



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Sélection par croisements intra-spécifiques et caractérisation biométrique d'*Artemia* sp

Vandenbogaert, Nadine

*Award date:*  
1992

*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.

**SÉLECTION PAR CROISEMENTS  
INTRA-SPÉCIFIQUES ET CARACTÉRISATION  
BIOMÉTRIQUE D'*Artemia* sp.**

**VANDENBOGAERT NADINE  
1991-1992**

## Sélection par croisements intra-spécifiques et caractérisation biométrique d'*Artemia* sp.

VANDENBOGAERT Nadine

### Résumé

*Artemia*, petit crustacé d'eau saumâtre, est un organisme devenu pratiquement indispensable dans toutes les installations d'aquaculture vu ses multiples avantages. Notre projet de travail avait pour but principal la sélection de deux populations biométriquement distinctes par croisements successifs d'animaux nés à partir de cystes sélectionnés au départ. Les moyennes des deux lots de cystes obtenus en F2 sont plus petites que la moyenne de la population initiale. Nous avons également étudié la variabilité interpopulationnelle par la mesure de diamètres des cystes. Ce caractère semble en effet présenter une forte composante génotypique. Un échantillonnage de 300 mesures semble suffisant pour permettre de rendre compte de similarités existantes entre différentes populations. Enfin, nous avons étudié la fécondité d'*Artemia franciscana* de Great Salt Lake, ainsi que les relations morphologiques qui existent entre la femelle et le mâle en position de pré-copulation.

Mémoire de Certificat en Ecologie des Eaux Continentales  
Décembre 1992

Promoteur : J.-C. Micha

Co-promoteur : L. Narciso

## Remerciements-Agradecimentos.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier le professeur Jean-Claude Micha qui m'a accueillie dans le Laboratoire d'Ecologie des Eaux Douces, ainsi que le professeur Jean-Pierre Descy pour m'avoir encouragée à effectuer un stage Erasmus.

Queria exprimir toda minha gratidão à Professora Maria-João Collares-Pereira, que me acolheu no Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências de Lisboa. Por toda sua ajuda, sua compreensão e gentileza estou-lhe eternamente grata.

Agradeco o Professor Luis Saldanha que me acolheu no Laboratorio Maritimo da Guia onde fiz o meu estagio.

Agradeco o Professor Luis Narciso que me propôs este tema de trabalho, me aconselhou e me ajudou, assim como pelo o seu boa humor.

Queria agradecer também toda gente do Laboratorio Maritimo da Guia pelo o acolhimento caloroso. Não posso citar todas mas penso à Armando, Orlando, Luis Fonseca, Pedro Ré, Hila, Nani, Fatima, Pedro Fidalgo, Carlos,...

Não posso esquecer também as pessoas que me ofereceram a sua amizade: Mariana, Lurdes, Sandra, Nelson, Alberto, Afonso, Adelaide, Ana-Isabel, Teresa, Tony, Zé, ...

Je remercie également Madame Annick Van Vyve-Genette, ainsi que Monsieur Eric Depiereux pour leurs conseils.

Je tiens également à adresser un remerciement tout particulier à Béa et Miguel pour leur soutien constant, surtout aux moments où j'en avais le plus besoin.

Enfin, je remercie mes parents pour leur confiance et pour m'avoir donné la possibilité de partir, ainsi que les membres de ma famille et mes amis: Claire, Cécile, Sophie C., Sophie V. et Jacques.

Merci à tous.

Muitas obrigadas.

