsi une meilleure adaptation des salmonidés migrateurs à leur nouveau milieu.

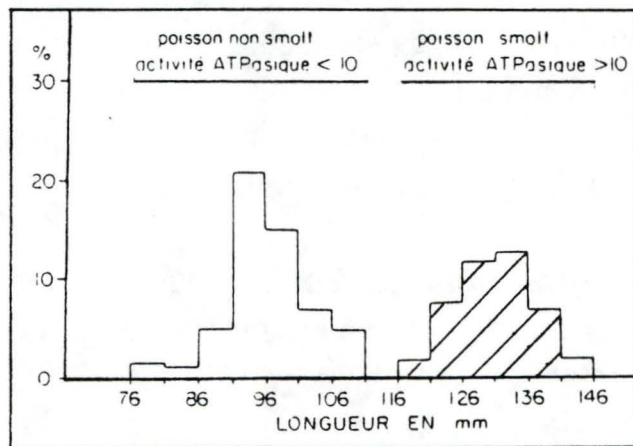


Figure 4 : Structure d'une population d'un lot de saumons atlantiques. (Boeuf et al., 1985)

Enfin, Sheridan (1986) a mis en évidence une action des corticostéroïdes dans la réduction des lipides du foie et des muscles lors de la transformation parr-smolt.

4. Facteurs influençant la smoltification.

Même si la smoltification se déclenche essentiellement grâce à un profond changement du rythme interne à l'animal (contrôle endocrinien), le phénomène est synchronisé par divers facteurs.

Trois paramètres sont essentiels pour espérer obtenir une smoltification chez les salmonidés migrateurs : l'effet de la taille, la photopériode, et la température (Wedemeyer, 1980).

a. L'effet de la taille.

Dès 1957, Elson remarque l'influence de la taille sur la transformation parr-smolt chez *Salmo salar*. Les saumons atlantiques doivent atteindre une taille minimum de 10 cm au début de la période de smoltification pour espérer se transformer. Les poissons n'ayant pas la taille requise smoltifient la saison suivante.

Pour Gaignon (1988), cette taille minimale est de plus ou moins 12 cm (figure 4). La taille limite est fonction de la croissance et de tous les paramètres qui influent sur elle. La taille augmente avec l'âge des smolts :

à 1 an, elle est de 12-15 cm alors qu'à 2 ans, elle est d'environ 16-20 cm. En fait, la séparation des tailles est plus nette puisqu'il apparaît, dans une population de saumons atlantiques, un bimodalisme qui cloisonne les saumons capables de smoltifier des autres. Ce bimodalisme survient dès l'automne de la première année, que cela soit en élevage ou en condition naturelle.

Les saumons atlantiques dont le taux de croissance est le plus élevé peuvent smoltifier le printemps suivant.

A l'inverse, les saumons atlantiques dont le taux de croissance est le plus bas doivent attendre au minimum une saison de plus (Higgins, 1985).

Les facteurs qui influencent le bimodalisme sont pour Gaignon (1988): l'influence génétique (origine des oeufs du couple reproducteur) et l'influence environnementale (régime thermique et nutrition). Le bimodalisme est toutefois indépendant de la maturation précoce du sexe ou des interactions sociales.

Enfin, Kristinsson et son équipe en 1985 constatent que le groupe de saumons atlantiques qui montre un taux de croissance élevé en décembre, présente un taux de thyroxine plasmiq ue trois fois plus élevé que le groupe de saumons atlantiques à faible taux de croissance.

Cela indique que des changements physiologiques ont lieu, déjà pendant la période hivernale précédant la période de smoltification. Kristinsson conclut que l'entrée dans une phase de croissance élevée marque une nouvelle étape dans le processus de la smoltification. Le saumon doit atteindre cette étape impérativement à l'automne pour pouvoir smoltifier au printemps de l'année suivante.

b. Effet de la photopériode.

Chez les salmonidés, et le saumon atlantique en particulier, la photopériode est le synchronisateur saisonnier des changements physiologiques lors de la croissance, de la smoltification ou de la migration.

De nombreux chercheurs ont étudié l'influence de la photopériode sur la transformation parr-smolt et la croissance.

En 1974, Wagner a mis en évidence la présence d'un cycle endogène de smoltification. Il a montré que *Salmo gairdneri* placé dans des conditions d'obscurité totale et de température constante peut développer les caractéristiques d'un smolt.

Eriksson et Lundqvist (1982) ont quant à eux observé que *Salmo salar*, placé sous un cycle de photopériode constante (12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité) et de température constante, passe par une période où il présente un coefficient de condition élevé et l'apparence d'un parr, suivie d'une autre période où le saumon possède un coefficient de condition bas et l'apparence d'un smolt.

Johnsson et Clarck (1988) ont montré l'effet synchronisateur de la photopériode. Ils ont soumis en janvier *Salmo gairdneri* à une longueur du jour de 14,5 heures simulant ainsi des conditions printannières. Il en résulte une accélération du phénomène de smoltification. La smoltification se déroule début mars : en effet, le coefficient de condition diminue entre le 10 et le 30 mars indiquant que la fenêtre de smoltification est passée.

A l'inverse, la prolongation des conditions hivernales (courte photopériode) reporte la smoltification (Hoar, 1988).

Stewart et son équipe (1990) ont montré la stimulation de la croissance par la photopériode. En plaçant en automne, deux groupes de saumons atlantiques, l'un sous photopériode naturelle et l'autre sous un cycle de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, il ont constaté que le groupe sous la photopériode 16/8 présente un taux de croissance supérieur au groupe sous régime naturel.

D'autres auteurs ont montré l'importance d'une photopériode variable sur l'activité enzymatique. Des saumons sous condition de lumière constante n'ont présenté aucune variation de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, la citrate synthétase et la cytochrome C oxydase du foie, des branchies et des reins (Saunders *et al* , 1989).

Enfin, la photopériode ne semble pas influencer l'apparition de la livrée argentée (Hoar, 1988).

c. Effet de la température.

La température est, chez le saumon comme chez tous les poïkilothermes, le paramètre de l'environnement le plus fondamental. Elle affecte entre autre, la vitesse du développement, la maturation, la smoltification et la résistance aux maladies (Gaignon, 1988). L'influence de la température est difficile à généraliser et varie en fonction de l'espèce.

Ainsi, la truite steelhead présente une inhibition du comportement migratoire si la température dépasse 13°C et un maximum de tolérance saline à 11°C (Johnsson et Clark, 1988).

Par contre, le saumon atlantique smoltifie bien à des températures de 15°C à 16°C (Gaignon, 1988).

Toujours est-il que la smoltification dépend fortement de la température. On peut ainsi prévoir l'âge des smolts par rapport à la température de la rivière qu'ils habitent.

Symons (1979) estime que la production de smolts est fonction du nombre de jours où la température atteint ou dépasse 7°C. Cette estimation est issue du fait que l'âge des saumons atlantiques smolts varie d'après la latitude. L'âge des smolts diminue en fonction de la rigueur du climat : plus le climat est tempéré, plus tôt les saumons atlantiques smoltifieront.

Dans le nord de la Norvège, l'âge du smolt est parfois de 7 ans (Dahl, 1910). A l'ouest de la répartition du saumon atlantique c'est-à-dire au Canada, la moyenne d'âge des smolts est de 5 ans (Mills, 1989) ; enfin en France, des smolts d'un an sont tout à fait courants (Gaignon, 1988).

De même, une élévation printanière et progressive de la température concomittante à une augmentation de la photopériode est la condition la plus favorable à l'obtention d'une bonne euryhalinité (Gaignon, 1988).

En élevage, il faut donc un contrôle bien strict de la température afin d'éviter les effets inhibiteurs des hautes et des basses températures : les hautes accélérant la transformation du smolt en tacon (Wedemeyer, 1980) et les basses retardant le passage du tacon en smolt (Gaignon, 1988).

d. Autres paramètres.

En condition d'élevage, l'obtention de smolts ne se limite pas au contrôle de ces trois paramètres ; d'autres facteurs influencent la production de smolts.

Il s'agit bien souvent de paramètres physico-chimiques en rapport avec la qualité de l'eau dans laquelle évoluent les poissons.

Gaignon en 1988 remarque : "Pour le saumon atlantique une moindre qualité de l'eau du milieu d'élevage conduit inévitablement à un démarrage plus difficile, à une moins bonne santé générale, une plus grande sensibilité aux maladies, à une moindre croissance dont les effets peuvent être catastrophiques sur le taux de smoltification, enfin à des mortalités en cas de manipulation du cheptel."

Ainsi, des agents pathogènes sont associés à une mauvaise qualité de l'eau. La furunculose, par exemple, est une maladie provoquée par une bactérie Gram-négative déterminée en 1963 par Smith et appelée *Aeromonas salmonicida*. Cette bactérie provoque la nécrose des nageoires et tue à court terme les saumons atlantiques touchés.

En condition d'élevage, le saumon a besoin d'une très bonne oxygénation. Le pourcentage de saturation en O₂ doit être compris entre 75 et 85 % mais surtout ne pas dépasser 100 %. L'air insufflé dans l'eau, pour fournir cette saturation en oxygène, contient également de l'azote et du gaz carbonique.

L'accroissement de la saturation en oxygène augmente la teneur des autres gaz. De plus, les saumons produisent du gaz carbonique lors de la respiration et des composés azotés dans les urines provoquant une sursaturation de l'eau en ces gaz.

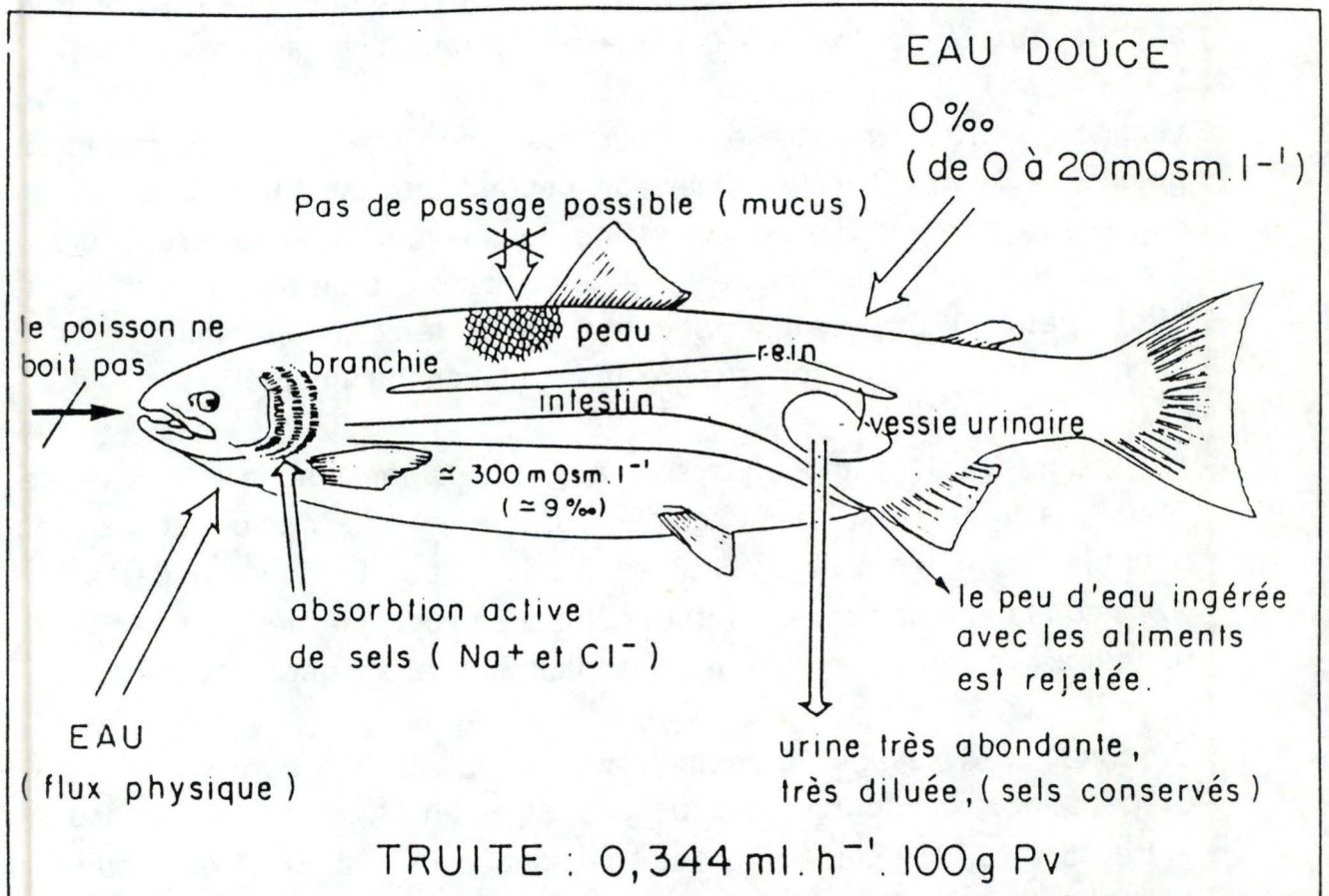


Figure 5 : La truite en eau douce (Boeuf, 1987).

- La valeur donnée au bas de la figure est la quantité d'urine émise (en millilitres par heure et pour 100 grammes de poids vif).

Il survient alors au niveau du cheptel des embolies gazeuses caractérisées par une exophtalmie qui peut provoquer la perte d'un ou des deux yeux suite à l'éclatement de petits capillaires au niveau de l'oeil et qui tue rapidement le saumon atlantique (Flipot, 1982).

C. Osmorégulation et smoltification.

1. Osmorégulation générale.

Le saumon est un migrateur actif. Il s'agit d'une espèce euryhaline qui supporte donc des modifications de concentration en sels du milieu extérieur tout en gardant une bonne homéostasie osmotique (concentration constante en sels du milieu intérieur).

Cette concentration constante permet au saumon de conserver des conditions optimales et indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Pour garder cette bonne homéostasie, le saumon met en place différents systèmes adaptatifs qui lui permettent de changer de milieux.

a. Pression osmotique et milieu.

Le saumon évolue dans deux milieux diamétralement différents qui sont l'eau douce et l'eau de mer.

Parlons d'abord de l'eau douce (figure 5) :

Le saumon se trouve dans un environnement hypoosmotique c'est-à-dire que son milieu intérieur est plus concentré en sels que le milieu extérieur dans lequel il baigne. Il s'en suit un mouvement d'eau de l'extérieur vers l'intérieur du corps suivant les lois de l'osmose.

A l'inverse, il y a un passage de sels du milieu interne vers le milieu externe. Pour contrecarrer ces phénomènes, le saumon met en place des systèmes de régulation qui lui permettent d'excréter une grande quantité d'eau et d'absorber activement les sels.

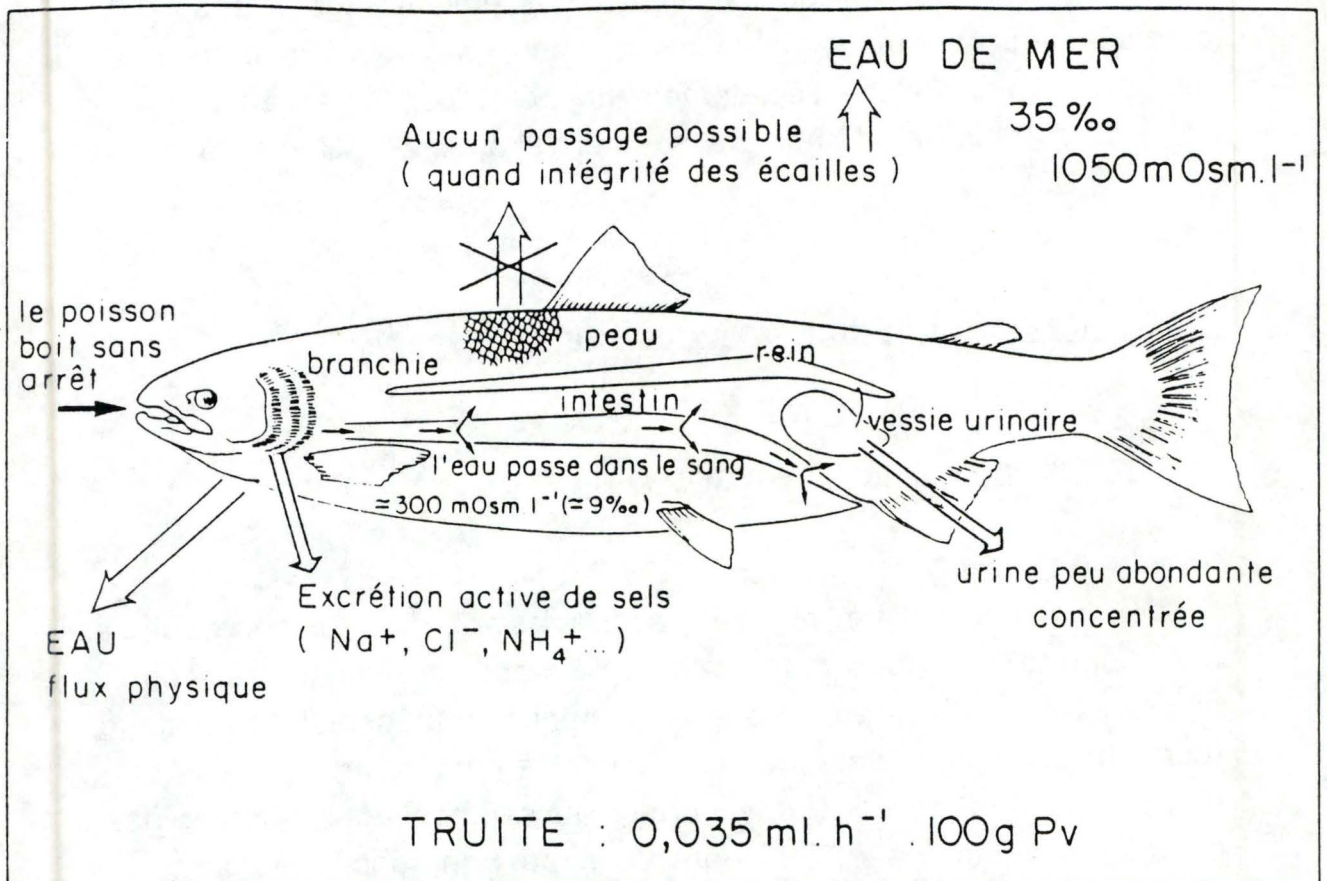


Figure 6 : La truite en eau de mer (Boeuf, 1987).

- La valeur donnée au bas de la figure est la quantité d'urine émise
(en millilitres par heure et pour 100 grammes de poids vif).

Les organes importants qui interviennent dans cette régulation sont : les branchies, les reins, la vessie, la peau et les intestins.

Autre milieu, l'eau de mer (figure 6) :

Là, le saumon se trouve dans un environnement hyperosmotique c'est-à-dire que son milieu est moins concentré en sels que le milieu extérieur. L'eau a tendance à sortir et les sels à être absorbés. De nouveau, le saumon doit mettre en place des systèmes de régulation.

Pour passer d'un milieu à l'autre, le saumon a besoin d'une transformation interne profonde.

b. Les organes osmorégulateurs.

a) la peau

Au départ, le saumon a seulement un derme épais et couvert de mucus, cela pour empêcher la rentrée d'eau.

Lors de la smoltification, il perd son mucus au profit de ses écailles, celles-ci empêchant les sorties d'eau.

b) les reins

En eau douce, le saumon tend à éliminer le maximum d'eau et un minimum d'électrolytes au contraire du milieu marin, où le saumon tend à éliminer un minimum d'eau et son excédent d'électrolytes. Cela se traduit en rivière par une urine abondante et diluée.

En condition marine, la quantité d'urine est faible et concentrée (Boeuf, 1987). Il y a donc modification de l'excrétion.

Cette modification du pouvoir excrétoire est la résultante de l'ajustement de deux phénomènes de base de l'activité rénale : la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire (Hickman et Trump, 1969).

En eau douce, la filtration glomérulaire est élevée et la réabsorption est basse tandis qu'en eau de mer, la filtration glomérulaire est basse et la réabsorption tubulaire est forte (Hoar, 1988).

Lors de la smoltification de *Salmo gairdneri*, Holmes et Stainer (1966) constatent une réduction de près de 50% de la quantité d'urine produite. *Salmo gairdneri* se préadapte ainsi en eau douce à son futur milieu marin.

Par contre, on a montré récemment l'effet inverse chez *Salmo salar*. On interprète cette donnée comme une préadaptation en eau douce de l'augmentation de la perméabilité intestinale.

Enfin, on remarque une augmentation d'activité de la citrate synthase rénale et dans une moindre mesure, de la cytochrome C oxydase rénale chez *Salmo salar* en période de transformation parr-smolt (Mc Cormick *et al*, 1989).

c) les intestins

En fonction du milieu, le saumon adapte son comportement. En eau douce, il s'abstient de boire alors qu'en eau de mer, il boit abondamment. Cette eau passe au niveau des intestins dans le sang. L'absorption de l'eau, à ce niveau, est liée au transfert actif d'électrolytes (Boeuf, 1987).

Collie et Bern (1982) constatent, *in vitro*, que sur des préparations de sacs intestinaux de *Oncorhynchus kisutch* en cours de smoltification, l'absorption intestinale de l'eau augmente, préparant ainsi le saumon à sa future vie marine.

2. Osmorégulation branchiale.

La branchie est le premier organe du poisson à être en contact avec le milieu extérieur. Elle est le siège de la respiration et par son contact direct avec l'eau, le lieu privilégié des échanges ioniques.

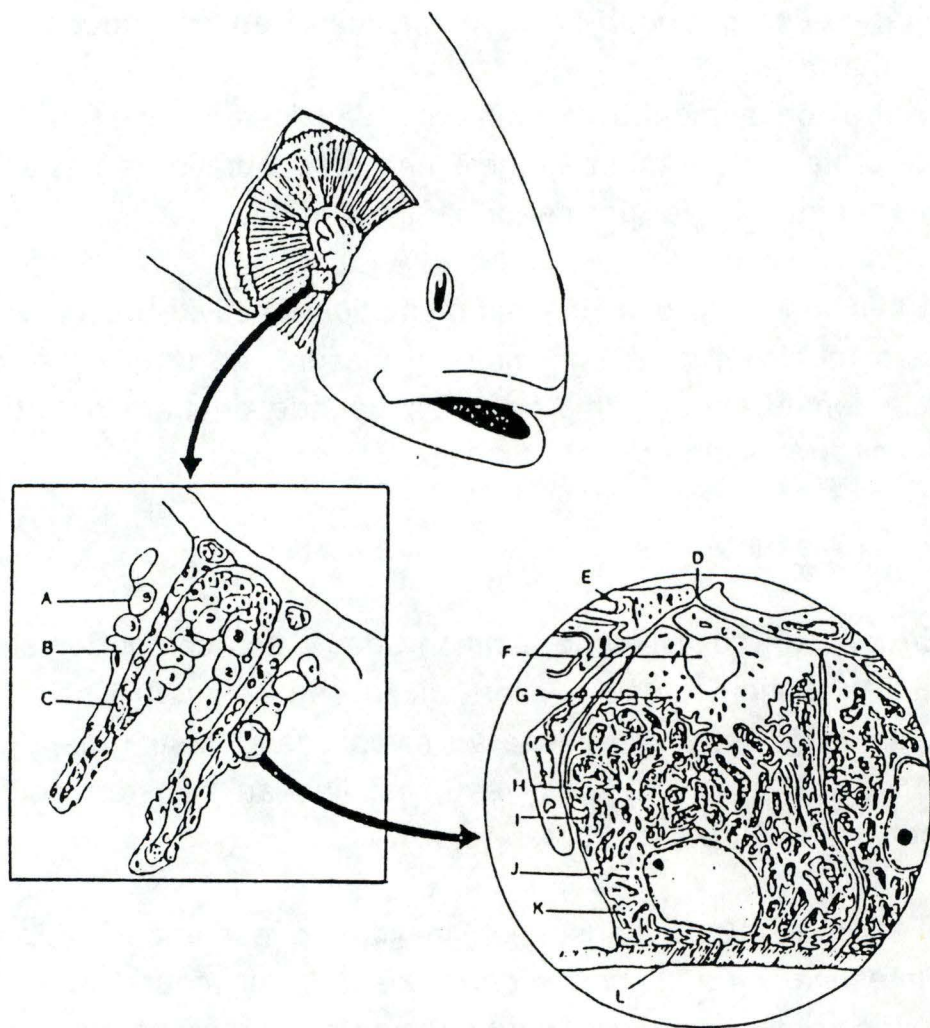


Figure 7 : Représentation schématique d'une branchie de poisson et des cellules à chlorures (d'après Mc Keown B.A., "Fish Migration"). (A) cellule à chlorure; (B) épithélium respiratoire; (C) vaisseau sanguin; (D) tight junction; (E) cellule épithéliale; (F) cavité apicale; (G) granules de glycogènes; (H) appareil de Golgi; (I) mitochondrie; (J) nucleus; (K) réticulum endoplasmique; (L) lame basale.

C'est donc un organe osmorégulateur par excellence. Lors de la smoltification, les branchies seront soumises à des modifications importantes qu'elles soient physiologiques, morphologiques ou biochimiques.

Il convient pour une bonne compréhension du travail de bien visualiser la structure et la physiologie de la branchie.

a. Description de la branchie.

Le saumon atlantique compte huit paires d'arcs branchiaux, quatre de chaque côté de la tête. Les branchies sont en fait des expansions irrégulières de l'épiderme des arcs branchiaux. Chaque arc porte deux rangées de filaments aplatis ou filaments primaires garnis eux-même de lamelles parallèles ou filaments secondaires perpendiculaires à leur surface. Chaque lamelle est soutenue par une baguette squelettique mince et retenue au cératobranchial par un ligament élastique.

On peut distinguer deux types d'épithélium branchial, chacun d'eux ayant une morphologie et une fonction propre (figure 7) :

- L'épithélium respiratoire est la barrière structurelle qui se trouve entre l'eau " oxygénée " et les sinus sanguins reliant les artères filamenteuses afférentes et efférentes.

Il est constitué d'une ou deux couches de cellules épithéliales, d'une membrane basale et d'une fine couche de tissu conjonctif.

Ce type d'épithélium ne se retrouve plus dans les filaments secondaires.

- L'épithélium sécrétoire est la barrière structurelle qui se trouve entre l'eau " salée " et le compartiment central du filament branchial primaire.

Il est constitué de deux à huit couches de cellules.

Milieu extérieur	Milieu intérieur (plasma, liquides interstitiels)	Milieu intra-cellulaire
EAU DOUCE		
Po : 0 à 20	Po : 280 à 310	Po : 280 à 310
Na ⁺ : <1	Na ⁺ : 140 à 155	Na ⁺ : 20
K ⁺ : 0.1	K ⁺ : 1 à 4	K ⁺ : 110 à 130
Cl : <1	Cl : 125 à 135	Cl : 8 à 10
EAU DE MER		
Po : 1050 (35 ‰)	Po : 300 à 330	Po : 300 à 330
Na ⁺ : 450	Na ⁺ : 150 à 165	Na ⁺ : 26
K ⁺ : 11	K ⁺ : 1 à 5	K ⁺ : 140 à 160
Cl : 560	Cl : 130 à 145	Cl : 1 à 12

T° ≤ 14°C - Unités : pression osmotique (Po) en m Osm.l⁻¹
 Na⁺, K⁺ et Cl⁻ en m Eq.l⁻¹ (pour ces ions 1 milli-équivalent/litre = 1 milli mole/litre).

Tableau 1 : Les différents compartiments chez la truite arc-en-ciel.(Boeuf, 1987)

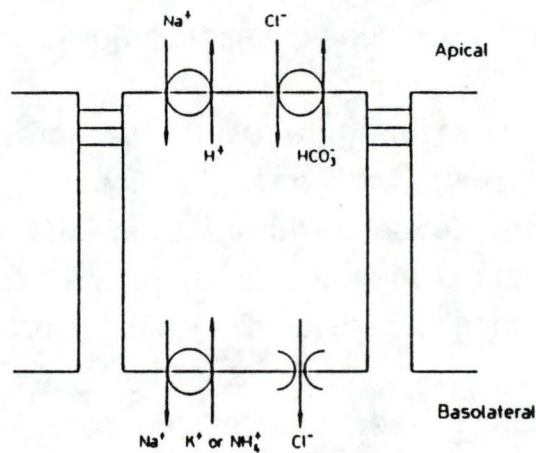


Figure 8 : Modèle de prise du NaCl par les branchies des poissons en eau douce (Towle, 1990).

Les cellules les plus fréquemment rencontrées sont des cellules épithéliales, des cellules non-différenciées, des cellules muqueuses et des cellules riches en mitochondries appelées ionocytes ou cellules à chlorure.

Pour ce qui est de la vascularisation, chaque arc viscéral squelettique est suivi de l'intérieur vers l'extérieur par une artère afférente puis efférente. L'afférente donne dans chaque filament, un rameau qui se divise en capillaires dans chaque lamelle. Ces capillaires affluent sous l'épiderme formé de cellules très aplaties qui semblent presque arrangées en une seule assise. Ils sont collectés par les rameaux de l'artère efférente de l'arc.

b. Transport ionique.

Le passage de l'eau douce (milieu hypotonique) à l'eau de mer (milieu hypertonique) nécessite une adaptation du transport ionique afin de garder une concentration ionique interne plus ou moins constante. Comme on le voit dans le tableau 1, la concentration interne de Na^+ , K^+ et Cl^- varie peu chez *Salmo gairdneri* alors que les concentrations externes de ces ions varient énormément entre l'eau douce et l'eau de mer.

- transport ionique en eau douce :

En eau douce, le saumon maintient une concentration interne en ions plus élevée que celle de son environnement extérieur. Pour y arriver, le saumon met en place divers systèmes de régulation : il s'abstient de boire, élimine l'eau par une urine abondante pour contrecarrer le flux d'eau entrant. Il capte les ions du milieu extérieur vers l'intérieur pour compenser leur flux sortant (figure 8). Les ions sodium et chlorure jouent un rôle important dans l'osmorégulation et la régulation du pH.

Ainsi, les mouvements ioniques (Na^+/Cl^-) sont influencés par les gradients chimiques et par les potentiels électriques : L'absorption apicale des ions Cl^- et non celle des ions Na^+ est inhibée par l'ion thiocyanate, ce qui implique que les mécanismes d'absorption des deux ions sont indépendants (Epstein *et al.*, 1973).

L'absorption de Na^+ et Cl^- est couplée respectivement avec une expulsion de NH_4^+/H^+ et HCO_3^- indispensable pour le maintien de l'électroneutralité :

une augmentation de la concentration externe en NH_4^+ et en HCO_3^- entraîne une inhibition de la prise de Na^+ et Cl^- (Evans, 1984).

L'ammoniaque entre dans la cellule sous forme de NH_3 et est protoné via l'hydratation de CO_2 par l'anhydrase carbonique.

L'injection de HCO_3^- stimule l'absorption de Cl^- . Cet effet est à mettre en rapport avec une augmentation du pH intracellulaire (Maetz, 1964).

- transport ionique en eau de mer :

A l'inverse de la situation en eau douce, la concentration ionique intracellulaire est plus faible que la concentration extracellulaire.

Pour garder son homéostasie, le saumon boit énormément. Il élimine peu d'eau dans les urines pour contrer le flux d'eau sortant, ce qui favorise l'influx de Na^+ et de Cl^- qui s'accumule dans le sang.

L'efflux actif de Na^+ se fait grâce à la Na^+/K^+ ATPase, une enzyme membranaire de transport qui, chez les poissons téléostéens, se trouvent dans la membrane basolatérale et non dans la membrane apicale des cellules à chlorure branchiales (Hootman et Philpott, 1979).

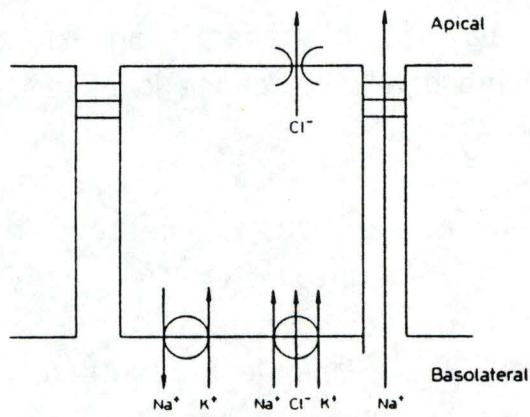


Figure 9 : Modèle d'excrétion du NaCl par les branchies des poissons en eau de mer (Towle, 1990).

La Na^+/K^+ ATPase pompe alors dans le mauvais sens les ions sodium c'est-à-dire de l'intérieur de la cellule vers l'hémolymphe.

Silva en 1977, et plus récemment Towle en 1990 ont élaboré un modèle de transport transépithélial pour les ions Na^+ et Cl^- (figure 9). Towle suggère que les Na^+/K^+ ATPases de la membrane basolatérale maintiennent, dans les cellules à chlorure, une concentration basse en Na^+ , en expulsant trois Na^+ du cytosol de la cellule vers l'hémolymphe et fait rentrer deux K^+ de l'hémolymphe vers le cytosol. Un gradient électrochimique (l'intérieur de la cellule étant négatif par rapport à l'hémolymphe) est alors généré ce qui permet à un système de cotransport $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ de fonctionner (Towle, 1990).

Ce système permet aux ions Cl^- de rentrer dans la cellule à chlorure contre son gradient électrochimique. La sortie des ions Cl^- se fait alors passivement à travers des canaux à chlorure de la membrane apicale des ionocytes.

Il semble en outre que les ions sodium transitent de l'hémolymphe vers le milieu extérieur via les espaces intercellulaires et suite au mouvement de Cl^- (Towle, 1990).

c. les ionocytes (cellules à chlorure) et leur système Na^+/K^+ ATPasique.

La cellule à chlorure est en fait une cellule volumineuse, caractérisée par une abondance de mitochondries et la présence dans le cytoplasme d'un réseau membranaire de tubules connectés avec la membrane basolatérale (Pisam *et al.*, 1988).

Une étude menée par Pisam, Prunet et Boeuf en 1988 montre une évolution de l'ultrastructure des ionocytes lors de la smoltification. A l'état de parr, la population des ionocytes se divise en deux groupes: les larges cellules à chlorure et les petites cellules à chlorure différentes par leur taille, leur nombre plus élevé pour les larges et, la présence, dans les larges cellules, de corps denses au pôle apical.

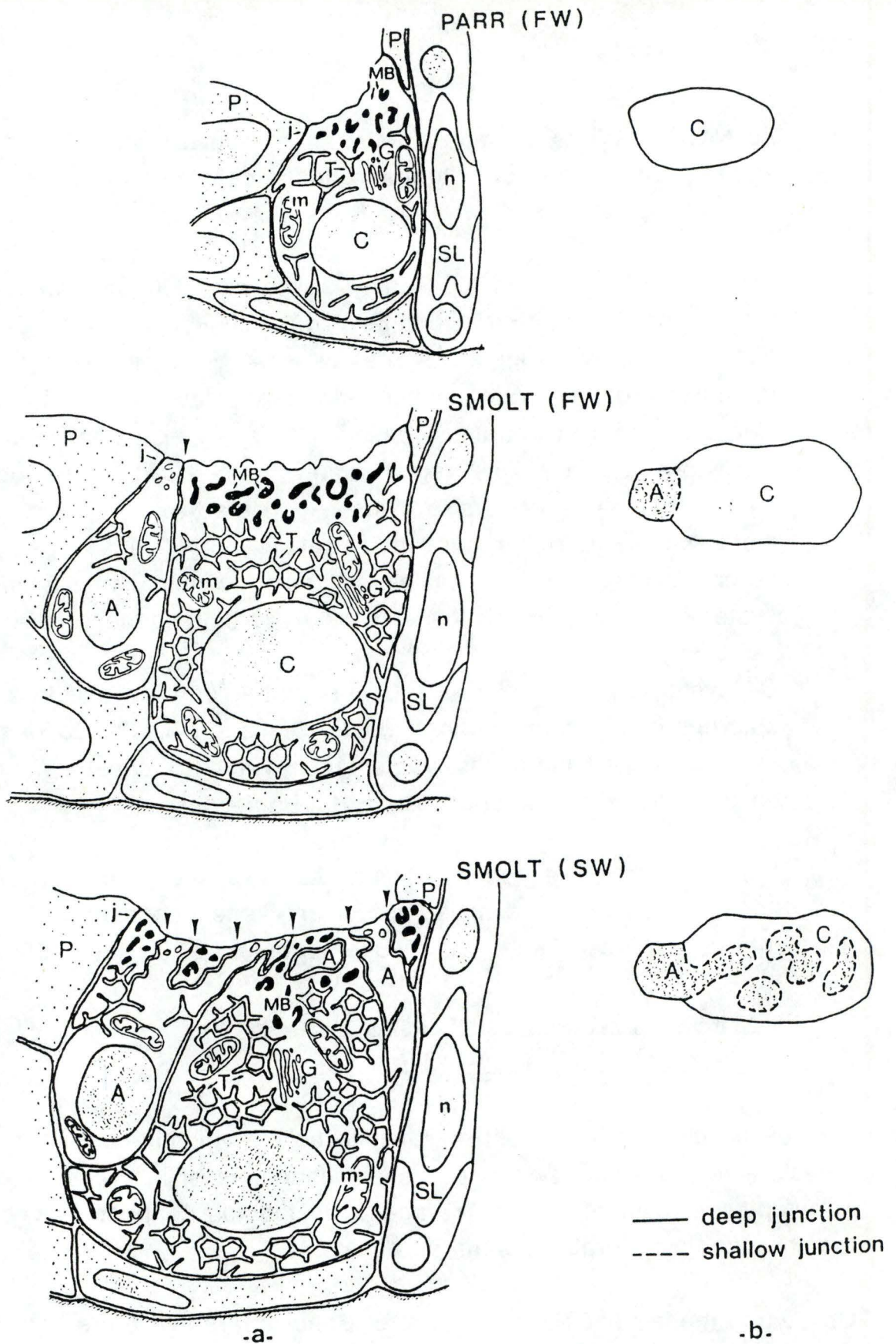


Figure 10 : Représentation schématique des modifications ultrastructurales des grandes cellules à chlorure et des cellules accessoires, dans l'épithélium du saumon atlantique durant la smoltification, en section perpendiculaire à la surface de l'épithélium (a) et parallèlement à la surface apicale de ces cellules (b) (Pisam *et al.*, 1988).

A : cellule accessoire C : cellule à chlorure G : appareil de Golgi
 j : jonction m : mitochondrie MB : corps membranaires n : noyau
 P : cellule pavimenteuse SL : lamelle secondaire T : système tubulaire
 FW : eau douce SW : eau de mer

Lors de la smoltification, il y a augmentation du nombre, du volume et du réseau membranaire, donc de surface, des tubules connectés à la membrane basolatérale.

On observe également l'apparition d'un nouveau type cellulaire : une cellule accessoire qui se joint aux larges ionocytes (figure 10). Cette apparition permet une meilleure préparation à l'entrée dans un environnement hyperosmotique. Le nombre de cellules accessoires augmente et elles développent des interdigitations avec les larges cellules auxquelles elles sont associées.

Elles jouent probablement un rôle dans l'adaptation à l'eau de mer des saumons atlantiques (Pisam *et al.*, 1988).

Les ionocytes possèdent toute l'ingénierie nécessaire à cette régulation : ce sont les ATPases et plus particulièrement la Na^+/K^+ ATPase. Celle-ci favorise le transport de Na^+ contre le gradient de concentration ; ce transport nécessitant bien sûr de l'énergie sous forme d'ATP.

On a pu également mettre en évidence une relation entre l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, la capacité à supporter des salinités élevées (Langdon et Thorpe, 1985) et l'accroissement de surface des membranes basolatérales des ionocytes (Boeuf et Prunet, 1985). Il semble donc que l'activité de la Na^+/K^+ ATPase est un bon indicateur des changements se passant lors de la transformation parr-smolt.

La Na^+/K^+ ATPase est un tétramère constitué de deux sous-unités de taille inégale, α et β : une sous-unité catalytique transmembranaire (environ 100.000 Daltons) et une sous-unité glycoprotéique qui lui est associée (environ 45.000 Daltons) (Fambrough, 1988).

La sous-unité α possède des sites de liaisons pour les ions Na^+ et l'ATP sur sa face cytoplasmique, pour le K^+ et l'ouabaine (inhibiteur spécifique) sur sa face externe. Elle est phosphorylée et déphosphorylée de manière réversible. On ignore à l'heure actuelle, la fonction de la sous-unité β .

Le fonctionnement de cet enzyme permet le transport de trois Na^+ vers l'extérieur et de deux K^+ vers l'intérieur de la cellule grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP plus un phosphate inorganique. Pour cette hydrolyse, l'ion magnésium est nécessaire. Le transport de Na^+ et K^+ est étroitement couplé à l'hydrolyse de l'ATP, celui-ci ne pouvant avoir lieu que si les ions Na^+ et l'ATP sont présents à l'intérieur et les ions K^+ à l'extérieur. Enfin, l'action inhibitrice de l'ouabaïne se fait à l'extérieur de la cellule par une compétition avec le potassium pour la liaison à l'enzyme.

Trois hypothèses sont émises par Folmar et Dickhoff (1980) pour expliquer l'augmentation d'activité de la Na^+/K^+ ATPase lors de l'entrée en mer des salmonidés :

- 1) La présence d'un isoenzyme avec deux fonctions possibles : l'une pour l'eau douce, l'autre pour l'eau de mer.
- 2) Une modification de la conformation de l'enzyme préexistant dans l'épithélium branchial.
- 3) Une augmentation du nombre de pompes sodico-potassiques via la synthèse de nouveaux enzymes.

Il semble que la dernière hypothèse soit la plus plausible. En effet, Conte et Lin (1967) ont montré une augmentation de la synthèse de l'ADN au niveau des filaments branchiaux chez le saumon chinook avant et après son entrée en mer, permettant un accroissement numérique des ionocytes et de leur activité Na^+/K^+ ATPasique.

Le système de pompe sodico-potassique n'est pas le seul marqueur de la smoltification.

En 1985, Langdon et Thorpe ont montré une augmentation de l'activité de la succinate déshydrogénase concomitante avec le pic d'activité de la Na^+/K^+ ATPase.

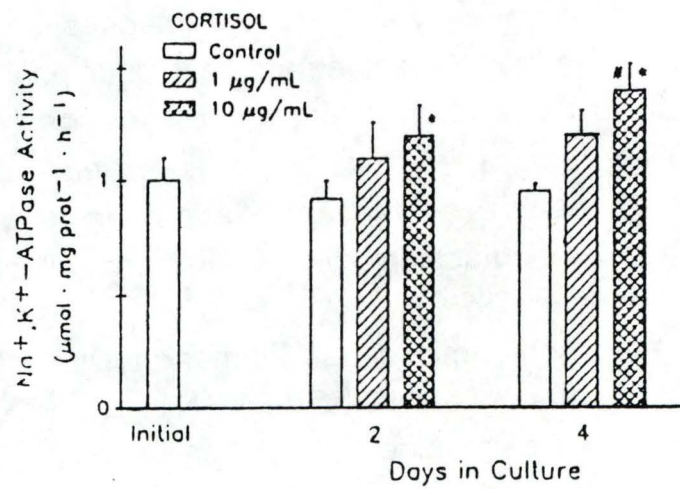


Figure 11 : Effet du cortisol sur l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase des tissus branchiaux chez des saumons coho pré-smolts adaptés à l'eau douce (Mc Cormick *et al.*, 1989).

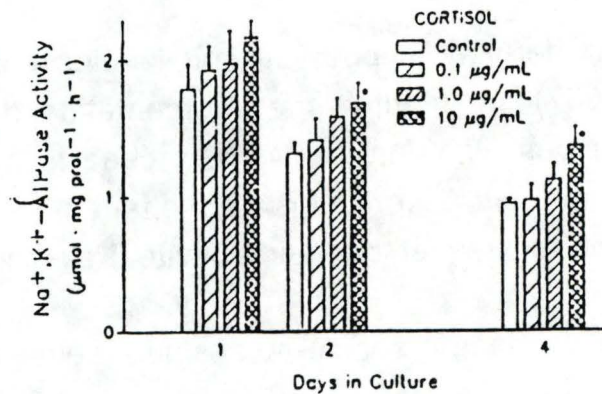


Figure 12 : Effet du cortisol sur l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase des tissus branchiaux chez des saumons coho post-smolts adaptés à l'eau douce (Mc Cormick *et al.*, 1989).

Pour leur part, Mc Cormick et Saunders en 1989 ont observé un accroissement lors de la transformation parr-smolt de l'activité de la citrate synthase et dans une moindre mesure du cytochrome C oxydase. Ils ont également constaté une élévation générale de l'activité mitochondriale toujours parallèle avec la Na^+/K^+ ATPase.

De nombreux travaux montrent que les hormones et plus particulièrement le cortisol contrôlent l'activité la Na^+/K^+ ATPase et des cellules à chlorure, mais les interactions entre les différentes hormones nous permettent difficilement d'élucider leur rôle propre.