# SOMMAIRE

## RÉSUMÉ

## REMERCIEMENTS

## SOMMAIRE

### INTRODUCTION ET OBJECTIFS..... 1

### I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE: Biologie d'*Artemia* sp.

I.1. Classification systématique.....	4
I.2. Distribution d' <i>Artemia</i> sp.....	6
I.3. Ecologie d' <i>Artemia</i> sp.....	9
I.3.1. Les mécanismes d'adaptation physiologique.....	9
I.3.2. Les moyens de dispersion.....	10
I.3.3. Les niveaux de tolérance.....	11
I.3.3.1. La température.....	11
I.3.3.2. La composition ionique du milieu.....	11
I.3.3.3. La salinité.....	12
I.3.3.4. L'oxygène dissous.....	12
I.3.3.5. Le pH.....	12
I.4. Reproduction et cycle de vie.....	13
I.4.1. Types de reproduction.....	13
I.4.2. Reproduction.....	14
I.4.2.1. Description de l'appareil reproducteur.....	14
I.4.2.2. Reproduction proprement dite.....	15
I.5. Les cystes.....	16
I.5.1. La morphologie.....	16
I.5.1.1. Le chorion.....	16
I.5.1.2. La cuticule.....	17
I.5.2. Effet de différents facteurs sur la formation des cystes.....	17
I.5.2.1. Facteurs environnementaux.....	18
I.5.2.1.1. La salinité.....	18
I.5.2.1.2. L'oxygène.....	18
I.5.2.1.3. L'hypoalimentation.....	18
I.5.2.2. Facteur endogène: le nombre de pontes.....	19
I.5.3. Reprise du métabolisme et développement de la gastrula à l'état de nauplius.....	19
I.5.3.1. Energie et source de carbone permettant le développement à l'état de pré-émergence.....	21
I.5.3.2. Emergence et éclosion.....	21
I.5.4. Développement, croissance et morphologie du nauplius à l'état adulte.....	21
I.5.4.1. Stade nauplius.....	22
I.5.4.2. Stade métanauplius.....	23
I.5.4.3. Stade post-métanauplius.....	24
I.5.4.4. Stade post-larvaire.....	24

I.5.4.5. Morphologie des adultes. ....	25
I.5.5. Développement physiologique de la larve à l'état adulte. ....	25
I.5.5.1. Régulation osmotique et ionique. ....	25
I.5.5.2. Biogenèse des cellules sanguines et ontogenèse des pigments respiratoires. ....	26
I.5.5.3. Formation du premier oeil. ....	27
I.5.5.4. Respirations aérobie et anaérobie. ....	27
I.5.5.5. Tractus digestif: absorption d'eau, digestion et nutrition. ....	28

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

II.1. Réalisation de cultures d'algues. ....	29
II.1.1. Types d'algues cultivées. ....	29
II.1.2. Le milieu de culture utilisé. ....	30
II.1.2.1. Types de milieu. ....	30
II.1.2.2. Filtration et stérilisation de l'eau de mer. ....	30
II.1.2.3. Préparation des milieux de culture. ....	30
II.1.3. Les différentes étapes de culture. ....	31
II.1.3.1. Manutention des cultures "stock" ....	32
II.1.3.1.1. Culture "stock" en milieu liquide. ....	32
II.1.3.1.2. Culture "stock" en milieu solide. ....	32
II.1.3.2. Culture en plus grands volumes. ....	32
II.1.3.2.1. Erlenmeyer de 2 l et ballon de 10 l. ....	32
II.1.3.2.2. Sac plastique de 65 l. ....	33
II.2. Sélection d' <i>Artemia</i> par croisements intra- spécifiques. ....	34
II.2.1. Souches utilisées. ....	34
II.2.2. Sélection des géniteurs. ....	34
II.2.2.1. Mesure du diamètre des cystes. ....	34
II.2.2.2. Sélection biométrique. ....	34
II.2.2.3. Isolement des cystes. ....	35
II.2.2.4. Stockage des cystes sélectionnés. ....	35
II.2.2.5. Mise à l'éclosion des cystes sélectionnés. ....	35
II.2.2.5.1. Température. ....	35
II.2.2.5.2. Le pH. ....	35
II.2.2.5.3. La salinité. ....	36
II.2.2.5.4. L'intensité lumineuse. ....	36
II.2.3. Culture des géniteurs. ....	36
II.2.3.1. Conditions de culture. ....	36
II.2.3.2. Isolement des couples. ....	37
II.2.3.3. Suivi des couples. ....	37
II.2.4. Culture des descendants. ....	37
II.3. Caractérisation biométrique de différentes espèces d' <i>Artemia</i> sp. ....	38
II.3.1. Etude comparative du diamètre des cystes, de l'épaisseur du chorion et de la taille totale des nauplii. ....	38