McCormick et Bern en 1989 montrent chez *Oncorhynchus kisutch* pré- et post-smolts que l'addition de cortisol sur une culture de filaments branchiaux augmente l'activité de la Na^+/K^+ ATPase par rapport aux saumons contrôles (figure 11 et 12). Au niveau des pré-smolts, 10 μg de cortisol /ml de culture augmente de 41% l'activité de la Na^+/K^+ ATPase. Pour les post-smolts, le cortisol freine le déclin de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase. Il le fait en stimulant la Na^+/K^+ ATPase ou en évitant la dégradation de la Na^+/K^+ ATPase lors de la "désmoltification".

Des travaux similaires menés par McCormick (1990), mais sur des tilapias (*Oerochromis mossambicus*), constatent que la surface des ionocytes double après l'exposition à 1 μg de cortisol/ml de milieu de culture.

On observe également une augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase dépendante de la quantité de cortisol injecté dans le milieu de culture.

Pour leur part, Laurent et Perry (1990) montrent, en eau douce, que l'injection intramusculaire quotidienne de cortisol (4mg/kg de saumon) chez *Salmo gairdneri* accroît, après 10 jours, le nombre et la surface apicale des cellules à chlorure. Ils remarquent par ailleurs, une augmentation de l'influx total de Na^+ et Cl^- .

Ainsi selon Laurent et Perry, le cortisol augmente la prise des sels chez *Salmo gairdneri* comme si celui-ci avait été transféré dans une eau pauvre en ions.

A l'inverse, Langdon, Thorpe et Roberts (1984) montrent l'absence d'effet du cortisol sur la Na^+/K^+ ATPase de *Salmo salar* en eau douce. Ils mettent plutôt en lumière une action de l'ACTH sur la Na^+/K^+ ATPase.

Même si les avis divergent, il semble que le cortisol a bien une influence sur l'activité des cellules à chlorure et plus généralement sur les phénomènes d'osmorégulation. Son action ne se fait pas indépendamment des autres hormones mais elle s'intègre dans un processus de régulation du transport ionique.

2 : LES CA⁺⁺ ATPASES

Nous venons de montrer l'importance de la Na⁺-K⁺ ATPase lors de la smoltification. Par contre, très peu de données ont été récoltées sur l'importance du calcium et des Ca⁺⁺ ATPases en condition de transformation parr-smolt.

Comment le saumon se prépare-t-il aux hautes concentrations en calcium dans l'eau de mer?

Quel est le rôle des Ca⁺⁺ ATPases et quel contrôle hormonal les régule?

A. L'importance de l'ion calcium dans la cellule.

1. Le signal calcium.

L'écoulement d'une très faible quantité d'ions calcium vers l'intérieur de la cellule est un signal qui déclenche des phénomènes biologiques aussi différents que la contraction musculaire ou la sécrétion d'une hormone.

La fixation des ions calcium par des protéines joue un rôle important dans le déclenchement du signal calcium intracellulaire, ainsi que dans ses effets. Les principaux régulateurs de la concentration en ions calcium libres, dans le cytoplasme et dans les organites, sont des protéines situées dans la membrane plasmique et dans les membranes de deux types de structures : le réticulum endoplasmique et les mitochondries. En fixant l'ion et en le transportant vers l'intérieur ou l'extérieur du cytosol, ces protéines sont à l'origine des variations de concentrations qui constituent le signal calcium.

Membrane plasmique	Reticulum sarcoplasmique	Mitochondries
canal Ca^{2+}	canal Ca^{2+}	
Echangeur $3 \text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$		Echangeur $2 \text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
ATPase de pompage du Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$)	ATPase de pompage du Ca^{2+}	pompe à Ca^{2+}

Tableau 2 : Mécanismes impliqués dans le transport du calcium au travers des membranes cellulaires (d'après Carofoli, 1988).

Ces protéines sont responsables de la très faible concentration en calcium à l'intérieur de la cellule à l'état de repos ($0,1 \mu\text{M}$ dans une cellule de mammifère). De plus, à cette concentration, le mouvement d'une petite quantité d'ions suffit à activer les enzymes et l'énergie dépensée par ce mécanisme reste faible. La régulation se fait donc principalement au niveau du réticulum et des mitochondries. Le réticulum fonctionne comme un régulateur rapide et sensible de la concentration en ions calcium ; les mitochondries quant à elles ont plutôt une action à long terme et moins sensible.

Divers mécanismes peuvent être impliqués dans le transport du calcium au travers des membranes cellulaires (tableau 2).

Les canaux calciques se retrouvent dans la membrane plasmique et la membrane du réticulum sarcoplasmique. On peut se représenter les canaux calciques comme des pores dans les membranes. Ils sont normalement fermés et lorsqu'ils sont ouverts, le calcium entre passivement dans la cellule poussé par le gradient électrochimique. Ces canaux sont présents dans de nombreux types cellulaires dont le plus connu est le type musculaire, mais ces canaux existent également dans les érythrocytes, les lymphocytes, les cellules endocrines et nerveuses (Carofoli , 1991).

Ils sont classés en fonction des différences dans les mécanismes qui gouvernent leur ouverture et leur fermeture.

On distingue deux groupes de canaux :

- Les canaux dépendant du voltage et qui s'ouvrent en réponse à une dépolarisation de la membrane.
- Les canaux " receptor operated " (Bolton, 1979) s'ouvrant lors de la fixation d'un ligand sur le récepteur du canal.

2. Le calcium comme messenger secondaire.

En vue d'un bon fonctionnement de l'organisme, les cellules doivent communiquer les unes avec les autres. Cette communication se réalise soit par contact direct, soit via des signaux.

Le mécanisme par lequel l'information du messenger primaire (une hormone le plus souvent ou un influx nerveux) est transmis au travers de la membrane à un système de second messenger est appelé la transduction.

Les messagers secondaires sont des substances, capables de contrôler et de synchroniser certains mécanismes biochimiques intracellulaires, formées et libérées dans le cytoplasme en réponse à un stimulus extérieur de la cellule.

Plusieurs conditions sont requises pour qu'une molécule soit considérée comme un messenger secondaire intracellulaire. Elle doit être présente en faible concentration ou absente dans la cellule au repos et il doit exister un système pour augmenter sa concentration et un autre qui permet le retour à la situation de repos ; on parle d'un processus de désensibilisation.

Dans la plupart des cas, les seconds messagers modifient la conformation d'un système enzymatique selon l'un des modèles suivants :

le départ d'une sous-unité inhibitrice, la phosphorylation d'une protéine par une protéine kinase ou la fixation directe.

Les mécanismes qui déclenchent l'action du Ca^{++} comme messenger sont des modifications de dépolarisation membranaire et de perméabilité aux ions minéraux déclenchées par le passage de l'influx nerveux et le système des phosphatidyls inositides par exemple. Le calcium active aussi des systèmes enzymatiques soit via la calmoduline, soit directement.

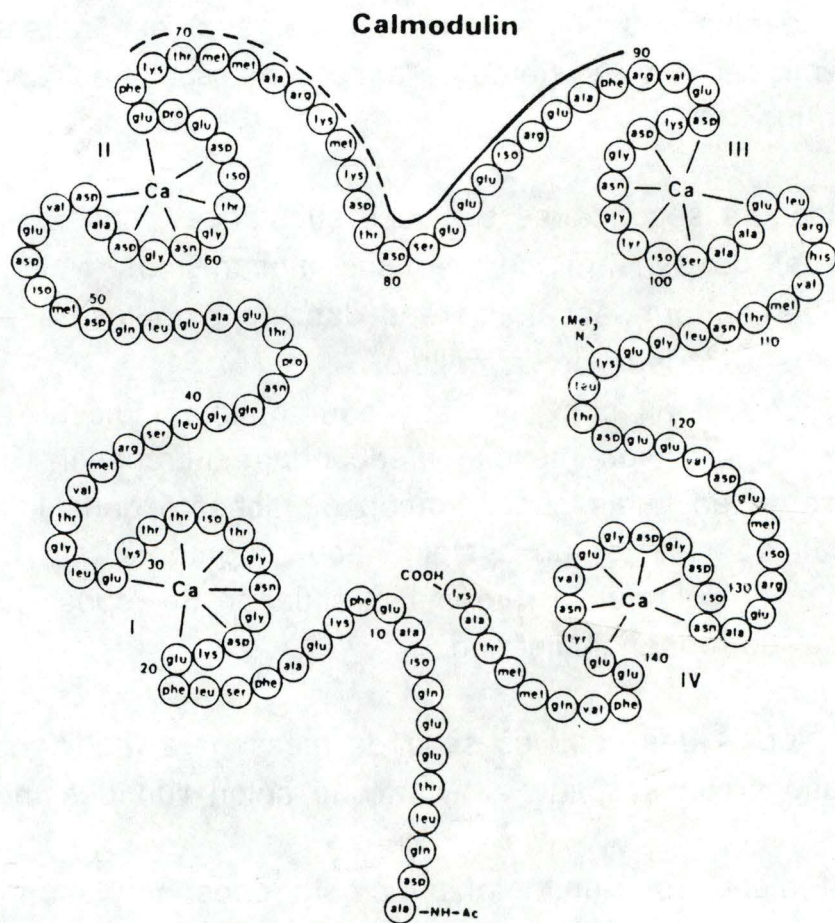


Figure 13 : Structure de la calmoduline (Dedman, 1984).

3. L'interaction calcium/calmoduline.

Depuis le 19^e siècle, grâce aux études de Ringer (1882) sur la contraction musculaire, on a découvert l'importance de l'ion calcium dans la régulation cellulaire.

Le calcium intervient notamment dans :

- l'endocytose et l'exocytose.
- la motilité des cellules.
- le mouvement des chromosomes lors de la division cellulaire;
- le métabolisme du glycogène.
- la synthèse et la libération de neurotransmetteurs.

Bien souvent, le calcium n'agit pas seul : une protéine, la calmoduline, intervient dans plusieurs fonctions régulatrices du calcium.

Cette protéine est le chef de file d'un groupe de protéines régulatrices : les calciprotéines. Une protéine est reprise dans ce groupe si elle a au moins un site de fixation spécifique pour l'ion calcium, si la fixation est réversible et si la modification de conformation est transmissible à une protéine cible.

La calmoduline est une protéine formée d'une simple chaîne de 148 acides aminés (figure 13). Elle présente quatre sites de fixation pour l'ion calcium ; dans chaque site, l'ion se fixe à six acides aminés (Dedman, 1984).

Dans la cellule, la calmoduline se présente sous forme libre dans le cytoplasme ou associée aux membranes. Actuellement la calmoduline a été trouvée dans tous les organismes étudiés, des bactéries jusqu'aux vertébrés. Les calmodulines provenant de sources diverses d'un point de vue phylogénique ont des propriétés biologiques et biochimiques identiques ou tout au moins similaires.

B. Le transport du calcium et les Ca⁺⁺ ATPases.

Les membranes plasmiques contiennent des protéines permettant l'évacuation des ions calcium hors de la cellule.

Il existe un système à haute affinité, l'ATPase, qui scinde l'ATP et en récupère l'énergie. Celle-ci permet d'évacuer les ions calcium malgré la différence importante de concentration entre les deux faces de la membrane plasmique. Cette pompe a été découverte par Schatzman (1966) dans la membrane des érythrocytes.

L'ATPase de la membrane plasmique répond à des augmentations infimes de la concentration intracellulaire en calcium. Il s'agit donc d'un système de haute affinité pour le Ca⁺⁺ ($K_m < 0.5 \mu M$) (Carofoli, 1988).

La Ca⁺⁺ ATPase activée expulse l'ion Ca⁺⁺ hors du cytoplasme mais, afin de conserver l'équilibre électrique, fait entrer deux protons H⁺.

Un autre système, de faible affinité pour le calcium ($K_m > 1-5 \mu M$), a été mis en évidence par Gmaj et ses collaborateurs (1979) dans la membrane basolatérale du cortex de rein de rat : il s'agit de l'échangeur sodium/calcium. Ce système intervient dans l'efflux et l'influx de calcium. Son action est modulée non seulement par l'intensité du gradient Na⁺ et Ca⁺⁺, de part et d'autre de la membrane plasmique mais également par l'intensité de la différence du potentiel électrique (Carofoli, 1988).

Une propriété de ces ATPases est leur stimulation par la calmoduline.

La calmoduline augmente l'affinité de la Ca⁺⁺ ATPase et son activité transportrice : sa vitesse de transport pouvant atteindre dix fois celle de départ (Larsen et Vincenzi, 1979).

Carofoli (1991) a montré que la calmoduline stimule en fait la vitesse de phosphorylation et de déphosphorylation concomitante au transport. Dans ce cas, la calmoduline interagit directement sur l'ATPase et non sur la stimulation d'une kinase calmoduline-dépendante, comme c'est le cas pour une ATPase analogue du réticulum sarcoplasmique.

Cependant, en l'absence de calmoduline, il existe d'autres systèmes de stimulation. On peut citer les phospholipides acides de la membrane plasmique qui peuvent entraîner jusqu'à 50% de l'activation maximale de la Ca^{++} ATPase.

Ainsi, une activation maximale est observée en présence de phosphatidylcholine ou de phosphatidylsérine, alors qu'en présence de phosphatidylinositol ou de cardiolipine l'enzyme est stimulé en l'absence de calmoduline.

La scission de l'ATPase par des enzymes protéolytiques semble constituer un autre mécanisme de régulation. Enyedi et ses collaborateurs (1980) ont constaté qu'un traitement protéolytique enlève un fragment de poids moléculaire de 30000 Daltons, entraînant une activation de la pompe calcique. L'hypothèse émise suggère que le fragment perdu contient le domaine de régulation de la pompe calcique.

On a mis en évidence, au niveau de la membrane plasmique du muscle cardiaque, un quatrième mécanisme de régulation. Il s'agit de la phosphorylation de la pompe calcique par une protéine kinase. Evers et ses collaborateurs (1988) ont montré au niveau de membranes plasmiques de foie de rat, l'existence de protéines membranaires dont la phosphorylation est dépendante du calcium. Ces protéines phosphorylables ont un poids moléculaire de 110 et 135 KDaltons.

La première a été identifiée comme étant la Ca^{++} ATPase du réticulum endoplasmique. Quant à la deuxième, sa phosphorylation a été observée exclusivement dans les membranes basolatérales et à pH 7 et 7,5. Par contre, à pH 8, on n'observe pas de phosphorylation de cette protéine.

A noter également, le rôle du magnésium dans la régulation de ce système ATPasique. Bien que l'ATPase puisse être phosphorylée en présence de calcium et sans magnésium (Reinila *et al.*, 1982), la phosphorylation est accélérée en présence de Mg^{++} (Garrahan et Rega, 1978).

La Ca^{++} ATPase peut être activée, mais elle peut également être inhibée. Aux nombres des inhibiteurs, on compte la calmidazolium (ou R24751) et la vinblastine qui inhibent les enzymes dépendants de la calmoduline.

Ghijsen et Van Os (1979) ainsi que Ghijsen *et al.* (1982) ont montré qu'au niveau du cortex rénal et de l'intestin de rat, la stimulation de l'activité ATPasique par le calcium n'est pas homogène.

Ils ont détecté deux activités enzymatiques ATPasiques dépendantes du calcium dans les membranes plasmiques des entérocytes du rat:

- Une phosphatase est localisée à la fois dans la bordure en brosse et la membrane basolatérale. Elle présente un site de faible affinité pour le calcium.

- L'autre phosphatase est localisée uniquement au niveau de la membrane basolatérale et présente une haute affinité pour le calcium.

Son activité est affectée par la présence de chlorpromazine qui se trouve être un antagoniste de la calmoduline. Ces auteurs concluent que la phosphatase à faible affinité est une phosphatase "alcalinlike" et que celle à haute affinité, est la vraie Ca^{++} ATPase située exclusivement du côté basolatéral.

Au niveau de l'embranchement des poissons, Flick et ses collaborateurs (1983) ont démontré également que l'activité d'hydrolyse de l'ATP, dépendante du Ca^{++} , résulte d'un pool hétérogène de phosphatases localisé dans la membrane de l'épithélium branchial de l'anguille *Anguilla rostrata*.

En 1984, toujours Flick et ses collaborateurs constatent pour la première fois la présence d'une vraie Ca^{++} ATPase de haute affinité dans la membrane plasmique de l'épithélium branchial de *Anguilla rostrata*.

De plus, les caractéristiques de cette Ca^{++} ATPase sont similaires à d'autres Ca^{++} ATPases trouvées dans l'intestin ou les reins de mammifères.

Les différentes caractéristiques mises en évidence par Flick et ses collaborateurs sont :

- la haute affinité pour le calcium (K_m de $0,22 \mu\text{M}$).
- l'inhibition de la Ca^{++} ATPase par des antagonistes de la calmoduline, ce qui suggère la dépendance de la Ca^{++} ATPase pour la calmoduline.
- l'absence d'effet inhibiteur de la théophylline ou de la L-phénylalanine, inhibiteurs spécifiques des phosphatases alcalines.
- enfin, la Ca^{++} ATPase se localise au niveau des branchies de l'anguille.

Au niveau des mammifères, les études sur le transport ont montré que les Ca^{++} ATPases et les Na^+/K^+ ATPases se situent dans les membranes plasmiques de même tissu (Ghijsen *et al.* , 1982).

Hootman et Philpott (1979) ont pu prouver que l'activité Na^+/K^+ ATPasique dans la branchie du poisson téléostéen se situait dans le système membranaire des cellules à chlorure.

L'étude de Flick et de ses collaborateurs en 1984 a montré une relation étroite entre l'activité de la Ca^{++} ATPase et l'activité de la Na^+/K^+ ATPase dans les membranes plasmiques de la branchie, suggérant que le transport ATPasique du calcium est également localisé dans le système membranaire des cellules à chlorure.

La localisation de la Ca^{++} ATPase de haute affinité au niveau des ionocytes n'est pas étonnante. Les téléostéens d'eau douce en particulier prennent presque exclusivement le calcium de l'eau via les branchies (Berg, 1968).

D'ailleurs, la modulation des mouvements branchiaux de calcium en réponse à un environnement particulier est la condition nécessaire pour garder une bonne homéostasie de l'ion Ca^{++} (Shephard, 1981).

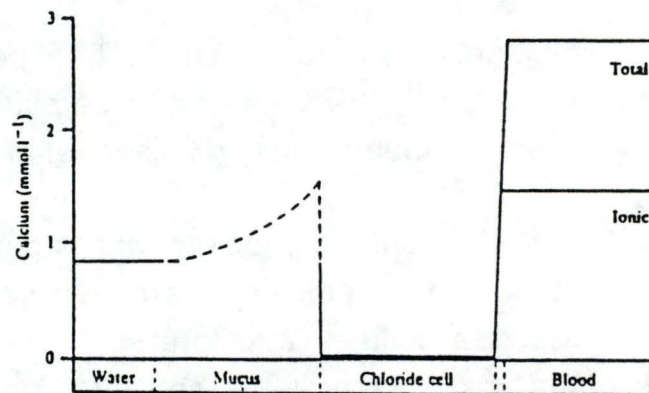
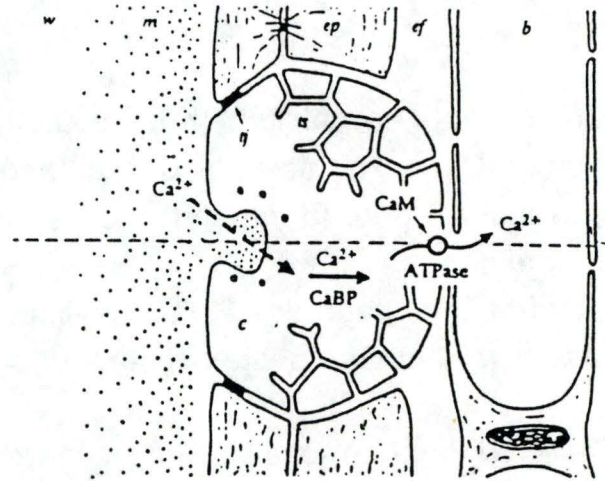


Figure 14 : Représentation schématique du modèle du transport du calcium (Flik *et al.*, 1985)

Le graphe exprime la variation de la concentration en calcium lors de son passage à travers la cellule à chlorure (voir ligne en pointillé : schéma ci-dessus).

D'autres poissons d'eau douce présentent également une activité ATPasique à haute affinité pour le calcium, citons *Salmo gairdneri* (Ma et al ., 1974), *Anguilla rostrata* (Fenwick, 1976) et *Oreochromis mossambicus* (Flick et al ., 1985). So et Fenwick (1977) ont montré, au niveau des branchies de l'anguille, que cette activité est souvent liée à un transport transépithélial du Ca^{++} .

L'absorption active du calcium à travers l'épithélium branchial implique un transit cellulaire plutôt qu'un passage paracellulaire (Perry, 1988). Le calcium doit donc passer deux barrières : les membranes apicales et basolatérales (figure 14).

Le modèle de Perry (1988) sur *Salmo gairdneri* propose que le mouvement du calcium à travers la membrane apicale se fait de manière passive grâce au potentiel transmembranaire négatif et à la faible concentration en calcium à l'intérieur de la cellule.

Cette entrée de Ca^{++} se produit selon Perry via des canaux calciques indépendants du voltage. Cette hypothèse est basée sur deux observations : d'une part, il y a absence d'effet inhibiteur d'un antagoniste des canaux calciques dépendants du voltage : la nifédipine; d'autre part, on constate une inhibition prononcée de l'influx de calcium par le lanthane.

Une fois dans le cytosol, le calcium est tamponné en se liant aux calci-protéines (Flick et al . , 1985).

L'ultime processus dans l'absorption transépithéliale du calcium est un transport actif contre le gradient électrochimique à travers la membrane basolatérale.

Les études de Flick (1985) et de Perry (1988) ont confirmé la présence d'un système de transport de haute affinité pour le calcium associé à la membrane basolatérale de, respectivement, *Oreochromis mossambicus* et de *Salmo gairdneri*.

Cette ATPase est dépendante de la calmoduline et transporte le calcium du cytoplasme des ionocytes vers le sang.

Au niveau de l'efflux du calcium, c'est-à-dire du sang vers le milieu extérieur, Perry (1988) propose également un modèle de passage passif du calcium au travers des jonctions entre les cellules à chlorure et les autres, le gradient de diffusion étant alors influencé par les concentrations extérieures en calcium.

C. Le contrôle hormonal sur le transport du calcium.

La modulation de l'activité de la Ca^{++} ATPase et plus généralement de la concentration interne en ions Ca^{++} est encore mal connue.

Ce contrôle est nécessaire aux saumons pour maintenir un taux de calcium plasmique constant par rapport à son milieu extérieur et pour le préparer au haute concentration de calcium en eau de mer lors de sa smoltification.

Perry et Wood (1985) ont établi une relation entre la prolifération des ionocytes induite par le cortisol et le flux entrant de calcium chez *Salmo gairdneri*.

D'autres travaux de Perry (Perry *et al.*, 1985) ont exclu l'action à court terme de l'adrénaline sur la stimulation de l'influx calcique bien que le taux d'adrénaline dans le plasma sanguin augmente pendant la phase d'acclimatation de *Salmo gairdneri* dans une eau à faible concentration en calcium. Ils postulent que la stimulation initiale de l'influx de calcium est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane apicale aux ions calcium.

Cette modification de perméabilité serait ainsi en relation directe et spécifique avec l'environnement pauvre en calcium et non dépendante d'interactions hormonales. Le contrôle hormonal de l'absorption branchiale agit plus significativement lorsque l'exposition à une eau à faible concentration en calcium se prolonge.

Un autre facteur qui stimule l'influx de calcium semble être la prolactine (Wendelaar Bonga et Flick, 1982).

Le taux de celle-ci chute rapidement après le transfert du saumon *Oncorhynchus kisutch* en eau de mer (Young *et al.* , 1989).

Ces auteurs ne peuvent cependant établir un rôle spécifique de la prolactine dans la régulation de l'influx calcique.

Chez les poissons téléostéens, on soupçonne plusieurs facteurs tel que l'hypocalcine et la calcitonine d'avoir une action hypocalcémiante. L'hypocalcine est produite par les corpuscules de Stannius, petite glande endocrine liée étroitement aux reins de la plupart des poissons téléostéens (McKeown, 1984).

Verbost et son équipe en 1989 ont montré que l'injection d'un homogénat de corpuscules de Stannius et celle d'hypocalcine réduisent l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans les branchies de *Salmo gairdneri* de respectivement 63% et 37%.

Enfin la calcitonine, hormone hypocalcémiante produite par les corps ultimobranchiaux régule aussi le taux de Ca^{++} chez les poissons (Copp *et al.* , 1962). Ce résultat fut confirmé par Orimo et son équipe (1972) qui suggèrent l'effet hypoosmorégulateur de la calcitonine chez *Anguilla japonica* et par Fouchereau-Peron (1981) qui mit en évidence la présence de récepteurs branchiaux pour la calcitonine chez *Salmo gairdneri*.

Cette hormone hypocalcémiante doit donc intervenir au niveau de la régulation du calcium pendant la smoltification pour préparer ainsi le saumon à son futur milieu à forte concentration en calcium.

Malheureusement, des travaux menés par Björnsson et ses collaborateurs (1989) n'ont pas pu montrer une corrélation significative entre l'introduction en eau de mer du saumon *Oncorhynchus kisutch* smolt et le taux de calcitonine dans le plasma sanguin. Ils ont émis cependant, l'hypothèse qu'une augmentation du taux de calcitonine durant les premières étapes de la smoltification pouvait préparer le saumon à sa future vie en mer.

D. Le calcium et le cadmium.

Depuis que Vallee et Ulmer (1972) ont montré que le cadmium (Cd) affectait, in vitro, l'activité de différentes préparations enzymatiques purifiées ou semi purifiées de plusieurs espèces animales, on a commencé à considérer que le cadmium pouvait interférer avec le métabolisme du poisson.

Bien que les mécanismes d'action furent longtemps inconnus, on sait que la dose léthale en 5 jours pour *Salmo gairdneri* est de 16 $\mu\text{g Cd}^{++}/\text{l}$ (Ball, 1967) tandis que *Salmo trutta* supporte 27 $\mu\text{g Cd}^{++}/\text{l}$ pendant 3 mois (Roberts *et al.* , 1979).

Les travaux de Roberts et de son équipe (1979) ont montré la répartition du cadmium et son action sur l'activité de différents enzymes des branchies du foie et des érythrocytes chez *Salmo gairdneri* et *Salmo trutta* .

Ils ont pu constater que la concentration en cadmium trouvé dans les branchies des saumons préalablement exposés à ce métal, est approximativement 10 fois supérieure à celle observée pour un saumon non exposé et cela après 2 semaines d'exposition.

Cette différence d'accumulation s'accroît jusqu'à 50 fois, pour les deux espèces, après 3 mois d'exposition.

Des augmentations moins marquées sont également constatées pour le foie et les reins, mais proportionnellement la quantité de cadmium trouvé dans les branchies des saumons exposés est de loin supérieure aux autres organes. La branchie est ainsi le premier site de contact et d'entrée du cadmium.

Dans la deuxième partie de l'étude, l'analyse des modifications enzymatiques révèle seulement une augmentation de 31% de l'activité de la L-malate NAD⁺ oxydoréductase du foie de *Salmo gairdneri* et non de *Salmo trutta* . Ainsi, ils n'ont pu trouver de modifications ni au niveau de l'activité de la cytochrome C oxydoréductase du foie et des branchies, ni de l'activité de la D-glucose-6-phosphate oxydoréductase des érythrocytes et cela, quelque soit l'espèce.

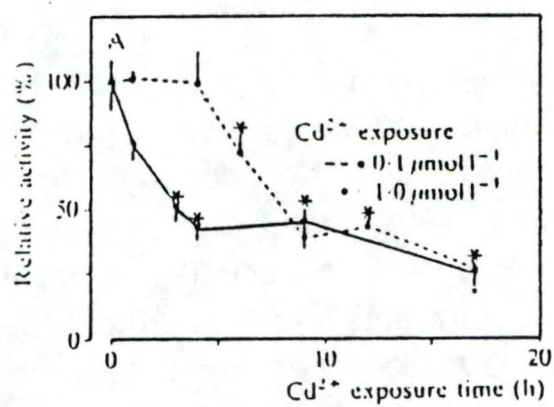


Figure 15 : Effet du cadmium sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au cours du temps chez *Salmo gairdneri* (Verbost *et al.*, 1989).

Ce manque de résultats est probablement dû aux mauvais choix des enzymes étudiés.

Parmi les premiers à faire une relation entre la toxicité du cadmium et le calcium, Roch et Maly en 1979 montrent, en eau douce, une diminution de la concentration plasmatique de calcium chez *Salmo gairdneri*.

Depuis lors, de nombreuses études ont permis d'étudier l'effet du cadmium sur les modes de prise du calcium par les branchies chez les poissons téléostéens. Il semble ainsi raisonnable de postuler que l'hypocalcémie induite par le cadmium est une conséquence directe de l'interférence de celui-ci avec le transport branchial du calcium.

Deux observations soutiennent cette hypothèse :

- l'inhibition branchiale de l'influx de cadmium chez *Salmo gairdneri* est accompagnée par une diminution de sa propre accumulation dans les cellules branchiales.

(Verbost *et al.* , 1987).

- une exposition de *Salmo gairdneri* à 0,1 μM de Cd^{++} inhibe l'influx branchial de calcium de 25% après 6 heures et de 60% après 9 heures (Verbost *et al.* , 1989). Cette inhibition de 60% est également obtenue avec 1,0 μM de Cd^{++} mais après seulement 3-4 heures d'exposition. Cette observation montre que l'effet inhibiteur du cadmium est dépendant du temps et de la concentration (figure 15).

Le cadmium peut interférer avec l'absorption du calcium à trois niveaux : la membrane apicale et ses canaux calciques (Perry *et al.* , 1988), le système tampon intracellulaire du calcium (Flick *et al.* , 1985) et la membrane basolatérale où le calcium est transloqué vers le sang par un système ATPasique à haute affinité pour le calcium (Flick *et al.* , 1985 ; Perry *et al.* , 1988) .

La première hypothèse est que le cadmium interfère avec le calcium au niveau des canaux calciques de la membrane apicale.

En fait, le cadmium suit le même chemin que le calcium. Il passe par les canaux calciques apicaux des cellules à chlorure.

L'influx tant de Cd^{++} que de Ca^{++} est chez *Salmo gairdneri* inhibé par des traitements au lanthane et à l'hypocalcine (Verbost *et al.* , 1987 ; Verbost *et al.* , 1989).

Le même auteur a démontré que l'inhibition par le cadmium de l'influx transépithélial de calcium à travers la membrane ne se fait pas directement. Cette observation indique qu'il n'y a pas de compétition significative entre les ions Ca^{++} et Cd^{++} pour leur entrée dans la cellule (Verbost *et al.* , 1987).

Conclusion partagée par Pärt (1985), chez *Salmo gairdneri* qui de plus, a démontré que des modifications de concentrations extérieures en calcium ne modifiaient pas l'accumulation de $^{109}\text{Cd}^{++}$.

La cellule à chlorure n'est donc pas capable de discriminer le calcium du cadmium ; le phénomène est probablement dû à la similarité des charges et des rayons ioniques des deux éléments.

La deuxième possibilité d'action du cadmium est l'interaction de celui-ci avec les protéines cytosoliques régulatrices du calcium tels que la calmoduline et les Ca Binding Proteins (Ca BPs).

En 1985, Suzuki et son équipe ont proposé que la formation du complexe cadmium-calmoduline est la principale cause de toxicité cellulaire du cadmium.

Des travaux postérieurs menés par Flick (1987) contredisent cette conclusion. Ils montrent en effet qu'il n'y a pas de différences d'affinité entre le calcium et le cadmium pour la calmoduline.

Pour leur part, Verbost et ses collaborateurs en 1989, observent que la concentration en cadmium dans le cytosol de *Salmo gairdneri* exposé au cadmium est inférieure au μM ; une concentration si basse exclut la liaison significative du cadmium avec la calmoduline puisque le K_m de la calmoduline pour le cadmium est de l'ordre du μM (Flick *et al.* , 1985).

Au sujet des Ca BPs, à défaut de travaux sur les poissons téléostéens, des études ont montré que les Ca BPs du rein de rat possèdent la même affinité pour le cadmium et le calcium (Richardt *et al.*, 1986).

La dernière possibilité est l'action du cadmium sur le système à haute affinité pour le calcium de la membrane basolatérale. Verbost et ses collaborateurs (1988) ont observé que l'ATPase responsable du transport dans la membrane basolatérale de *Salmo gairdneri* est extrêmement sensible à l'inhibition par le cadmium. Ils mesurent, *in vitro*, une inhibition de 50% du taux de transport calcique pour une concentration en cadmium égale à 3 nM.

Leurs analyses cinétiques montrent que le cadmium inhibe la pompe calcique via son site de liaison, celui-ci ayant une affinité pour le cadmium 100 fois supérieure à celle du calcium. Cette modification d'affinité résulte, selon Verbost, de la présence de groupes -SH dans le site de fixation du calcium.

La cellule à chlorure ne fait donc pas de discrimination pour l'absorption du cadmium mais par contre, elle réalise une distinction quant à son accumulation. L'inhibition du transport calcique survient lorsque le cadmium s'est suffisamment accumulé dans le cytoplasme alors que le calcium s'accumule dans la cellule. Verbost (1989) a remarqué toutefois une réduction de l'accumulation du calcium dans la branchie après une exposition prolongée au cadmium. Il suggère que cet effet est dû à une diminution de la perméabilité au calcium de la membrane apicale. La diminution de perméabilité touche également l'influx de cadmium lors d'une longue exposition (17 heures) alors qu'une exposition à court terme ne l'influence pas.

L'hypothèse émise par Verbost est que le cadmium fermerait les canaux calciques par augmentation de la concentration interne en calcium dans la cellule à chlorure. Le calcium reste dans les ionocytes puisque le cadmium en sort préférentiellement. La concentration intracellulaire de calcium représente ainsi un feed back pour le contrôle de son entrée.

CHAPITRE 2 : ORIENTATION DU TRAVAIL.

La smoltification est une étape transitoire que doit franchir le saumon atlantique. Cette étape permet au saumon atlantique juvénile de passer de l'eau douce à l'eau de mer où il acquiert sa maturation sexuelle.

Le processus de transformation parr-smolt est en fait, un ensemble complexe de modifications physiologiques et comportementales qui se déroule chaque année au printemps. Cet ensemble de modifications est sous le contrôle de nombreux facteurs endogènes et exogènes.

Parmi les facteurs externes, on note la forte synchronisation de la smoltification avec la photopériode et la température (Johnsson et Clark, 1988 ; Wedemeyer, 1980).

Pour les facteurs internes, la smoltification est essentiellement sous la dépendance du contrôle hormonal (Prunet et Boeuf, 1985 ; Björnsson *et al.* , 1989).

Les principales adaptations touchent la régulation du transport ionique au niveau des cellules à chlorure branchiales puisque le saumon atlantique passe d'un milieu d'eau douce hypotonique à un milieu d'eau de mer hypertonique.

Ce transport ionique est assuré au niveau des membranes plasmiques branchiales par les systèmes ATPasiques qui scindent l'ATP en ADP plus Pi et en récupèrent l'énergie pour transférer d'un côté à l'autre de la membrane plasmique, les ions.

On observe en eau douce, de manière saisonnière et avant la migration en mer, une augmentation de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique branchiale que l'on peut considérer comme étant une préadaptation à l'environnement salé (Langdon et Thorpe, 1985).

La Na⁺/K⁺ ATPase est ainsi considéré à l'heure actuelle comme un indicateur précis de la smoltification et le maximum de l'activité ATPasique permet de cerner la période où le saumon atlantique est le mieux préadapté à l'eau de mer.

La première partie de notre travail consiste à s'interroger sur le fait de savoir s' il est possible en laboratoire de simuler des conditions propices au développement du processus de smoltification chez le saumon atlantique.

Nous avons voulu voir également si parallèlement à une activité Na⁺/K⁺ ATPasique branchiale élevée préparant le saumon atlantique aux hautes concentrations marines en ion sodium, il y allait avoir une augmentation de l'activité des Ca⁺⁺ ATPases de haute et de faible affinité qui doit intervenir dans la préparation du saumon atlantique aux fortes concentrations marines de calcium.

L'effet des métaux lourds sur la physiologie des poissons et des salmonidés en particulier est strictement dépendant de leur effet sur les flux ioniques (Ca⁺⁺, Na⁺) au niveau des branchies.

Pour les salmonidés, le cadmium est un poison remarquablement toxique : une dose de 16 µg/l est létale après 5 jours pour *Salmo gairdneri* (Ball, 1967).

Plusieurs travaux ont montré les mécanismes d'action toxique du cadmium sur la physiologie de *Salmo gairdneri* (Roberts *et al.* , 1979; Roch et Maly, 1979).

Un des principaux effets du cadmium est son interférence avec les flux branchiaux transépithéliaux de calcium (Verbost *et al.* , 1987). Le cadmium agirait plus particulièrement sur la Ca⁺⁺ ATPase de haute affinité pour le calcium (Verbost, 1989).

Dans la deuxième partie de notre travail, nous voudrions mettre en évidence l'influence du cadmium sur les flux calciques branchiaux et sur l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de haute affinité des cellules branchiales.

Trouvit 1 granulé

Protéines brutes	48 %
Matières grasse	7,5 %
Hydrate de carbone	21,5 %
cellulose	3,0 %
cendres	10,0 %
humidité	10,0 %

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE.

A. Elevage.

Les saumons atlantiques âgés d'un an et ayant au moins 10 cm proviennent d'une pisciculture de Norvège et ont été transportés dès le mois de novembre dans les locaux de l'Université.

Les saumons ont été répartis dans deux types de bassins : le premier en grès d'une contenance de 200 litres et le deuxième en plastique d'une capacité de 497 litres. Les deux types de bassins ont été équipés d'aérateurs, de pompes de filtration d'eau et reliés en continu à l'eau de ville (PH = 6,66). Nous avons également déterminé par spectromètre atomique (PHILIPS, modèle PU9200X) la concentration dans l'eau de ville des ions Ca⁺⁺ (3,32 mM), Na⁺ (1,26 mM) et K⁺ (0,121 mM).

Les saumons atlantiques ont suivi de façon normale ou simulée le cycle de succession naturelle du jour et de la nuit.

Ils sont nourris quotidiennement à 4% en moyenne de leur poids corporel avec du TROUVIT 1 (voir tableau) enrichi par le service de pêche de la Région Wallonne avec de l'huile de foie de morue (80 gr/Kg de trouvit 1) et de la vitamine C (1,4 gr/Kg de trouvit 1).

Quotidiennement entre le 1 février et le 31 mai de cette année, la température et l'oxygénation des bassins sont mesurées par un oxymètre muni d'une fonction température (WTW, modèle OXI 96). Nous déterminons également le pH de l'eau au moyen d'un pH-mètre (Schott/Geräte, modèle CG 822) et le taux de CO₂ dissout en utilisant le Kit Tétra Test CO₂. La température a varié entre 7,1°C (09/02/1991) et 17,2°C (16/03/1991). De même la saturation moyenne en O₂ dissout est de 85,74% avec des extrêmes allant de 69% à 92%. Le pH moyen des bassins a été de 7,67 unités et le taux de CO₂ dissout oscillait entre 8 et 10 mg/l.

B. Prélèvement des organes.

1. Prélèvement des filaments branchiaux.

Après section de la moëlle épinière, le tête est rapidement séparée du reste du corps. De la tête, sont retirées les opercules et la mâchoire inférieure. Ainsi, sont dégagées les 4 paires d'arcs branchiaux. Chaque arc branchial est prélevé et mis dans du tampon d'homogénéisation. Les filaments branchiaux sont séparés par section de leur cartilage de soutien.

Ils sont séchés sur papier filtre et pesés, prêts pour l'homogénéisation ou la digestion.

2. Prélèvement du sang.

Après ouverture abdominale, on prélève le sang au niveau du sinus veineux avec une seringue. Le sang est transféré et pesé dans une fiole, préalablement tarée et contenant 20 μ l d'héparine (5000 unités par ml).

3. Prélèvement du foie.

Consécutivement au prélèvement du sang, le foie est séparé du tractus digestif et de la vésicule biliaire. Il est lavé avec du tampon d'homogénéisation, séché sur papier filtre, pesé et découpé en petits morceaux.

4. Prélèvement des reins.

Après avoir séparé la tête du reste du corps , celui-ci est vidé du système digestif et les reins sont séparés de leurs attaches dorsales par section . Ils sont ensuite lavés avec du tampon d'homogénéisation, séchés sur papier filtre, pesés et découpés en petits morceaux.

2. LES DOSAGES .

A. Homogénéisation des filaments branchiaux.

Les filaments branchiaux sont déposés dans un homogénéiseur en verre de type Kontès Dual (Size 23) contenant neuf volumes du tampon d'homogénéisation.

Ce tampon contient :

- | | | |
|--------------|--------|----------------------|
| - imidazole | 50mM | (Merck art 4716) |
| - saccharose | 0,25 M | (sucre de Tirlemont) |

Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'HCl N .

On homogénéise "à froid" deux fois vingt secondes (vitesse de rotation 2800 RPM) au moyen d'un piston entraîné par le moteur d'une foreuse sur laquelle est adapté le piston de l'homogénéiseur.

B. Dosage des protéines.

1. Le principe.

La méthode utilisée est dérivée de celle décrite par Lowry (1951); les protéines sont d'abord dénaturées par l'action de l'hydroxyde de sodium : elles présentent ainsi tous leurs groupements aux réactifs.

La formation d'un complexe entre le cuivre et les liaisons peptidiques d'une part et la réduction d'un complexe phosphomolybdique en un complexe phosphomolybdeux par les groupements tyrosine et tryptophane de la protéine d'autre part, engendre l'apparition d'une couleur bleue.

2. Les solutions.

- solution cuivrique contenant :

tartrate de Na/K	0,1%	(Merck art 8087)
CuSO ₄	0,05%	(Merck art 2791)
NaOH	0,5 N	(Merck art 6498)
Na ₂ CO ₃	10%	(Merck art 6392)

- réactif de Folin dilué 17 fois (UCB)

- solution étalon d'albumine sérique bovine (SAB) (Merck art 12018)
10 mg/ml dans tampon d'homogénéisation .

3. Le mode opératoire.

A chaque tube "test" contenant un échantillon et dilué de façon à obtenir 1 ml , on ajoute 1 ml de solution cuivrique.

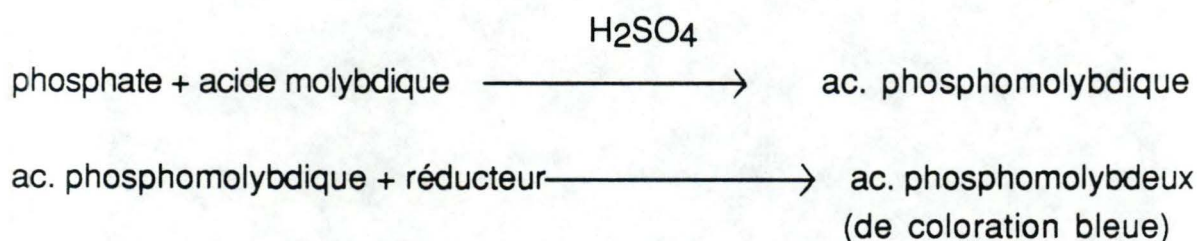
Après une incubation de 20 minutes à T° ambiante, 4 ml du réactif de Folin sont ajoutés à chaque tube toutes les 30 secondes. On laisse agir 20 minutes et on lit l'absorbance de la solution à 650 nm au spectrophotomètre (Pye Unicam SP6-550 UV-VIS).

C. Dosage des phosphatases dépendantes du Ca^{++} .

1. Le principe.

Le dosage se réalise par mesure du phosphate inorganique libéré suite à l'activité de l'ATPase (hydrolyse de l'ATP) en présence d'ATP et de calcium.

Le phosphate est dosé calorimétriquement par la méthode de Fiske et Subbarow (1925). Le principe de la réaction utilisé pour doser les ions PO_4^{3-} est le suivant :



Le réducteur est l'acide amino-naphtol sulfonique .

L'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium est déterminée par mesure de l'hydrolyse de l'ATP en présence d'oligomycine et de NaN_3 , inhibiteurs des Ca^{++} ATPase de faible affinité (Flick et al., 1985).

L'activité de la Ca^{++} ATPase de faible affinité pour le calcium est déterminée par mesure de l'hydrolyse de l'ATP en l'absence d'oligomycine et de NaN_3 . Dans ce test, l'activité calculée sera fonction à la fois des Ca^{++} ATPases de faible et de haute affinité pour le calcium. La différence entre les deux mesures nous donne l'activité de la Ca^{++} ATPase de faible affinité pour le calcium.