II.3.1.1. Matériel utilisé. ....	38
II.3.1.2. Méthodologie. ....	38
II.3.1.2.1. Mesure du diamètre des cystes. ....	39
II.3.1.2.2. Mesure de l'épaisseur du chorion.....	39
Hydratation des cystes.....	39
Lavage et désactivation. ....	39
Utilisation directe ou stockage. ....	40
II.3.1.2.3. Mesure de la longueur totale des nauplii. ...	40
II.3.3. La fécondité en relation avec la taille des femelles.....	41
II.3.3.1. Matériel utilisé. ....	41
II.3.3.2. Mesure de la taille et comptage du nombre d'oeufs. ....	41
II.3.4. Relation entre la taille des mâle/femelle en copulation. ....	41
II.3.4.1. Matériel utilisé. ....	41
II.3.4.2. Mesures effectuées. ....	41

### III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.

III.1. Sélection d' <i>Artemia</i> sp. par croisements intra-spécifiques. ....	43
III.1.1. Isolement des géniteurs. ....	43
III.1.2. Sélection de deux populations biométriquement distinctes. ....	44
III.1.3. Reproduction, fécondité et viabilité. ....	45
III.1.3.1. Ovoviviparité <i>versus</i> oviparité. ....	45
III.1.3.2. Fréquence des pontes. ....	46
III.1.3.3. Fécondité.....	47
III.1.3.4. Ecllosion et viabilité ....	47
III.1.3.4.1. Les facteurs génétiques.....	48
III.1.3.4.2. Les conditions de culture.....	48
-la quantité de nourriture.....	48
-la salinité.....	48
-autres facteurs ....	49
III.2. Analyse des caractéristiques biométriques. ....	50
III.2.1. Analyse de la variabilité interpopulationnelle. ....	50
III.2.1.1. Etude comparative du diamètre des cystes et des cystes décapsulés. ....	50
III.2.1.2. Etude comparative du diamètre des cystes et de la longueur totale des nauplii.....	54
III.2.2. Taux de fécondité. ....	54
III.2.3. Interactions morphologiques entre le mâle et la femelle en copulation. ....	55

IV. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	57
------------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ANNEXES

## Introduction et Objectifs.

La première référence écrite sur l'existence d'*Artemia* sp., petit crustacé d'eau saumâtre, date de 1755 et fut faite par SCHLOSSER (BARIGOZZI, 1980) sur base du matériel recueilli dans les salines proches de Lymington (Angleterre). En 1778, LINEU (ABREU-GROBOIS et BEARDMORE, 1980) classifia les mêmes individus comme appartenant au genre *Cancer* et les nomma *Cancer salinus*. Par la suite, LEACH (1819, in PAULO, 1992) s'apercevant de l'erreur de classification commise par LINEU (20 appendices thoraciques au lieu de 22) les classifia de nouveau et leur attribua le nom d'*Artemia salina*.

A partir de la seconde moitié du 19<sup>e</sup> siècle commencèrent les études sur *Artemia* et plus spécialement sur sa morphologie et la taxonomie. Des caractéristiques particulières furent rapidement découvertes faisant de ce petit crustacé l'objet idéal pour des études histologiques, génétiques, biochimiques, écologiques...(SORGeloos, 1973 et 1980a). Mais, ce n'est que dans les années 30 qu'est découvert l'intérêt d'*Artemia* sp. en aquaculture (SORGeloos, 1980b) lorsque SEALE (1933) et ROLLEFSEN (1939, in SORGeloos, 1980b) découvrent que les nauplii récemment éclos constituent un excellent aliment pour les larves de poissons. De plus, la culture du zooplancton qui constitue normalement l'aliment naturel des larves de poissons et de crustacés marins est commercialement irréalisable et techniquement difficile (GIRIN et PERSON-LE-RUYET, 1977).

Dans les années 40-50, après la découverte de SEALE et ROLLEFSEN, commence l'exploitation commerciale d'*Artemia* sp. dans le Grand Lac Salé aux Etats-Unis (Utah) ainsi que dans la baie de San Francisco en Californie. Par la suite, avec le développement de l'aquaculture dans les années 50-70, l'utilisation des cystes d'*Artemia* augmente grandement. Cela provoqua une demande beaucoup plus importante que l'offre et une augmentation vertigineuse des prix (SORGeloos, 1980b). Cette situation engendra une grande crise dans les entreprises d'aquaculture. Les prix inaccessibles, avec la conséquence d'un manque de cystes ou la vente de cystes de mauvaises qualités, provoquèrent des mortalités massives des larves dans beaucoup d'unités de culture et freinèrent le développement de l'aquaculture au niveau mondial. Ce n'est qu'à la fin de 1978 que commença l'exploitation des cystes d'*Artemia* dans de nouvelles régions (Europe, Asie, Australie, Amérique du sud et nouveaux lieux d'Amérique du nord). Des introductions furent également réalisées dans divers pays, comme par exemple à Macau, Brésil en 1977 (NARCISO, 1982), ce qui provoqua non seulement une fixation de la population mais également la dispersion passive dans les salines du nord-est brésilien. D'autres inoculations furent également effectuées aux Philippines en 1978 et en Thaïlande en 1979 (NARCISO, 1987). Cette intensification de la production régionale et l'explosion de la

production dans divers pays provoqua d'autres problèmes. En effet, il n'existait aucune garantie des cystes vendus commercialement étant donné qu'il existe de grandes différences de qualité entre les diverses souches et même au sein d'une même souche. A cause de ces différences, la définition de critères de qualité, ainsi que la détermination de méthodes standards s'avéraient nécessaires (SORGELOOS et *al.*, 1978). Parmi ces divers critères utilisés, nous pouvons citer le pourcentage d'éclosion, la biométrie et le profil en acides gras (NARCISO, 1987).

Actuellement, les nauplii d'*Artemia* sont les plus utilisés comme proies vivantes pour les cultures larvaires de la majorité des poissons et crustacés. Ceux-ci possèdent en effet plusieurs avantages:

- le genre se caractérise par la présence d'oeufs cryptobiotiques ou cystes pouvant être stockés durant des dizaines d'années. Les cystes sont des embryons dont le développement est arrêté au stade de gastrula et qui sont entourés par une enveloppe protectrice. Les nauplii sont facilement obtenus, à partir de cystes déshydratés, après 24 heures d'incubation dans de l'eau salée;

- les nauplii sont très tolérants vis-à-vis de l'environnement de culture (il s'agit d'un crustacé euryhalin et eurytherme), ils résistent au traitement brutal, peuvent être désinfectés, atteindre de grandes tailles et être transporteurs de composants difficiles à administrer directement aux prédateurs des larves: vitamines, acides gras... par un procédé nommé bioencapsulation (SORGELOOS et *al.*, 1986);