2. Les solutions.

1. Tris-HCL 50 mM (Janssen Chimica 16.762.78/HCL Merck art317)
NaCl 200 mM (Merck art 6404)
le pH est ajusté à 7,4.
2. Solution aqueuse de CaCl₂ 2H₂O 50 mM (Merck 2382)
3. Solution aqueuse d'ATP 50 mM (Sigma n°A 3377)
neutralisé à pH 7 avec du Tris.
4. Tampon d'homogénéisation.
5. Réactif de Fiske et Subbarow ; addition successive de :
 - H₂O bidistillée (3,3 ml)
 - solution aqueuse de molybdate de NH₄⁺ 2,5% (Merck art1182)
dans H₂SO₄ 5N (0,5 ml) (Merck art 748)
 - solution aqueuse de NaHSO₃ 15% et de Na₂SO₃ 20% (0,2 ml)
6. Etalon phosphate : solution aqueuse
de NaH₂PO₄ 0,5 mM (Merck art 6657)
7. Solution aqueuse de NaN₃ 50 mM (Merck art 822.335)
8. Oligomycine dans éthanol (1 mg/ml) (Sigma n°0.4876)

3. Mode opératoire.

Chaque tube contient : 0,5 ml de solution 1 (Tris HCl/NaCl)
100 µl de solution 2 (CaCl₂ 2H₂O)
100 µl de solution 3 (ATP)

Les tubes utilisés pour déterminer l'activité de la Ca^{++} ATPase à haute affinité contiennent en plus :

100 μl de solution 7 (NaN_3)

5 μl de solution 8 (oligomycine)

Enfin, tous les tubes contiennent également :

-l'échantillon à doser

-le tampon d'homogénéisation de façon à obtenir un volume d'incubation de 1 ml.

Après 1 heure d'incubation à 37°C , on ajoute 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 30% à chaque tube.

Après centrifugation (IEC Centra-4B centrifuge) pendant 15 minutes à 2000 RPM, on dose le phosphate sur un aliquot de 1 ml en ajoutant le réactif de Fiske et Subbarow toutes les 30 secondes.

Après 20 minutes, on lit l'absorbance à 660 nm au spectrophotomètre (Pye Unicam SP6-550 UV-VIS).

D. Dosage de la Na^+/K^+ ATPase et de la Mg^{++} ATPase .

1. Le principe.

Les deux enzymes actives hydrolysent l'ATP en ADP et pyrophosphate. La mesure de leur activité se réalise via le dosage du phosphate inorganique selon la méthode de Fiske et Subbarow (décrite pour le dosage des Ca^{++} ATPases).

L'activité de la Mg^{++} ATPase est déterminée en présence de NaCl et d'ouabaïne (inhibiteur de la Na^+/K^+ ATPase).

Dans ce test, l'activité ATPasique est due à la fois à la Na^+/K^+ et à la Mg^{++} ATPase. La différence entre les deux mesures d'activité avec ou sans ouabaïne nous donne l'activité de la Na^+/K^+ ATPase.

3. Le mode opératoire.

Les tubes sont remplis suivant le tableau ci-après (les volumes sont exprimés en ml).

	test 1	test 2	Blanc substrat	Blanc tissu
solution	-	0,5	0,5	0,5
solution 1'	0,5	-	-	-
solution 2	-	0,2	0,2	0,2
solution 3	0,2	-	-	-
solution 4	0,1	0,1	0,1	-

préincubation de 10 minutes à 37°C

échantillon	X	X	-	X
eau	0,2-X	0,2-X	0,2	0,3-X

Après une heure d'incubation à 37°C, on stoppe la réaction en ajoutant 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) 30% (Janssen Chimica 15.213.81).

Le dosage du phosphate par le réactif de Fiske et Subbarow se réalise sur un aliquot de 1 ml. Après 20 minutes, on lit l'absorbance au spectrophotomètre (Pye Unicam SPG-550 UV-VIS) à 660 nm.

La valeur de l'activité Mg⁺⁺ ATPasique est obtenue en soustrayant de la valeur d'absorbance du test 1, les valeurs d'absorbance du Blanc substrat et du Blanc tissu.

La valeur de l'activité de la Na^+/K^+ ATPasique est obtenue en soustrayant de la valeur d'absorbance du test 2, la valeur d'absorbance du test 1.

E. L'analyse statistique des résultats .

Tous les lundi du 11/03/1991 au 21/05/1991, c'est-à-dire sur une période de 11 semaines, 3 saumons sont pris aléatoirement dans l'élevage de saumons atlantiques.

Sur les branchies récoltées de ces trois saumons sont effectués en double les dosages de l'activité des Ca^{++} ATPases de haute et de faible affinité pour le calcium, de la Na^+/K^+ ATPase et de la Mg^{++} ATPase.

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances, les données ainsi récoltées sont traitées par le programme de l'analyse de la variance de l'ordinateur central du centre de calcul (VAX).

Une analyse de la variance à deux critères hiérarchisés mixtes est appliquée. Le critère fixe correspond à la semaine et le critère aléatoire hiérarchisé à la semaine correspond aux saumons atlantiques prélevés.

Il y a acceptation de l'hypothèse nulle lorsque la probabilité de se tromper est supérieure à 0,05. A l'inverse, il y a rejet de l'hypothèse nulle lorsque la probabilité de se tromper est inférieure à 0,05. A ce moment, l'hypothèse alternative est jugée significative. Si la probabilité de se tromper est inférieure à 0,01, l'hypothèse alternative est jugée hautement significative.

3. LA PRISE DU CALCIUM .

1. Le principe.

Le protocole expérimental a été imaginé à partir de celui décrit par Verboost et ses collaborateurs (1989). Ces auteurs ont observé, in vivo, sur *Salmo gairdneri* avec la méthode des traceurs radioactifs ($^{45}\text{Ca}^{++}$ et $^{109}\text{Cd}^{++}$) la modification de l'influx branchial de calcium en présence de cadmium. L'exposition de *Salmo gairdneri* à $1\ \mu\text{M}$ de cadmium pendant 1 heure inhibe jusqu'à 60% de l'influx branchial de calcium. Notre protocole expérimental permet d'étudier l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{++}$ chez *Salmo salar* smolt et non smolt au cours du temps et les effets d'une substance telle que $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$

2. Les solutions.

- | | | | |
|------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------|
| 1. solution aqueuse de | $^{45}\text{Ca}^{++}\text{Cl}_2$ | 27 $\mu\text{ci/l}$ | (Dupont NEZ 013) |
| 2. solution aqueuse de | $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ | 1 mM | (UCB 1930) |
| 3. LUMA SOLVE | | | (LUMAC n°1042) |
| 4. LIPO LUMA | | | (LUMAC n°1057) |

3. Le mode opératoire.

Deux lots de trois saumons atlantiques smolts sont placés dans deux aquariums différents contenant de l'eau de leur bassin d'élevage (2,29 mM Ca^{++}).

Les saumons du premier lot sont placés d'heure en heure dans un aquarium contenant 27 $\mu\text{ci/l}$ de $^{45}\text{Ca}^{++}\text{Cl}_2$.

Les saumons du deuxième lot sont placés d'heure en heure dans un aquarium contenant $27 \mu\text{Ci/l}$ de $^{45}\text{Ca}^{++}\text{Cl}_2$ et $1 \mu\text{mole}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ par litre.

Après 3 heures, les saumons sont repris et disséqués pour prélever le sang, les filaments branchiaux, le foie et les reins.

Chaque échantillon ($\pm 30 \text{ mg}$) est déposé après rinçage, séchage et pesée dans une fiole à scintillation puis, est digéré par addition de 1 ml de LUMA SOLVE. Chaque fiole est ensuite placée dans un bain-marie à 55°C . Après deux heures de digestion, on ajoute 5 ml de liquide scintillant (LIPO LUMA). Enfin, les fioles sont placées dans un compteur à scintillation (Beckman , modèle LS 6000IC).

L'absorption de calcium est calculée par la mesure de la radioactivité totale de l'échantillon moins un blanc propre à chaque type d'échantillon. Le taux d'inhibition de l'influx de calcium dû au cadmium exprimé en pourcent est déterminé par la différence d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ entre les deux lots de saumons. Le même protocole expérimental est appliqué aux saumons atlantiques non smolts.

4. L'analyse statistique des résultats.

Des lots de saumons atlantiques, on prélève aléatoirement 4 des 8 arcs branchiaux et un échantillon ($\pm 30 \text{ mg}$) de sang, de foie et des reins.

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances, les données sont traitées par le programme de l'analyse de la variance de l'ordinateur central du centre de calcul (VAX).

Une analyse de la variance à 3 critères de classification est appliquée à l'échantillonnage des filaments branchiaux. Cette analyse de la variance est composée de deux critères fixes et croisés qui sont l'état physiologique des saumons atlantiques (smolts ou non smolts) et de l'aquarium dans lequel les saumons ont séjourné 3 heures ($^{45}\text{Ca}^{++}$ ou $^{45}\text{Ca}^{++}$ et $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$), d'un critère aléatoire hiérarchisé aux deux autres critères qui est l'échantillonnage.

Une analyse de la variance à 2 critères de classification fixes et croisés est appliquée à l'échantillonnage du sang, du foie et des reins. Les deux critères fixes sont l'état smolt ou non smolt des saumons atlantiques et l'aquarium dans lequel ils ont séjourné.

Il y a acceptation de l'hypothèse nulle lorsque la probabilité de se tromper est supérieure à 0,05. A l'inverse, il y a rejet de l'hypothèse nulle lorsque la probabilité de se tromper est inférieure à 0,05.

A ce moment, l'hypothèse alternative est jugée significative. Si la probabilité de se tromper est inférieure à 0,01, l'hypothèse alternative est jugée hautement significative.

CHAPITRE 4 : RESULTATS.

1. MISE EN EVIDENCE DE LA SMOLTIFICATION CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE.

A. Elevage et smoltification.

Le saumon atlantique (*Salmo salar* L.) est une espèce fort exigeante tant au niveau des paramètres physico-chimiques nécessaires pour un élevage performant que pour les conditions qui permettent la mise en place de la smoltification.

Travaillant avec des saumons importés d'une pisciculture norvégienne, il était indispensable de s'interroger sur le fait de savoir si en condition de laboratoire, les saumons atlantiques de notre élevage allaient smoltifier.

Quotidiennement, nous avons suivi l'évolution des conditions d'élevage pour prévenir toutes modifications importantes de l'environnement des saumons atlantiques.

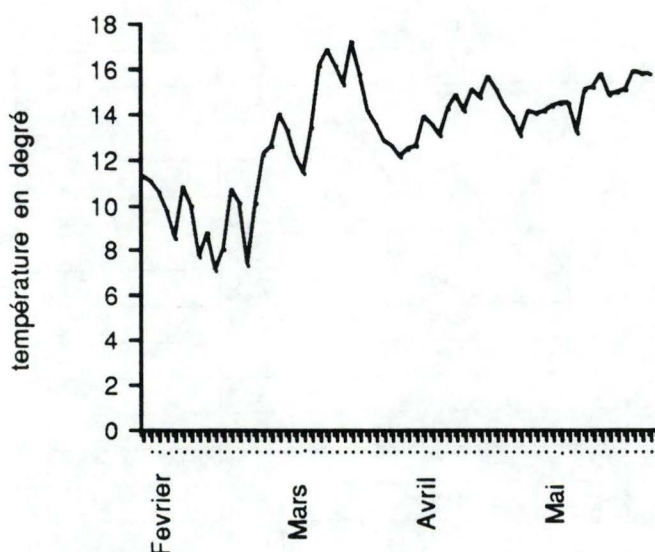
Nous avons porté notre attention principalement sur la photopériode et la température.

En effet, on sait que si l'accroissement saisonnier de la photopériode est avancé, simulant un printemps précoce, les phénomènes de smoltification sont accélérés (Johnsson et Clark, 1988).

A l'inverse, une prolongation des courtes photopériodes hivernales retarde l'apparition de saumons présentant les caractéristiques d'un smolt (Hoar, 1988).

Pour la température, on sait qu'une température trop basse retarde la smoltification, alors qu'une température trop haute inverse le processus de transformation parr-smolt (Boeuf, 1987).

Au niveau de notre élevage, la température de l'eau des bassins a évolué librement en fonction des conditions météorologiques. Cela a été possible grâce à une aération constante et l'absence de chauffage dans les pièces où ont séjourné les saumons atlantiques.



Graph 1: Evolution de la température en degré de l'eau des bassins d'élevage

On constate, dans ces conditions, que la température augmente rapidement fin février pour atteindre des valeurs supérieures à 16°C mi-mars. Après une forte baisse fin mars, la température augmente graduellement et est supérieure à 13°C en avril et en mai (graphe 1).

Pour la photopériode, les saumons atlantiques ont été soumis au cycle naturel du jour et de la nuit, cycle évoluant tout comme la température avec le printemps.

Nous avons retenu le coefficient de condition comme paramètre morphologique nous permettant de suivre la mise en place et l'évolution de la smoltification.

DATE		TAILLE(cm)	POIDS(g)
11-03	P1	14,2	29,3
	P2	12,6	22,12
	P3	13,4	26,07
18-03	P1	12,7	19,62
	P2	11,9	15,5
	P3	12,7	21,34
25-03	P1	14,2	34,5
	P2	11,9	19,17
	P3	14,2	30,23
01-04	P1	11,8	16,45
	P2	12,7	22,21
	P3	13,6	23,8
08-04	P1	12,5	15,9
	P2	12,9	17,17
	P3	14,3	27,07
15-04	P1	12,4	16,06
	P2	13,4	20,91
	P3	12,6	18,72
22-04	P1	13,3	26,65
	P2	14,2	25,52
	P3	12,4	18,24
29-04	P1	14,6	30,88
	P2	14	26,6
	P3	14,7	29,1
06-05	P1	14,9	37,01
	P2	13,9	28,05
	P3	14,3	28,63
13-05	P1	15,5	37,4
	P2	15,3	35,44
	P3	14,2	30,67
21-05	P1	13,8	26,15
	P2	13,8	27,58
	P3	14,7	30,4

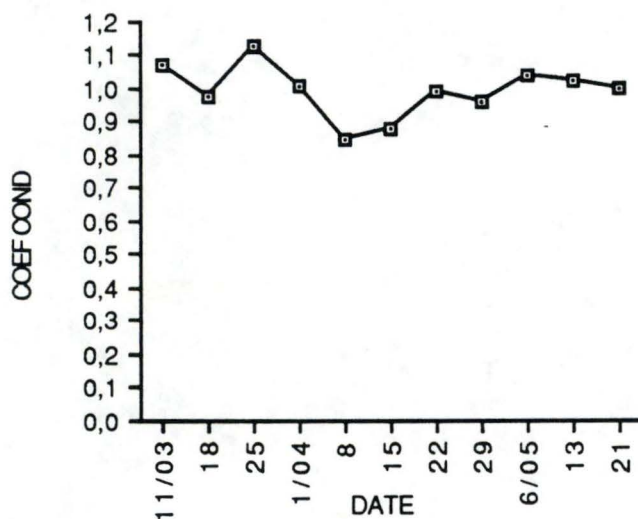
Tableau 1 : ensemble des poids et des tailles des saumons atlantiques prélevés entre le 11 mars et le 21 mai 1991 pour les différents dosages enzymatiques.

Ce coefficient, défini comme étant égal au rapport du poids par unité de longueur au cube, est fonction du poids et de la taille (Gaignon, 1988 ; Hoar, 1988). Le poids et la taille de tous les saumons atlantiques utilisés pour déterminer les coefficients de condition et les différents dosages sont reportés dans le tableau 1.

Pendant l'été précédant la période de smoltification, le coefficient de condition augmente ; le saumon fait ainsi des réserves pour l'hiver. En période hivernale, le saumon les utilise et le coefficient de condition commence alors à décroître graduellement .

Au printemps, le saumon a besoin d'un maximum d'énergie pour lancer le processus de transformation parr-smolt.

Le coefficient de condition des parr passe ainsi d'une valeur supérieure à 1 à une valeur inférieure à 0,9 : cela se traduit par une perte de poids et un accroissement de la longueur du saumon (Virtanen, 1987).



Grphe 2 : Evolution du coefficient de condition au cours du printemps 1991, chaque point représente la moyenne de 3 saumons pris aléatoirement.

Nous avons déterminé le coefficient de condition dès le 11 mars 1991. Nous constatons (graphe 2) que le coefficient de condition des saumons atlantiques de notre élevage, au cours de l'année, n'est pas constant.

On observe en effet, une forte diminution de sa valeur fin mars-début avril. En l'espace de 3 semaines, le coefficient de condition passe d'une valeur de 1,13 le 25/03/91 à une valeur de 0,846 le 08/04/91. Le coefficient de condition augmente alors progressivement mais sans plus jamais atteindre des valeurs nettement supérieures à 1.

Ces résultats pourraient laisser penser que les saumons ont utilisé entre le 25 mars et le 8 avril, intensivement leurs réserves protéiques et lipidiques pour fournir suffisamment d'énergie au lancement du processus final de transformation parr-smolt.

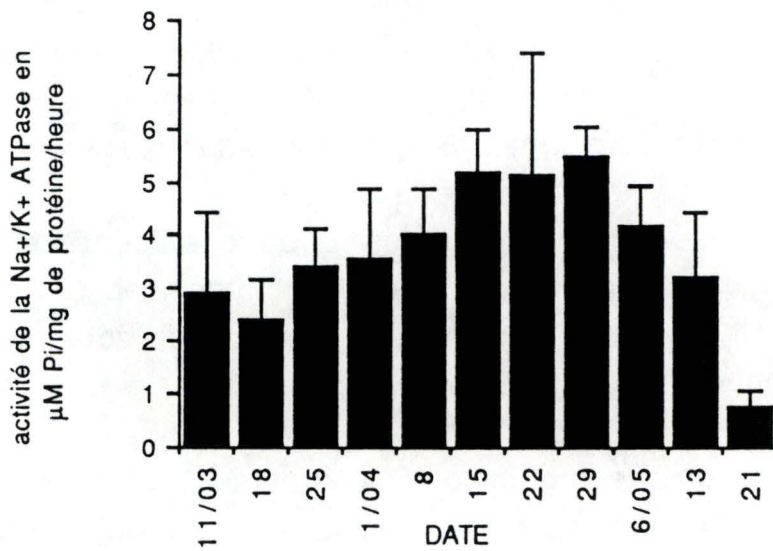
L'augmentation ultérieure et progressive du coefficient de condition pourrait s'expliquer si l'on admet que les saumons, en réponse à la demande d'énergie accrue, s'alimentent plus que de coutume, ce que nous avons effectivement observé.

Un autre paramètre morphologique largement utilisé pour "visualiser" la transformation parr-smolt est la modification de la robe du saumon atlantique.

Lors de la smoltification, le parr acquiert une coloration argentée qui correspond à l'apparition dans son derme de guanine et d'hypoxanthine (Market et Vanstone, 1966).

Ce paramètre est pris avec toutes les réserves d'usage car l'évaluation de la robe du saumon atlantique en cours de smoltification est très subjective : un saumon à la robe argentée n'étant pas nécessairement un smolt et vice versa (Boeuf, 1987).

En conclusion, l'évolution du coefficient de condition et l'apparition de la livrée argentée laissent à penser que les saumons atlantiques de notre élevage, en laboratoire, se trouvent bien dans des conditions environnementales propices à développer entre le 11 mars et le 21 mai 1991 le processus de smoltification.



Graph 3 : Evolution de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase des filaments branchiaux entre le 11 mars et le 21 mai 1991

Chaque valeur représente la moyenne de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique dosée chez trois saumons atlantiques pris aléatoirement.

Remarque : peu après l'arrivée des saumons atlantiques dans leurs bassins, nous avons été confrontés à une sursaturation en azote dans l'eau provoquant des embolies gazeuses caractérisées par une exophtalmie. Ce problème fut résolu en augmentant fortement la surface d'échange entre l'air et l'eau, ce qui a eu pour effet de "dégazer" l'eau.

B. Na⁺/K⁺ ATPase et smoltification.

Un paramètre "enzymatique" qui caractérise la transformation parr-smolt, largement utilisé dans la littérature, est la mesure de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase branchiale.

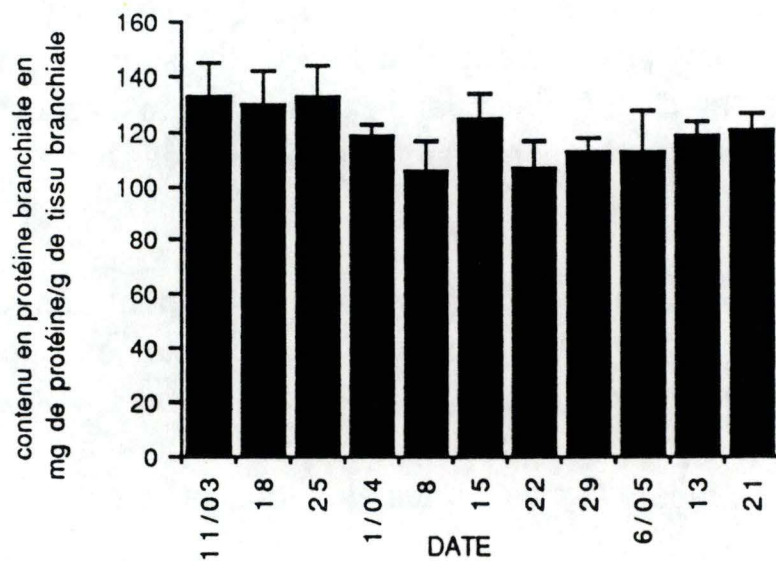
Zaugg et McLain en 1970 sont les premiers à montrer que l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique branchiale évolue au cours de la smoltification du saumon pacifique coho.

En 1979, Hootman et Philpott montrent que la Na⁺/K⁺ ATPase se situe dans le système membranaire des cellules à chlorure branchiales. L'augmentation de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase sert à anticiper les flux entrant de sodium qui se produisent lorsque le saumon atlantique arrive en eau de mer c'est-à-dire quand l'augmentation des capacités hypoosmorégulatrices du saumon atlantique est nécessaire (Boeuf, 1987).

Lorsque nous mesurons dans les homogénats de filaments branchiaux l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase (graphe 3), nous constatons que, lors de la période dite de smoltification, celle-ci augmente progressivement à partir de la semaine du 25 mars pour atteindre une valeur égale à 5,47 $\mu\text{M Pi/mg}$ de protéine/heure ; la température est alors de 15,3°C.

Ensuite, l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique décroît jusqu'au 21 mai, moment où l'activité est de 0,749 $\mu\text{M Pi/mg}$ de protéine/heure.

L'analyse statistique des résultats, faite sur un échantillonnage de 3 saumons atlantiques pris aléatoirement chaque lundi entre le 11 mars



Graphe 4 : Evolution du contenu en protéines dans les filaments branchiaux entre le 11 mars et le 21 mai 1991. Chaque valeur représente la moyenne du contenu en protéines des filaments branchiaux dosés chez trois saumons atlantiques pris aléatoirement.

et le 29 avril, indique que l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase varie en fonction du temps de façon hautement significative ($P < 0,01$).

Remarquons que les valeurs sont en accord avec les résultats présentés dans la littérature.

Ainsi, Langdon et Thorpe (1985) enregistrent dans des homogénats de filaments branchiaux chez *Salmo salar* en période de smoltification, une activité maximale de 5,26 $\mu\text{M Pi/mg}$ de protéine/heure. Ils observent également une évolution de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique similaire à la nôtre.

De plus, ils constatent que les saumons smolts qui présentent cette valeur moyenne d'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase survivent tous après 24 heures au transfert à l'eau de mer.

Pour leur part, Zaugg et ses collaborateurs (1985) observent, dans des homogénats de filaments branchiaux de saumons atlantiques smolts, des activités de la Na⁺/K⁺ ATPase différentes d'une pisciculture à l'autre.

Enfin, Cunjak et son équipe (1990) observent chez *Salmo salar* en cours de smoltification dans les estuaires canadiens, des valeurs similaires d'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase dans des homogénats de filaments branchiaux.

On peut également remarquer que la diminution du coefficient de condition s'observe en même temps que l'augmentation de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique bien que le pic d'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase ne correspond pas au minimum du coefficient de condition. Il y a entre les deux, trois semaines de différence.

Cette observation s'expliquerait si on imagine un décalage entre la mobilisation des réserves énergétiques et la production de nouvelles unités enzymatiques, celles-ci demandant un certain temps avant d'être produites.

A l'inverse de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase, le contenu en protéines dans les filaments branchiaux est plus ou moins constant (graphe 4).

Les variations ne sont pas significatives et peuvent être dues à l'échantillonnage, au dosage ou au prélèvement des filaments branchiaux plutôt qu'à un réel changement biochimique.

De plus, étant donné qu'il est difficile de retirer tout le sang contenu dans les filaments branchiaux, les protéines sanguines peuvent interférer avec le contenu réel en protéines branchiales.

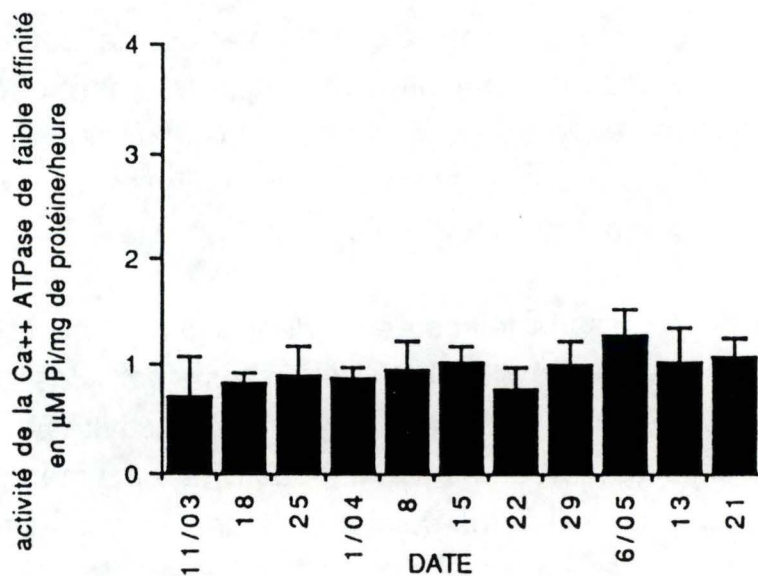
En conclusion, l'évolution de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale, décrite dans la littérature comme un paramètre déterminant pour suivre le processus de smoltification, indique que les saumons atlantiques de notre élevage ont présenté des caractéristiques de smolts et cela, dans une fenêtre incluant les trois dernières semaines du mois d'avril.

On peut donc penser que l'évolution de l'activité Na^+/K^+ ATPasique et du coefficient de condition caractérisent des saumons atlantiques qui ont smoltifié entre le 25 mars et le 29 avril 1991.

C. Ca^{++} ATPases et smoltification.

L'ion calcium est important pour le métabolisme cellulaire, du fait de sa faible concentration intracellulaire. Il joue un rôle de messenger secondaire en réponse à un stimulus extérieur à la cellule. Le calcium active ainsi des systèmes enzymatiques soit directement, soit via des molécules "intermédiaires" telle que la calmoduline.

Au niveau des poissons téléostéens, depuis que Berg (1968) a montré que le principal site de prise de calcium sont les branchies, de nombreux auteurs y ont décrit la présence d'activité ATPasique dépendante du calcium, presumant d'une activité enzymatique dans le transport actif transépithélial du calcium. Dans le pool hétérogène de phosphatases dépendantes du calcium présentes dans les membranes plasmiques branchiales, différents auteurs ont montré l'importance dans la prise du calcium de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium (Flik *et al.* , 1985 ; Perry *et al.* , 1988).



Graphe 5 : Evolution de l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de faible affinité des filaments branchiaux entre le 11 mars et le 21 mai 1991.

Chaque valeur représente la moyenne de l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de faible affinité dosée chez trois saumons atlantiques pris aléatoirement.

A l'inverse, la Ca^{++} ATPase de faible affinité ne semble pas, du fait de son KM apparent élevé comparé à la concentration en Ca^{++} intracellulaire fort basse, être responsable de l'expulsion des ions Ca^{++} du cytosol des cellules branchiales (Flik *et al.* , 1985).

Si l'importance de la Ca^{++} ATPase de haute affinité dans les flux branchiaux transépithéliaux est assez bien connue, en revanche peu de travaux sont consacrés à l'évolution au cours du temps de cette Ca^{++} ATPase chez le genre *Salmo* .

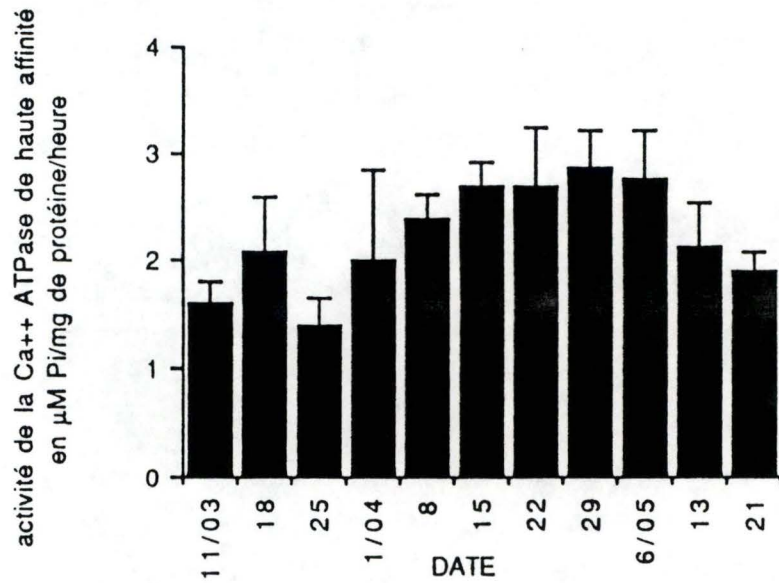
Ainsi, il nous a semblé intéressant de voir si, au niveau d'une espèce migratrice de salmonidé, et en dissociant l'activité Ca^{++} ATPasique "de haute affinité" et celle "de faible affinité", l'activité de ces Ca^{++} ATPases varie pendant la période de smoltification.

Après avoir mesuré l'activité de la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase sur des homogénats de filaments branchiaux , nous avons dosé l'activité des Ca^{++} ATPases de haute et de faible affinité sur ces mêmes homogénats par mesure du phosphate inorganique libéré suite à l'activité de l'ATPase en présence d'ATP et de calcium (MATÉRIELS et MÉTHODES §2. C).

Rappelons que les activités Ca^{++} ATPasique de haute et de basse affinité sont déterminées en partant du principe que l'oligomycine et l'azide de sodium sont inhibiteurs des Ca^{++} ATPases de faible affinité (Flik *et al.* , 1985).

Les analyses statistiques de l'évolution de l'activité des Ca^{++} ATPases de haute et de faible affinité ont été faites sur le même échantillonnage de trois saumons atlantiques pris aléatoirement chaque lundi entre le 11 mars et le 29 avril. Cet échantillonnage est identique à celui utilisé pour l'analyse statistique de l'évolution de la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase.

Nous observons que l'activité de la Ca^{++} ATPase de faible affinité (graphe 5) fluctue de façon aléatoire entre le 11 mars et le 21 mai :



Grappe 6 : Evolution de l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de haute affinité des filaments branchiaux entre le 11 mars et le 21 mai 1991. Chaque valeur représente la moyenne de l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de haute affinité dosée chez trois saumons atlantiques pris aléatoirement.

Si nous mesurons l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium (graphe 6), on constate que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité est deux à trois fois supérieure à l'activité de la Ca^{++} ATPase de faible affinité pour le calcium.

L'analyse statistique révèle que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité varie de façon hautement significative ($P < 0,01$) en fonction du temps.

On remarque aussi que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité présente un pic d'activité ($2,87 \mu\text{M Pi/mg}$ de protéine /heure) la semaine du 29 avril, date où l'activité $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPasique est optimale.

Enfin, on constate que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium diminue graduellement après le 29 avril : le même phénomène était observé pour l'activité de la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase.

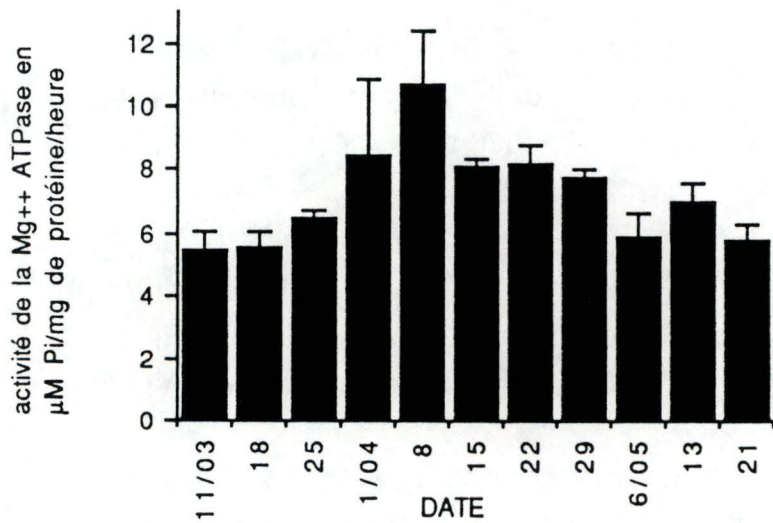
Ces observations mettent en évidence que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité évolue de façon comparable à l'activité $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPasique.

Une hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium :

Lors de l'entrée en mer du saumon atlantique, la différence par rapport à l'eau douce entre les concentrations intra- et extracellulaires va s'accroître.

Cette différence de concentration va provoquer un influx massif d'ions calcium vers le cytoplasme des cellules branchiales du saumon. Ces ions, passant par les canaux calciques de la membrane apicale, doivent être transférés vers le sang pour éviter trop d'interférences avec les processus biochimiques calcium-dépendant de la cellule.

Ce transfert se fait grâce au système ATPasique à haute affinité pour le calcium. Une fois dans le sang, le calcium peut être éliminé par un passage passif à travers les jonctions entre les cellules branchiales.



Grphe 7 : Evolution de l'activité de la Mg⁺⁺ ATPase des filaments branchiaux entre le 11 mars et le 21 mai 1991. Chaque valeur représente la moyenne de l'activité de la Mg⁺⁺ ATPase dosée chez trois saumons atlantiques pris aléatoirement

L'augmentation de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium permettrait de prévenir l'influx branchial de calcium en eau de mer en période de smoltification.

D. Evolution de l'activité de la Mg^{++} ATPase.

Nous avons également déterminé (MATERIELS et METHODES § 2. D) l'activité de la Mg^{++} ATPase au cours du temps (graphe 7). Ces dosages ont été réalisés sur les mêmes homogénats de filaments branchiaux que ceux utilisés pour déterminer l'activité de la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase. Le modèle de l'analyse statistique est le même que celui employé pour étudier l'évolution de l'activité $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ - et Ca^{++} ATPasique.

L'activité Mg^{++} ATPasique montre un pic d'activité le 8 avril, moment où nous observons la valeur minimale du coefficient de condition. L'analyse statistique confirme bien que l'activité de la Mg^{++} ATPase varie au cours de la période étudiée et de façon hautement significative.

Cette évolution est peut être liée à une augmentation de l'activité de la Mg^{++} ATPase mitochondriale au premier stade de la smoltification lorsque le coefficient de condition diminue. On sait que pendant la smoltification, il y a un accroissement du nombre de cellules à chlorure riches en mitochondries. L'augmentation de l'activité de la Mg^{++} ATPase traduirait ainsi une augmentation du métabolisme oxydatif.

L'évolution de l'activité de la Mg^{++} ATPase suit la diminution du coefficient de condition ; elle n'est toutefois pas parallèle à l'évolution de l'activité de la Ca^{++} ATPase de faible affinité pour le calcium.

2. INFLUENCE DU CADMIUM SUR LA PRISE DE CALCIUM CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE SMOLT ET NON SMOLT.

Depuis que Berg (1968) a montré que le premier site de prise de calcium est la branchie et que Roch et Maly (1979) ont constaté une diminution chez *Salmo gairdneri* du taux de calcium sanguin après une exposition au cadmium, de nombreux travaux ont pu décrire l'interférence du cadmium sur les flux branchiaux de calcium (Verbost *et al.* , 1987 ; 1988 ; 1989).

Ces travaux montrent que l'inhibition de l'influx branchial de calcium dépend de la concentration et du temps d'exposition au cadmium. Ainsi, le taux d'inhibition de l'influx branchial calcique est ainsi de 25% après 6 heures et de 60% après 9 heures d'exposition à 0,1 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, alors qu'un taux d'inhibition de 25% après 1 heure et de 60% après 3 heures est observé lors d'une exposition à 1 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

Ces mêmes travaux montrent enfin que l'action inhibitrice du Cd^{++} est, notamment, la conséquence de l'effet de cet ion sur les Ca^{++} ATPases de haute affinité

Aucun travail n'est consacré à l'influence du cadmium sur la prise du calcium par les branchies chez une espèce en cours de smoltification. Nous avons élaboré un set expérimental pour mettre en évidence un effet du cadmium sur la prise branchiale du calcium chez le saumon atlantique smolt et non-smolt.

Nous avons choisi deux lots de 6 saumons atlantiques smolts et non-smolts en utilisant le critère du coefficient de condition comme indicateur de smoltification (tableau 2). Le coefficient de condition (déterminé par le rapport du poids par unité de longueur au cube) est retenu à défaut de pouvoir doser "in vivo" l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, indicateur largement utilisé dans la littérature pour déterminer l'état de smoltification des saumons atlantiques.

Toutes les expériences de ce set ont été réalisées entre le 25 avril et le 9 mai, le choix de cette période ayant été déterminée par

l'évolution de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase et de la Ca^{++} ATPase de haute affinité mesurée à cette période.

TABLEAU 2 : coefficients de condition des saumons atlantiques smolts et non-smolts utilisés pour mettre en évidence l'influence de l'ion Cd^{++} sur la prise branchiale de $^{45}\text{Ca}^{++}$.

<u>SMOLT :</u>	<u>NON-SMOLT :</u>
0,789	1,13
0,799	1,23
0,863	1,49
0,848	1,22
0,773	1,13
0,827	1,00

Dans chaque lot, 3 saumons atlantiques sont placés dans un aquarium rempli d'eau d'élevage (2,29 mM de Ca^{++}) et contenant soit du $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 1 μM et du $^{45}\text{CaCl}_2$ 27 $\mu\text{Ci/l}$, soit seulement du $^{45}\text{CaCl}_2$ 27 $\mu\text{Ci/l}$.

Après 3 heures, les saumons sont repris et disséqués pour prélever les filaments branchiaux, le sang, le foie et les reins.

Une analyse statistique à trois critères de classification est appliquée aux résultats d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans les filaments branchiaux et est basée sur l'échantillonnage de filaments branchiaux des 6 saumons atlantiques smolts et non-smolts.

Une analyse statistique à deux critères de classification est, elle, appliquée aux résultats d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans le sang, le foie et les reins et est basée sur un échantillon de chaque organe des 6 saumons atlantiques smolts et non-smolts.

Les résultats de l'expérience décrits dans les deux tableaux suivants permettent de comparer la prise de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au niveau des branchies, du sang, du foie et des reins.

TABLEAU 3 : Effet de $1\ \mu\text{M}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans les filaments branchiaux, le sang, le foie et les reins du saumon atlantique SMOLT.

	Aquarium avec $1\ \mu\text{M}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	Aquarium sans $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	% d'inhibition de la prise de calcium
filaments branchiaux	12554 (± 1354)	39722 (± 3611)	68,4
sang	1809 (± 421)	6503 (± 2508)	71,1
foie	2123 (± 356)	4313 (± 1254)	50,7
reins	741 (± 500)	261 (± 579)	41,2

tableau 3. : Les valeurs sont exprimées en nombre de coups par minute (CPM)/gr de tissu.

La radioactivité spécifique est de 43 CPM/nM de Ca^{++} .

Pour les filaments branchiaux, chaque valeur correspond à la moyenne de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ de 12 échantillons provenant de 3 saumons atlantiques.

Pour le sang, les reins et le foie, chaque valeur correspond à la moyenne d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ de 3 saumons atlantiques.

Entre parenthèse, est indiqué l'écart-type de chaque valeur.

TABLEAU 4 : Effet de 1 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans les filaments branchiaux, le sang, le foie et les reins du saumon atlantique NON-SMOLT.

	Aquarium avec 1 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	Aquarium sans $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	% d'inhibition de la prise de calcium
filaments branchiaux	13089 (± 1340)	39115 (± 5099)	66,5
sang	1420 (± 202)	5932 (± 921)	76,0
foie	1606 (± 335)	2840 (± 1254)	43,4
reins	350 (± 233)	2516 (± 448)	86,0

tableau 4 : Les valeurs sont exprimées en nombre de coups par minute (CPM)/gr de tissu.

La radioactivité spécifique est de 43 CPM/nM de Ca^{++} .

Pour les filaments branchiaux, chaque valeur correspond à la moyenne de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ de 12 échantillons provenant de 3 saumons atlantiques.

Pour le sang, les reins et le foie, chaque valeur correspond à la moyenne d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ de 3 saumons atlantiques.

Entre parenthèse, est indiqué l'écart-type de chaque valeur.

Nous pouvons constater (tableau 3 et 4) que la prise de calcium en l'absence de Cd^{++} est plus importante dans les filaments branchiaux que dans tous les autres organes prélevés. Cette observation supporte l'hypothèse de Berg (1968) et de Perry (1988) qui indique que les branchies sont le premier site de prise de calcium chez le poisson téléostéen.

Le sang est ensuite le deuxième lieu d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$: on peut penser que les ions Ca^{++} expulsés des cellules branchiales

transiteraient par le sang avant de sortir vers le milieu extérieur via les jonctions intercellulaires.

Le sang irriguant le corps du saumon, nous observons la présence de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans le foie et les reins.

Nos résultats indiquent également que l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au niveau des organes prélevés n'est pas différente entre les saumons smolts et les non-smolts.

Si nous examinons l'influence du Cd^{++} sur la prise de $^{45}\text{Ca}^{++}$, nous avons mis en évidence, dans les différents organes prélevés, une inhibition par le cadmium de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ aussi bien chez les smolts et les non-smolts.

Les analyses statistiques des résultats confirment l'effet du Cd^{++} sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$. Les résultats d'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ observés pour le sang, le foie et les reins doivent toutefois être pris avec réserve du fait du faible échantillonnage effectué.

Remarquons que les pourcentages d'inhibition de la prise de calcium par le cadmium, observés dans ce set expérimental au niveau des filaments branchiaux sont comparables aux pourcentages d'inhibition de l'accumulation de calcium par le cadmium observés dans un set expérimental similaire au nôtre (Verbost, 1989).

Enfin, nous ne pouvons pas mettre en évidence de différences significatives entre le pourcentage d'inhibition de la prise branchiale de $^{45}\text{Ca}^{++}$ chez les saumons atlantiques smolts (68,4%) et non-smolts (66,5%).

De plus, l'analyse statistique montre que l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au niveau des branchies, du sang et du foie n'est pas différente entre smolts et non-smolts que nous plaçons ou non du $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

A l'inverse, il semble que le pourcentage d'inhibition par le cadmium de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ au niveau des reins est différent entre les smolts et les non-smolts.

L'analyse statistique de ces résultats montre que les saumons atlantiques smolts et non-smolts n'accumulent pas de la même façon le $^{45}\text{Ca}^{++}$ d'un aquarium à un autre.

Rappelons que la concentration en calcium présent dans les aquariums est de 2,29 mM et la concentration en $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ est elle, de 1 μM .

On constate pourtant un pourcentage d'inhibition de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ dans les filaments branchiaux de plus de 65%.

Une modification de l'influx calcique par une compétition entre le calcium et le cadmium lors de leur entrée dans les cellules branchiales pour expliquer l'effet inhibiteur est peu probable.

Nous pensons plus à un effet du Cd^{++} sur la Ca^{++} ATPase de haute affinité ou sur le métabolisme cellulaire qui inhiberait alors le transport calcique.

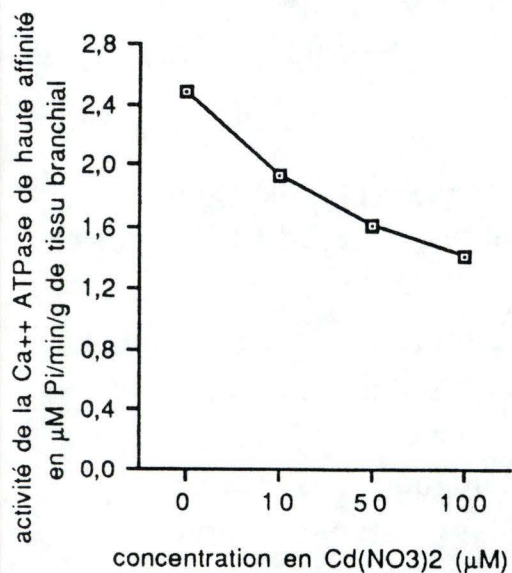
Nos résultats montrent que le cadmium agit sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ des différents organes prélevés de *Salmo salar*. Mais cette inhibition de l'influx calcique est indépendante de l'état smolt ou non-smolt du saumon atlantique.