- un autre avantage de l'utilisation d'*Artemia* sp. en aquaculture est sa grande capacité de conversion de la nourriture. De plus, ses besoins nutritifs ne changent pas durant la croissance et il peut être cultivé à très hautes densités. Le temps de génération est également court (minimum de 2 semaines), la fécondité élevée (de 100 à 400 oeufs tous les quatre jours) et la durée de vie longue (jusqu'à plus de 6 mois). L'exosquelette de l'adulte ne fait qu'un  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, ce qui permet la consommation de tout l'animal par les prédateurs, celui-ci étant également facilement digérable (SORGELOOS, 1980b). Enfin, ces animaux possèdent un profil nutritif raisonnable, notamment en acides gras. Sur base de leur composition en acides gras, les cystes peuvent être classés en deux grands groupes. Le premier comprend ceux qui contiennent une grande quantité de 18:3W3, acide gras essentiel pour les poissons d'eau douce et le second groupe comprend les autres qui contiennent une grande quantité de 20:5W3, acide gras essentiel pour les poissons et crustacés marins (WATANABE et *al.*, 1978).

Cependant, il apparaît que la composition et la quantité d'acides gras des nauplii sont affectées par la composition en acides gras de l'alimentation. Il est donc essentiel de connaître le profil des *Artemia* utilisés pour nourrir les larves de poissons et crustacés élevés en aquaculture.

L'usage d'*Artemia* en aquaculture pose cependant quelques problèmes. En effet, la majorité des larves de poissons et de crustacés en culture sont sélectives vis-à-vis de la taille des proies. Ainsi, au fur et à mesure que les larves croissent, la taille des proies doit également augmenter. A cet effet, trois groupes d'organismes sont utilisés: le phytoplancton (dont la taille peut varier de 4 à 50  $\mu\text{m}$ ), les rotifères tel *Brachionus plicatilis* (qui mesure entre 210 et 270  $\mu\text{m}$ ), les nauplii et métanauplii d'*Artemia* (mesurant de 420 à 510  $\mu\text{m}$ ). Les différences de taille entre ces trois groupes sont très significatives, ce qui peut poser des problèmes d'adaptation aux larves en culture lorsque le type d'aliment est changé. La taille des nauplii fraîchement éclos est donc d'une grande importance pour leur utilisation en aquaculture. Cependant, les adultes attirent l'attention depuis quelques années quant à leur utilisation à l'échelle commerciale (VIEIRA, 1989). En effet, la composition biochimique des formes adultes montre une plus grande valeur nutritive par rapport aux nauplii fraîchement éclos, le poids sec en protéines augmentant de 47 à 60% (LÉGER et al., 1986). Cette composition dépend cependant de l'alimentation avec laquelle sont nourris les organismes.

Notre projet de travail a pour principal objectif la sélection de deux lots de cystes d'*Artemia* sp. par le croisement d'animaux nés de cystes isolés à partir d'une population initiale. Nous essayerons ainsi d'obtenir deux populations biométriquement distinctes (comme c'est connu chez *Brachionus*), ce qui permettrait, éventuellement, de combler les différences de taille entre chaque élément trophique servant d'aliment. Comme la taille des nauplii fraîchement éclos est fonction de la souche de cystes utilisée (SORGeloos et al., 1986), nous avons aussi effectué la caractérisation biométrique de différentes espèces et populations d'*Artemia* sp.

Nous avons également des objectifs sous-jacents: savoir si le diamètre des cystes est une caractéristique marquée génétiquement ou si par croisements intra-spécifiques consécutifs, il est possible d'augmenter ou de diminuer le diamètre moyen des cystes de la population initiale. Simultanément seront étudiées la fréquence et la fécondité (nombre de descendants) des pontes.

Ce travail a été effectué, dans le cadre d'un stage ERASMUS, au Laboratoire Maritime de Guia (Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências de Lisboa, Portugal) où la culture intensive d'*Artemia* sp. est pratiquée afin de nourrir les larves de poissons et de crustacés en culture.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE:

Biologie d'*Artemia* sp.

## I.1. Classification systématique.

*Artemia salina* Leach (1819) a été durant beaucoup de temps l'unique espèce décrite appartenant au genre *Artemia*. L'observation de caractéristiques morphologiques ainsi que le mode de reproduction (bisexuel ou parthénogénétique) sont à l'origine de l'identification de diverses variantes et ont provoqué une certaine confusion dans la nomenclature (NARCISO, 1987).