3. INFLUENCE DU CADMIUM SUR L'ACTIVITE DES Ca^{++} ATPases.

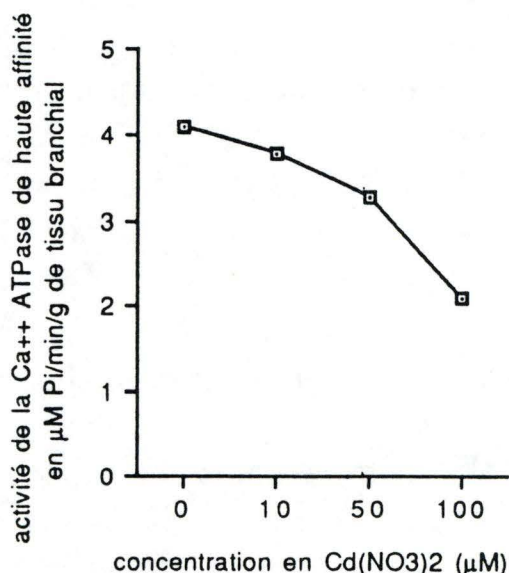
L'influence de l'ion Cd^{++} sur l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pourrait expliquer l'inhibition de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$. Nous avons mis au point un set expérimental qui permet de mettre en évidence l'effet du Cd^{++} sur la Ca^{++} ATPase de haute affinité.

Nous avons déterminé l'effet du cadmium sur l'activité des Ca^{++} ATPases de haute et de faible affinité en utilisant un homogénat de filaments branchiaux de saumons atlantiques smolts et non-smolts. Une activité Na^+/K^+ ATPasique élevée combinée avec une activité Ca^{++} ATPasique de haute affinité élevée indiquent que le saumon atlantique est en période de smoltification.

Graphe 8

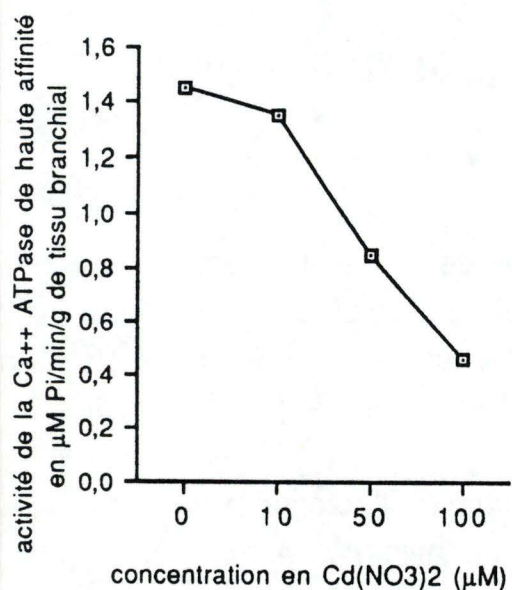


Graphe 9

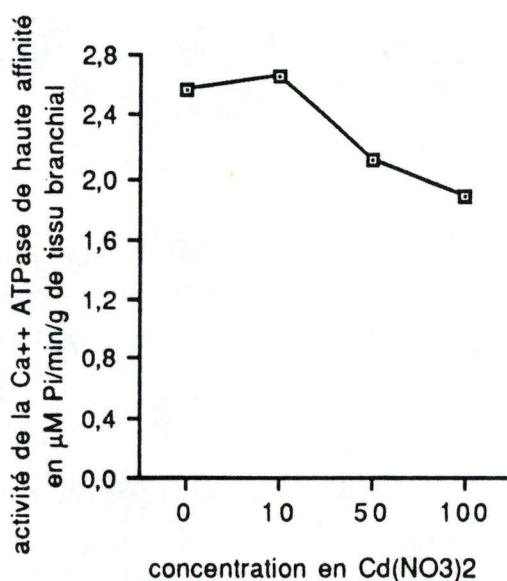


Graphes 8 et 9 : Inhibition par des concentrations croissantes de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité chez le saumon atlantique SMOLT pour une concentration finale en calcium de 0,5mM pour le graphe 8 et de 5mM pour le graphe 9.

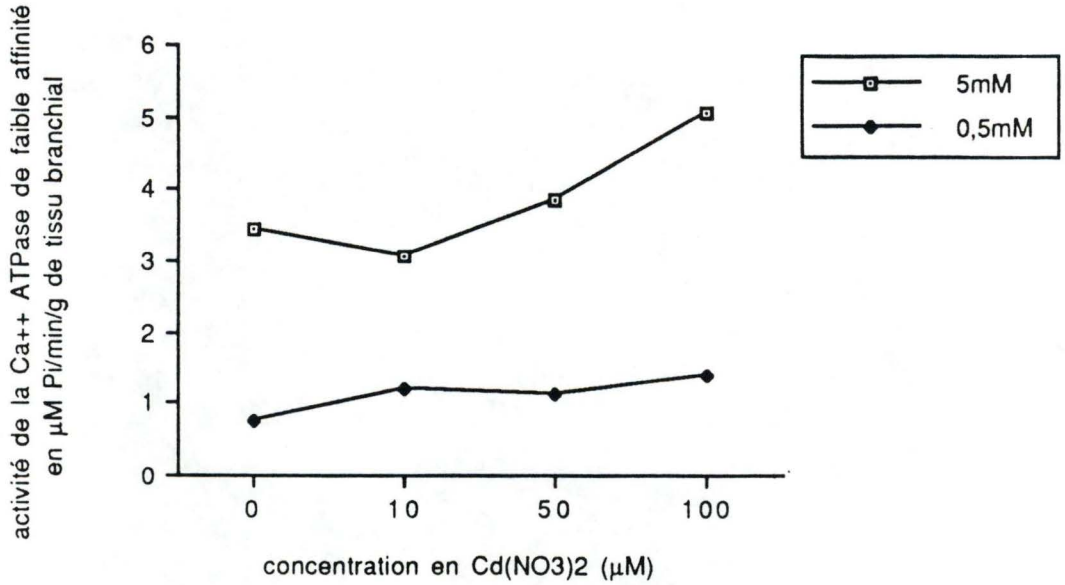
Graphe 10



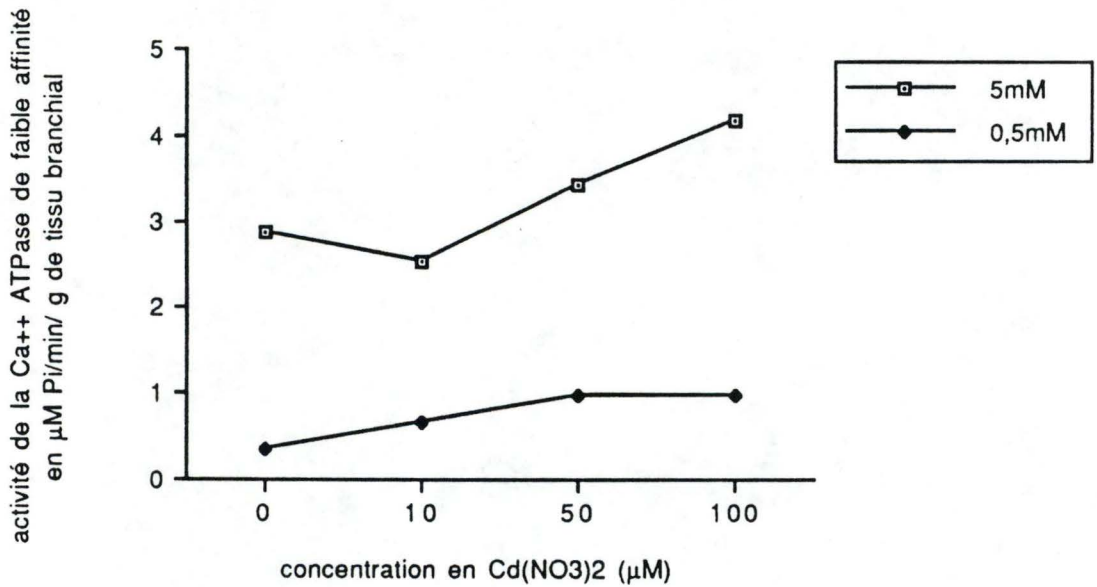
Graphe 11



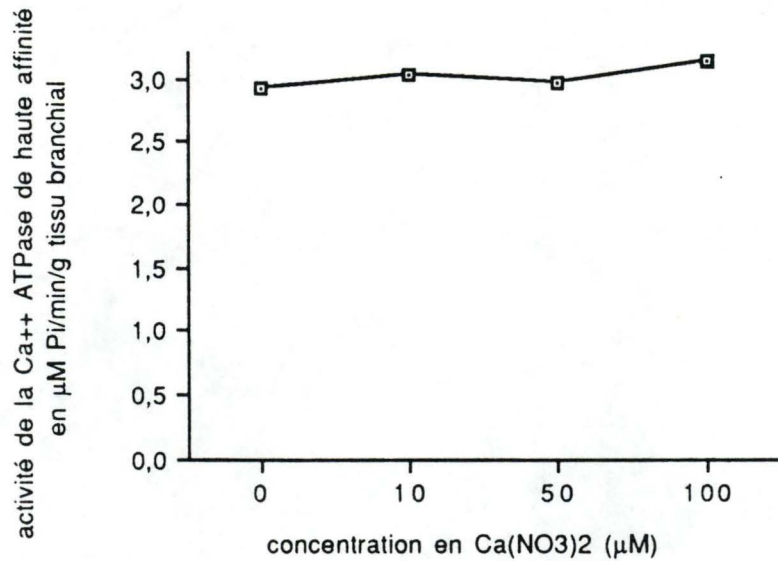
Graphes 10 et 11 : Inhibition par des concentrations croissantes de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité chez le saumon atlantique NON-SMOLT pour une concentration finale en calcium de 0,5mM pour le graphe 10 et de 5mM pour le graphe 11.



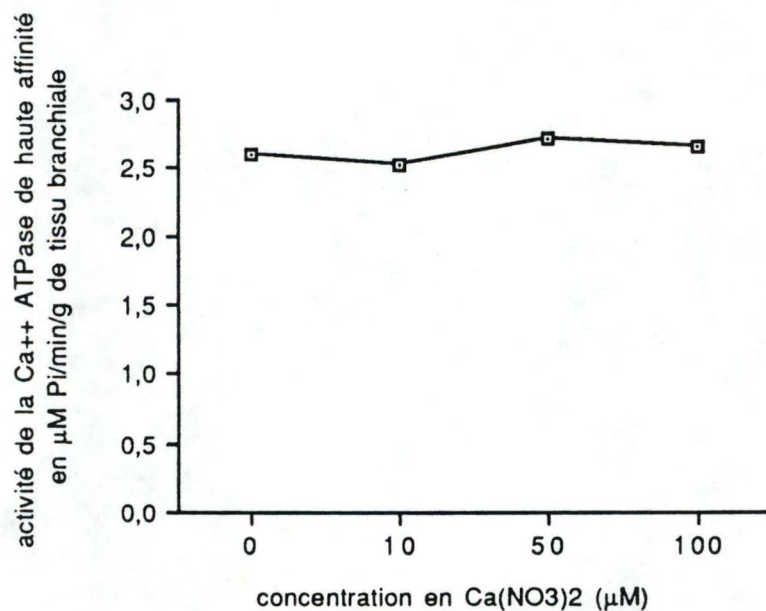
Graphe 12 : Activation par des concentrations croissantes de Cd(NO₃)₂ de l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de faible affinité chez le saumon atlantique SMOLT pour une concentration finale en calcium de 0,5 ou 5 mM.



Graphe 13 : Activation par des concentrations croissantes de Cd(NO₃)₂ de l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase de faible affinité chez le saumon atlantique NON-SMOLT pour une concentration finale en calcium de 0,5 ou 5 mM.



Grphe 14 : Influence de concentrations croissantes de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sur l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité chez le saumon atlantique SMOLT pour une concentration finale en calcium de 0,5mM.



Grphe 15 : Influence de concentrations croissantes de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sur l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité chez le saumon atlantique NON-SMOLT pour une concentration finale en calcium de 0,5mM.

A l'inverse, la faible activité de la Na^+/K^+ ATPase et de la Ca^{++} ATPase de haute affinité indique que le saumon est resté à l'état de parr.

La mesure de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase détermine l'état physiologique du saumon. Les saumons avec une activité Na^+/K^+ ATPasique supérieure à $5 \mu\text{M Pi/mg}$ de protéine/heure sont considérés comme smolts, à l'inverse des saumons ayant une activité inférieure à $1 \mu\text{M Pi/mg}$ de protéine/heure sont considérés eux, comme parrs.

Lorsque nous mesurons l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité sur un homogénat de filaments branchiaux de saumon, nous constatons que le cadmium inhibe l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium pour une concentration finale en calcium de $0,5\text{mM}$ chez les saumons smolts (graphe 8). Le même effet est obtenu si la concentration finale en calcium est de 5mM (graphe 9).

Cette inhibition de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité est mise en évidence si les saumons sont non-smolts (graphe 10 et 11). Remarquons que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité est plus élevée, en l'absence de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, chez le saumon atlantique smolt que chez le saumon atlantique non-smolt.

Nous avons également observé que pour les saumons smolts (graphe 12) et non-smolts (graphe 13), le cadmium pourrait augmenter l'activité de la Ca^{++} ATPase de faible affinité pour une concentration finale en calcium de $0,5 \text{mM}$ ou 5mM .

Si nous remplaçons le $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ par du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (graphe 14 et 15), on n'observe plus de diminution de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité : ce qui indique que l'effet inhibiteur sur l'activité ATPasique est cadmium-dépendant et non dépendant de la présence de NO_3^- dans le test.

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.

La smoltification est une étape importante dans la vie des salmonidés migrateurs tel que le saumon atlantique *Salmo salar* L. . Cette étape permet aux saumons atlantiques juvéniles (ou parr) de migrer au printemps de l'eau douce à l'eau de mer afin d'acquérir sa maturation sexuelle.

Plus tard, les saumons atlantiques feront la migration inverse pour aller se reproduire dans les rivières d'origine.

La transformation parr-smolt est un ensemble de profondes modifications qui explique que le parr s'adapte en eau douce à sa future vie marine. Il subit ainsi au cours de la smoltification plusieurs types de modifications.

Morphologiques d'abord, le saumon atlantique acquiert pendant la smoltification une livrée argentée due à l'apparition de purines au niveau de son derme (Market et Vanstone, 1966).

Son coefficient de condition, qui représente le rapport du poids par unité de longueur au cube, diminue jusqu'à une valeur inférieure à 0,9 (Gaignon, 1988)

Biochimiques ensuite, où le métabolisme oxydatif augmente (Baraduc et Fontaine, 1955). On constate, par exemple, une augmentation du taux de glucose sanguin parallèlement à une diminution du glycogène hépatique et une modification de la teneur en lipides corporels totaux tant quantitativement que qualitativement (Sheridan, 1985 ; Virtanen, 1987).

Mais, les principales modifications touchent la régulation de la balance ionique. En effet, le saumon doit migrer d'un milieu en eau douce hypotonique à un milieu en eau de mer hypertonique. Il doit donc mettre en place divers systèmes d'osmorégulations pour garder son homéostasie.

Le principal lieu des échanges ioniques, de part son contact direct avec le milieu extérieur, est la branchie.

Le transport ionique est notamment assuré au niveau des membranes plasmiques branchiales par les systèmes ATPasiques qui scindent l'ATP en ADP plus Pi et en récupèrent l'énergie pour transférer d'un côté à l'autre de la membrane plasmique, les ions.

Zaugg et McLain en 1970 ont été les premiers à montrer une modification de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase chez le saumon pacifique en cours de smoltification. Cet enzyme se trouve principalement dans les membranes du système tubulaire des cellules à chlorure. Ces cellules subissent d'ailleurs, au cours de la smoltification de nombreuses modifications telles qu'une augmentation de leur nombre et une augmentation de la surface de leur système tubulaire marqués par l'accroissement de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase (Pisam et al, 1988).

On observe ainsi en eau douce, de manière saisonnière, avant la migration en mer, une augmentation de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique branchiale que l'on peut considérer comme étant le reflet d'une augmentation des capacités hypoosmorégulatrices (Langdon et Thorpe, 1985).

Ces modifications sont contrôlées par un ensemble de paramètres externes et internes. Aux nombres des facteurs externes, on compte la température et la photopériode.

Par une augmentation printannière, la température et la photopériode synchronisent le processus de transformation parr-smolt.

En effet, une longueur de jour de 14,5 heures en janvier, simulant ainsi des conditions printannières, accélère le processus de smoltification chez *Salmo gairdneri* (Johnsson et Clark, 1988).

De même, l'âge des smolts est fonction du nombre de jours où la température atteint ou dépasse 7°C.

Ainsi, plus le climat est tempéré et plus l'élévation de la température au printemps est forte, plus tôt les saumons atlantiques smoltifieront (Symons, 1979)

Pour les paramètres internes, on tient essentiellement compte d'interactions hormonales complexes et difficiles à discerner.

Depuis que Berg (1968) a montré que la branchie est le premier site de prise du calcium chez les poissons téléostéens, de nombreux travaux ont étudié le flux de calcium au niveau des branchies. Des travaux de Flik (1984) a montré une relation entre l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium et l'activité de la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase dans les membranes plasmiques branchiales de l'anguille *Anguilla rostrata*, suggérant que le transport ATPasique du calcium est également localisé dans le système membranaire des cellules à chlorure.

Perry (1988) a lui, observé une activité Ca^{++} ATPasique de haute affinité, au niveau des membranes basolatérales des cellules à chlorure, responsables du transport actif des ions calcium du cytosol vers le sang.

Verbost (1988) a mis en évidence que ce transport était inhibé par la présence de Cd^{++} .

Le cadmium fait partie de la famille des métaux lourds. Ceux-ci agissent sur la physiologie générale des poissons et plus particulièrement, sur les flux ioniques au niveau des branchies. Dans la nature, la concentration en cadmium est inférieure au $\mu\text{g/l}$. Elle n'interfère donc pas avec les flux ioniques mais des concentrations plus élevées, parfois supérieures à $10 \mu\text{g/l}$, sont trouvées dans les eaux polluées.

Ainsi, le cadmium est pour les salmonidés un poison remarquablement toxique : une dose de $16 \mu\text{g/l}$ est létale après 5 jours pour *Salmo gairdneri* (Ball, 1967).

Dans un premier temps, notre travail visait à montrer si en "laboratoire", il était possible de simuler des conditions favorables à la smoltification. Pour ce faire, il nous a fallu contrôler un ensemble de paramètres extérieurs. Nous avons dû suivre quotidiennement, au cours de la période de transformation parr-smolt, l'évolution de la température et de la photopériode : la température des bassins devant augmenter et la photopériode s'accroître.

De même, nous avons porté une attention toute particulière aux conditions physico-chimiques de notre élevage pour prévenir toutes

modifications importantes de l'environnement des saumons atlantiques qui nuiraient à leur processus de smoltification.

Pour mettre en évidence des conditions d'élevage propices à l'obtention de saumons atlantiques smolts, nous nous sommes appuyés sur deux indicateurs de smoltification largement utilisés : le coefficient de condition, d'une part et l'activité Na^+/K^+ ATPasique branchiale, d'autre part.

Le premier indicateur qui représente le rapport du poids par la longueur, diminue lors de la smoltification jusqu'à une valeur inférieure à 0,9 (Gaignon, 1988). L'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale augmente avant la migration en mer (Boeuf, 1987).

L'évolution du coefficient de condition au cours de la période étudiée a marqué une nette diminution entre fin mars et début avril. En l'espace de trois semaines, le coefficient de condition est passé d'une valeur de 1,13 à une valeur de 0,846.

On a remarqué également que l'activité de la Na^+/K^+ ATPase évolue entre le 11 mars et le 21 mai 1991. L'activité Na^+/K^+ ATPasique a augmenté à partir du 25 mars pour arriver à une valeur maximale le 29 avril de $5,47 \mu\text{M Pi/mg}$ de protéine/heure.

Nous pensons que vu l'évolution des deux paramètres choisis, le coefficient de condition et l'activité Na^+/K^+ ATPasique branchiale, nos conditions environnementales sont favorables à la mise en place de la transformation parr-smolt chez les saumons atlantiques de notre élevage en laboratoire dans une période comprise entre le 25 mars et le 29 avril.

Nous avons constaté que l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité a suivi l'activité de la Na^+/K^+ ATPase ; de plus, leur maximum d'activité respectif est mesuré la même semaine. Puisque les activités Na^+/K^+ ATPasique et Ca^{++} ATPasique de haute affinité augmentent et que les deux enzymes sont présents au niveau des membranes plasmiques des cellules à chlorure, nous pensons que l'augmentation de l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité est

comme l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, un indicateur de la smoltification chez *Salmo salar*.

Elle traduirait une préadaptation en eau douce du saumon atlantique aux concentrations marines élevées en calcium.

Nous avons pu mettre également en évidence que les concentrations de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ont un effet inhibiteur sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ principalement au niveau des branchies et sur l'activité branchiale de la Ca^{++} ATPase de haute affinité pour le calcium. La concentration artificielle de 100 $\mu\text{g/l}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, lors du set expérimental in vivo de l'inhibition de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ par le cadmium a été choisie pour des raisons pratiques. L'utilisation, par exemple, de 10 $\mu\text{g/l}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, concentration en cadmium que l'on peut retrouver dans certaines eaux polluées, aurait montré les mêmes effets inhibiteurs mais après une durée d'exposition plus longue (Verbost, 1989).

Nous n'avons pas pu observer par contre une influence différente du $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ sur l'inhibition des flux calciques branchiaux entre les saumons atlantiques smolts et non-smolts.

Enfin, les résultats obtenus pour l'influence du $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ sur l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{++}$ et sur l'activité de la Ca^{++} ATPase de haute affinité soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition du cadmium sur les flux calciques est liée à une action de celui-ci sur le transport actif du calcium dépendant de la Ca^{++} ATPase de haute affinité à travers la membrane basolatérale branchiale.

Nous avons observé que l'activité Ca^{++} ATPasique de haute affinité est inhibée par la présence de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ identiquement chez les saumons atlantiques smolts et non-smolts. Cette inhibition du flux calcique branchial pourrait avoir comme conséquence une modification des concentrations intracellulaires branchiales de Ca^{++} .

Il serait intéressant de voir si cette modification de concentration intracellulaire de calcium ne pourrait pas interférer de façon différente avec le métabolisme cellulaire des saumons atlantiques smolts et non-smolts

La physiologie des saumons atlantiques smolts et non-smolts étant différente, on constate, par exemple, une modification du nombre et du métabolisme oxydatif des mitochondries des cellules à chlorure au cours de la smoltification. On peut imaginer qu'une augmentation de la concentration en ions calcium dans les cellules à chlorure pourrait influencer l'ensemble des réactions enzymatiques calcium dépendante.

Un projet de recherche serait d'étudier chez le saumon atlantique les modifications de la concentration intracellulaire branchiale de l'ion calcium après un inhibition par du Cd^{++} de la Ca^{++} ATPase de haute affinité et de voir par la suite s' il y a des effets sur le métabolisme

On pourrait également en séparant les membranes apicales des membranes basolatérales mettre en évidence les effets du cadmium sur le transport calcique propre à chaque membrane, voir comment le cadmium peut agir sur le transport calcique au niveau des canaux calciques de la membrane apicale.

CHAPITRE 6 : BIBLIOGRAPHIE

BALL, I.R.

The toxicity of cadmium to rainbow trout.

Water Res. , 1, 805-806. (1967)

BARADUC, M.M. & FONTAINE, M.

Etude comparée du métabolisme respiratoire du jeune saumon sédentaire (parr) et migrateur (smolt).

C. R. Séances Soc. Biol. Ses. Fil. , 149, 1327-1329. (1955)

BERG, A.

Studies on the metabolism of calcium and strontium in freshwater fish. I. Relative contribution of direct and intestinal absorption.

Mem. 1st ital. Idrobiol. , 23, 161-196. (1968)

BJORNSSON, B.T. , THORARENSSEN, H. , HIRANO, T. , OGASAWARA, T. & KRISTINSSON, J.B.

Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation.

Aquaculture, 82, 77-91. (1989)

BJORNSSON, B.Th. , YOUNG, G. , LIN, R.J. , DEFTOS, L.J. & BERN, H.A. Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) : plasma calcium regulation, osmoregulation and calcitonin.

Gen. Comp. Endocrinol. ,74, 346-354 (1989)

BOEUF, G. , LEROUX, A. , GAIGNON, J.L. & HARACHE, Y.

Gill (Na⁺ -K⁺)-ATPase activity and smolting in Atlantic salmon *Salmo salar* L. in France.

Aquaculture, 45, 73-81. (1985)

BOEUF, G.

Bases physiologiques de la salmoniculture : le phénomène de la smoltification.

La Pisciculture Française, 88, 5-21. (1987)

BOEUF, G.

Bases physiologiques de la salmoniculture : osmorégulation et adaptation à l'eau de mer.

La Pisciculture Française, 87, 28-40. (1987)

BOLTON, T.B.

Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle.

Physiol. Rev. , 59, 606-718. (1979)

CAROFOLI, E.

Membrane transport of calcium : an overview.

In : "Methods in enzymology" , ed. by COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., Academic Press, New York, 157, 3-11. (1988)

CAROFOLI, E.

Calcium pump of the plasma membrane.

Physiol. Rev. , 71 (1), 129-153. (1991)

CHARTIER-BARADUC, M.M.

Influence de l'hormone somatotrope sur les teneurs en eau et en électrolytes du plasma et des muscles de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*).

C. R. Soc. Biol. , 153, 1757-1761. (1959)

COLLIE, N.L. & BERN, H.A.

Changes in intestinal fluid transport associated with smoltification and seawater adaptation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (walbaum).

J. Fish Biol. , 21, 337-348. (1982)

CONTE, F.P. & LIN, D.

Kinetics of cellular morphogenesis in gill epithelium during seawater adaptation of *Oncorhynchus* (walb.).

Comp. Biochem. Physiol. , 23, 945-957. (1967)

COPP, D.H. , CAMERON, E.C. , CHENEY, B. , DAVIDSON, A.G. & HENZE, K.G. Evidence of calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium.

Endocrinology, 70, 638-649. (1962)

CUNJAK, R.A. , SAUNDERS, R.L. & CHADWICK, M.P.

Seasonal variations in the smolt characteristics of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) from estuarine and riverine environments.

Can. J. Fish. Aquat. Sci. , 47, 813-820. (1990)

DAHL, K.

The age and growth of salmon and trout in Norway as shown by their scales.

Salmon and Trout Association, London. (1910)

DEDMAN, J.R.

The role of calmodulin in the modulation of intracellular calcium. Mechanisms of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium. ,135-146. (1984)

DELFORGE, P.

Contribution à l'étude du transport du calcium au niveau de la branchie du crabe *Eriocheir sinensis*.

Mémoire de Licence en Sciences Zoologiques, FNDP, Namur (Belgique). (1989)

DONEUX, I., LEONARD, E.

Ecophysiologie du saumon.

Travail de 3ème Candidature en Sciences Vétérinaires, FNDP, Namur (Belgique). (1990)

ELSON, P.F.

The importance of size in the change from parr to smolt in Atlantic salmon.

Can. Fish. Cult. , 21, 1-6. (1957)

ENYEDI, A., SARKADI, B., SZASZ, I., BOT, B. & GARDOS, G.

Molecular properties of the red cell calcium pump. II. Effects of proteolysis, proteolytic digestion and drugs on the calcium-induced phosphorylation by ATP in inside/out red cell membrane vesicles.

Cell. Calcium, 1, 299-310. (1980)

EPSTEIN, F.H., MAETZ, J. & RENZIS, G de.

Active transport of chloride by teleost gill : inhibition by thiocyanate.

Am. J. Physiol. , 224, 1295-1299. (1973)

ERIKSSON, L.-O. & LUNDQVIST, H.

Circannual rhythms and photoperiod regulation of growth and smolting in Baltic salmon (*Salmo salar* L.).

Aquaculture, 28, 113-121. (1982)

EVANS, D.H.

The roles of gill permeability and transport mechanisms in euryhalinity.

Fish Physiology, 10B, 239-283. (1984)

EVERS, C. , HUGENTOBLER, G. , LESTER, R. , GMAJ, P. , MEIER, P. & MURER, H.

ATP-dependent Ca^{++} uptake and Ca^{++} dependent protein phosphorylation in basolateral liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 939, 542-550. (1988)

FAMBROUGH, D.M.

The sodium pump becomes a family.

TINS, 11 (7), 325-328. (1988)

FENWICK, J.C.

Effect of stanniectomy on calcium-activated adenosine triphosphatase activity in the gills of freshwater-adapted North-American eels, *Anguilla rostrata* Le Sueur.

J. Exp. Zool. , 188, 125-131. (1976)

FLIK, G. , VAN RIJK, J.H. , SJOERD, E. & WENDELAAR BONGA, S.E.

Evidence for high affinity Ca^{++} ATPase activity and ATP-driven Ca^{++} -transport in membrane preparations of the gill epithelium of the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*.

J. Exp. Biol. , 119, 335-347. (1985)

FLIK, G. , WENDELAAR BONGA, S.E. & FENWICK, J.C.

Ca^{++} -dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes. 1. Identification of Ca^{++} activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities.

Comp. Biochem. Physiol. , 76B (4), 745-754. (1983)

FLIK, G. , WENDELAAR BONGA, S.E. & FENWICK, J.C.

Ca^{++} -dependent phosphatase and Ca^{++} -dependent -ATPases activities in plasma membranes of cell gill epithelium. II. Evidence for transport high-affinity Ca^{++} -ATPase.

Comp. Biochem. Physiol. , 79B (1), 9-16. (1984)

FLIK, G. WENDELAAR BONGA, S.E. & FENWICK, J.C.

Active Ca^{++} transport in plasma membranes of branchial epithelium of the North-American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur

Biol. Cell. , 55, 265-272. (1985)

FLIPOT, P.

Elevage de salmonidés.

Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'alimentation.

(1982)

FOLMAR, L.C. & DICKHOFF, W.W.

The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids : a review of selected literature.

Aquaculture, 21, 1-37. (1980)

FOUCHEREAU-PERON, M. , MOUKHTAR, M.S. , LE GAL, Y. & MILHAUD, G.

Determination of specific receptors for calcitonin in isolated trout gill cell. Comp. Biochem. Physiol. , 68A, 417-421. (1981)

GAIGNON, J.-L.

L'élevage des juvéniles de saumon atlantique (*Salmo salar*).

La Pisciculture Française, 90, 9-56. (1988)

GARRAHAM, P.J. & REGA, A.F.

Activation of partial reactions of the Ca^{++} -ATPase from human red cells by Mg^{++} and ATP.

Biochim. Biophys. Acta, 513, 59-65. (1978)

GHIJSEN, W. & VAN OS, C.H.

Ca-stimulated ATPase in brush-border and basolateral membranes of rat duodenum with high affinity sites for Ca ions.

Nature, 279, 802-803. (1979)

GIJSEN, W. , DE JONG, M.D. & VAN OS, C.H.

ATP-dependant calcium transport and its correlation with Ca^{++} ATPase activity in basolateral plasma membranes of rat duodenum.

Biochimica and Biophysica Acta. , 689, 327-336. (1982)

GMAJ, P. , MURER, H. & KINRE, R.

Calcium ion transport accross plasma membranes isolated from rat kidney cortex.

Biochem. J; , 178, 549-557. (1979)

GORBMAN, A.

Thyroid function and its control in fishes.

In : "Fish Physiology" , ed. by HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. , Academic Press, New York, 2, 241-274. (1969)

HARDEN, F.R.

Fish Migration.

Edward Arnold, London. (1985)

- HASLER, A.D. & WISBY, W.J.
Discrimination of stream odors by fishes and relation to parent stream behaviour.
American Naturalist, 85, 223-238. (1951)
- HICKMAN, C.P., Jr. & TRUMP, B.F.
The kidney.
In : "Fish Physiology", ed. by HOAR, W.S. & RANDALL, D.J.,
Academic Press, New York, 1, 31-239. (1969)
- HIGGINS, P.J.
Metabolic differences between Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and smolts.
Aquaculture, 45, 33-53. (1985)
- HOAR, W.S.
The physiology of smolting salmonids.
Fish Physiology, 11B, 275-343. (1988)
- HOAR, W.S.
The thyroid gland of the Atlantic salmon.
J. Morphol. ,65, 257-295. (1939)
- HOLMES, W.N. & STAINER, I.M.
Studies on the renal excretion of electrolytes by the trout (*Salmo gairdneri*).
J. Exp. Biol. , 44, 33-46. (1966)
- HOOTMAN, S.R. & PHILPOTT, C.W.
Ultracytochemical localisation of Na⁺, K⁺, activated ATPase in chloride cells from teleost branchial epithelium.
Anat. Rec. , 193, 99-130. (1979)
- JOHANSSON, J. & CLARKE, W.C.
Development of seawater adaptation in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - effects of size, temperature and photoperiod.
Aquaculture, 71, 247-263. (1988)
- KOMOURDJIAN, M.P., SAUNDERS, R.L. & FENWICK, J.C.
The effect of porcine somatotropin on growth and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr.
Canad. J. Zool. , 54, 531-535. (1989)

KRISTINSSON, J.B. , SAUNDERS, R.L. & WIGGS, A.J.
Growth dynamics during the development of bimodal length
frequency distribution in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).
Aquaculture Special Issue, 45, 1-20. (1985)

LANGDON, J.S. , THORPE, J.E. & ROBERTS, R.J.
Effects of cortisol and ACTH on gill Na⁺/ K⁺ -ATPase, SDH and
chloride cells in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L.
Comp. Biochem. Physiol. , 77A(1), 9-12. (1984)

LANGDON, J.S. , THORPE, J.E.
The ontogeny of smoltification : developmental patterns of gill
Na⁺/ K⁺ -ATPase, SDH and chloride cells in juvenile Atlantic
salmon, *Salmo salar* L.
Aquaculture, 45, 83-95. (1985)

LARSEN, F.L. & VINCENZI, F.F.
Calcium transport across the plasma membrane : stimulation by
calmodulin.
Sciences, 204, 306-308. (1979)

MA, S.W.Y. , SHAMI, Y. , MESSER, H.H. & COPP, D.H.
Properties of Ca⁺⁺ ATPase from the gill of rainbow trout (*Salmo
gairdneri*)
Biochim. Biophys. Acta, 345, 243-251. (1974)

MAETZ, J. & GARCIA ROMEU, F.
The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a
freshwater fish. *Carassius auratus*. II. Evidence for Na⁺/Na⁺ and
HCO₃⁻ exchanges.
J. Gen. Physiol. , 47, 1209-1227. (1964)

MARKET, J.R. & VANSTONE, W.E.
Pigments in the belly skin of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).
J. Fish. Res. Board Can. , 23, 1095-1098. (1966)

Mc CORMICK, S.D. & BERN, H.A.
In vitro stimulation of Na⁺ - K⁺ -ATPase activity and ouabain
binding by cortisol in coho salmon gill.
Am. J. Physiol. Soc. , R707-R715. (1989)

Mc CORMICK, S.D. , SAUNDERS, R.L. & MacINTYRE, A.S. Mitochondrial
enzyme and Na⁺, K⁺ -ATPase activity, and ion regulation during
parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar*).
Fish Physiol. Biochem. , 6 (4), 231-241. (1989)

- McCORMICK, S.D.
Cortisol directly stimulates differentiation of chloride cells in tilapias opercular membrane.
Am. J. Physiol. Soc. , R857-R864. (1990)
- McKEOWN, B.A.
Fish migration
Croon Helm (London & Sydney). (1984)
- McCORMICK, S.D. , MOYES, C.D. & BALLANTYNE, J.S.
Influence of salinity on the energetics of gills and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*).
Fish Physiol. Biochem. , 6 (4), 243-254. (1989)
- MILLS, D.H.
Ecology and management of Atlantic salmon.
Chapman and Hall, London. (1989)
- MILLS, D.H.
The biology of Scittish salmon.
In : "The status of the Atlantic salmon in Scotland", ed. by JENKINS, D; & SHEARER, W.M. , ITE Symposium, 15, Terrestrial Ecology, Abbots Ripton, 10-19. (1986)
- MILNE, R.S. & LEATHERLAND, J.F.
Effects of bovine TSH, thiourea, ovine prolactin and bovine growth hormone of plasma thyroxine and triiodothyronine levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J.
Comp. Physiol. ,124, 105-110. (1978)
- NORDENG, H.
A pheromone hypothesis for homeward migration in anadromous salmonids.
Oikos, 28, 155-159. (1977)
- ORIMO, H. , OHATA, M. , FUJITA, T. , YOSHIKAWA, M. , HIGASHI, T. , ABE, J. , WATANABE, S. & OTANI, K.
Ultimobranchial calcitonin of *Anguilla japonica*.
In : "Endocrinology 1971. Proceedings of III International Symposium, London 1971" , ed. by TAYLOR, S. , Heinemann, London, 48-54. (1972)
- PART, P. , SUANBERG, O. & KIESSLING, A.
The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities.
Water Res. ,19 (4), 427-434. (1985)

PERRY, S. & FLIK, G.

Characterisation of branchial transepithelial calcium fluxes in freshwater trout, *Salmo gairdneri*.

Am. J. Physiol. , 23, R491-R498. (1988)

PERRY, S.F. & WOOD, C.M.

Kinetics of branchial calcium uptake in the rainbow trout : effects of acclimatation to various external calcium levels.

J. Exp. Biol. , 116, 411-434. (1985)

PERRY, S.F. , VERBOST, P.M. , VERMETTE, M.G. & FLIK, G.

Effects of epinephrine on branchial and renal calcium handling in the rainbow trout.

J. Exp. Zool. , 246, 1-9. (1985)

PISAM, M. , PRUNET, P. , BOEUF, G. & RAMBOURG, A.

Ultrastructural features of chloride cells in the gill epithelium of the Atlantic salmon *Salmo salar* , and their modifications during smoltification.

American Journal of Anatomy, 183, 235-244. (1988)

PRUNET, P. , BOEUF, G.

Plasma prolactin level during transfer of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) from fresh water to sea water. Aquaculture, 45, 167-176. (1985)

QUINN, T.P.

Current controversies in the study of salmon homing.

Ethology Ecology & Evolution, 2, 49-63. (1990)

REINILA, M. , MACDONALD, E. , SALEM, N. , Jr. , LINNOILA, M. & TRAMS, E.G.

Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases.

Anal. Biochem. , 124, 19-26. (1982)

REY, P. , ROZAS, G. , ANDRES, M.D. , ALDEGUNDE, M. & REBOLLEDO, E.

Gill ATPases activities in domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at different times of the year.

J. Interdiscipl. Cycle Res. , 21 (1), 65-74. (1990)

RICHARDT, G. , FEDEROLF, G. & HABERMANN, E.

Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca⁺⁺ -binding proteins. Biochem. Pharmacol. , 35, 1331-1335. (1986)

RINGER, S.

Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricule.

J. Physiol. Lond. , 3, 380-393. (1882)

ROBERTS, K.S. , CRYER, A. , KAY, J. , SOLBE, J.F de L.G. , WHARFE, J.R. & SIMPSON, W.R.

The effects of exposure to sub-lethal concentrations of cadmium on enzyme activities and accumulation of the metal in tissues and organs of rainbow and brown trout (*Salmo gairdneri*, RICHARDSON and *Salmo trutta fario* L.).

Comp. Biochem. Physiol. , 626, 135-140. (1979)

ROBERTSON, O.H.

Production of silvery smolt stage in rainbow trout by intramuscular injection of mammalian thyroid extract and thyrotropic hormone.

J. Exp. Zool. , 110, 337-355. (1949)

ROCH, M. , MALY, E.J.

Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity.

J. Fish. Res. Board Can. , 36, 1297-1303. (1979)

RYDEVIK, M. , BORG, B. , HOUX, C. , KAWAUCHI, H. &

BJORNSSON, B.T. Plasma growth hormone levels increase during seawater exposure of sexually mature Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.)

General and Comparative Endocrinology, 80, 9-15. (1990)

SCHATZMANN, H.J.

ATP-dependent Ca⁺⁺ extrusion from human red cells.

Experientia, 22, 364-365. (1966)

SHEPARD, K.L.

The activity and characteristics of the Ca⁺⁺ ATPase of fish gills in relation to environmental calcium concentrations.

J. Exp. Biol. , 90, 115-121. (1981)

SHERIDAN, M.A.

Changes in lipid composition of juvenile salmonids associated with smoltification and premature transfer to seawater.

Aquaculture, 45, 387-388. (1985)

SHERIDAN, M.A.

Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification.

Gen. Comp. Endocrinol. ,64, 220-238. (1986)

SILVA, P., SOLOMON, R., SPOKES, K. & EPSTEIN, F.H.

Ouabaïn inhibition of gill Na-K ATPase : relationship to active chloride transport.

J. Exp. Zool. , 199, 419-426. (1977)

SMITH, I.W.

The classification of 'Bacterium salmonicida.'

J. Gen. Microbiol. , 33, 267-274. (1963)

SO, Y.P. & FENWICK, J.C.

Relationship between net ⁴⁵calcium influx accross a perfused isolated eel gill and the development of post-stannectomy hypercalcemia.

J. Exp. Zool. , 200, 259-264. (1977)

STEWART, M.W., SAUNDERS, R.L. & WIGGS, A.J.

Effects of extended daylenght on autumn growth dynamics of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*.

Can. J. Fish. Aquat. Sci. , 47 (4), 755-759. (1990)

SUZUKI, Y., CHAO, S.H., ZYSK, J.R. & CHEUNG, W.Y.

Stimulation of cadmodulin by cadmium ion.

Arch. Toxicol. ,57, 205-211. (1985)

SYMONS, P.E.K.

Estimated escapement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) for maximum smolt production in rivers of different productivity

J. Fish. Res. Bd Can. , 36, 132-140. (1979)

TOWLE, D.W.

Sodium transport systems in gills.

In : "Comparative aspects of sodium cotransport systems" , ed. by KINNE, R.K.H, Comp. Physiol. , Karger, Basel, Z, 241-263. (1990)

VALLEE, B.L. & ULMER, D.D.

Biochemical effects of mercury, cadmium and lead.

Amer. Rev. Biochem. , 41, 91-127. (1972)

- VERBOST, P.M. , FLICK, G. , LOCK, R.A.C. & WENDELAAR BONGA, S.E.
Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport.
J. Membrane Biol. , 102, 97-104. (1988)
- VERBOST, P.M. , FLIK, G. , LACK, R.A.C. & WENDELAAR BONGA, S.E.
Cadmium inhibition of Ca⁺⁺ -uptake in rainbow trout gills.
Am. J. Physiol. , 253, R216-R221. (1987)
- VERBOST, P.M. , VAN ROOIJ, J. , FLIK, G. , LOCK, R.A. & WENDELAAR
BONGA, S.E. The
mouvement of cadmium through freshwater trout branchial
epithelium and its interference with calcium transport.
J. Exp. Biol. , 145, 185-197. (1989)
- VIRTANEN, E.
Correlations between energy metabolism, osmotic balance and
external smolt indices in smolting young salmon, *Salmo salar* L.
.Ann. Zool. Fennici, 24, 71-78. (1987)
- WAGNER, H.H.
Photoperiod and temperature regulation of smolting in steelhead
trout (*Salmo gairdneri*).
Can. J. Zool. , 52, 219-234. (1974)
- WEDEMEYER, G. , SAUNDERS, R.L. & CLARCKE, W.C.
Environnemental factors affecting smoltification and early marine
survival of anadromous salmonids. Mar.
Fish Rev. , 42, 1-4. (1980)
- WENDELAAR BONGA, S.E. & FLIK, G.
Prolactin and calcium metabolism in a teleost fish, *Sarotherodon*
mossambicus.
In : "Comparative Endocrinology of calcium regulation" , ed. by
OGURO, C. & PANG, P.K.T. , Japan Scientific Societies Press, Tokyo,
21-26. (1982)
- YONG, G. , BJÖRNSSON, B.Th. , PRUNET, P. , LIN, R.J. & BERN, H.A.
Smoltification and seawater adaptation in coho salmon
(*Oncorhynchus kisutch*) : plasma prolactin, growth hormone, thyroid
hormones, and cortisol.
Gen. Comp. Endocrinol. , 74, 335-345. (1989)

ZAUGG, W.S. & Mc LAIN, L.R.

Adenosine triphosphatase activity in gills of salmonids : Seasonal variations and salt water influence in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*.

Comp. Biochem. Physiol. , 35, 587-596. (1970)

ZAUGG, W.S. , PRENTICE, E.F. & WAKNITZ, F.W.

Importance of migration to the development of seawater tolerance in Columbia river anadromous salmonids.

Aquaculture, 51, 33-47. (1985)