En effet, durant de nombreuses années, *Artemia salina* fut connue comme une espèce dont le mode de reproduction était bisexuel, mais diverses observations morphologiques ont amené à distinguer différentes entités et variations suivant la salinité du milieu. Ainsi, en 1840, JOLY (in BARIGOZZI, 1980) découvrait au Sud de la France (Velleneuve) l'existence de populations dont le mode de reproduction était parthénogénétique. Par la suite, diverses observations morphologiques ont conduit à la distinction d'espèces de différentes origines, ce qui a engendré de nombreux termes synonymes (*A. gracilis*, *A. monica*, ...). Postérieurement, l'étude des chromosomes permit à BRAUER (1893, in BARIGOZZI, 1980) de découvrir que les populations parthénogénétiques de Capodistria (mer Adriatique) étaient des tétraploïdes à 84 chromosomes, tandis qu'ARTOM en 1912 (in BARIGOZZI, 1980) découvrait que la souche bisexuelle de Cagliari était diploïde (42 chromosomes). Il était également trouvé une corrélation entre le nombre de chromosomes, la taille nucléaire et cellulaire. Les organismes parthénogénétiques, avec 84 chromosomes, ont un noyau plus grand et les cellules montrent un gigantisme en comparaison avec la forme bisexuelle (diploïde). ARTOM proposa alors de distinguer parmi *A. salina* deux sous-espèces: *A. salina univalens* (42 chromosomes) et *A. salina bivalens* (84 chromosomes). Cependant, cette distinction n'a jamais été acceptée et ARTOM, lui-même, n'insistait pas sur son usage. Il a cependant le mérite d'avoir considéré *A. salina* comme une espèce collective (BARIGOZZI, 1980).

Par la suite, furent découverts de nombreux cas d'isolement sexuel de la petite crevette qui firent éclater le genre. Ainsi, GILCHRIST en 1960 mit en évidence l'isolement sexuel entre *Artemia* de Californie et d'Afrique du Nord. HALFER CERVINI et al. (1968) trouvèrent également un isolement sexuel entre des populations vivant dans les mêmes salines (San Bartolomeo, Sardinia et Hidalgo; Mexique). Une nouvelle espèce fut décrite par PICCINELLI et PROSDOCIMI en 1968 (in BARIGOZZI, 1980) qui se distinguait par le fait qu'elle possédait 44 chromosomes au lieu de 42 et fut nommée *A. persimilis*.

Tab.1.1. Systématique du genre *Artemia* (d'après BARIGOZZI, 1980).

Group	Name	Localities	Chromosome number	
I. Bisexual diploid, subdiploid or tetraploid	<i>A. salina</i> Leach	Lymington (Engl.)	42	
	<i>A. franciscana</i> Kellogg	North America (California <i>etc.</i> )	42	
	<i>A. tunisiana</i> Bowen	Northern Africa Cagliari (Sardinia)	42	
	<i>A. urmiana</i> Gunther	Lake Urmia (Iran)	?	
	<i>A. persimilis</i> Prosdocimi and Piccinelli	S. Bartolomeo (Cagliari), Hidalgo (Mexico)	44	
	<i>A. monica</i> Verrill	Mono Lake (California)	?	
	<i>A. odessensis</i> New name	Odessa (USSR)	84 ?	
	II. Parthenogenetic with different degrees of ploidy and different mechanisms of chromosome number regulation	<i>A. parthenogenetica</i> of Istria	Istria	predominantly 84
		<i>A. parthenogenetica</i> of Sta Gilla	Sta Gilla (Cagliari)	42
		<i>A. parthenogenetica</i> of Apulia	Margherita di Savoia (Italy)	42, 84
<i>A. parthenogenetica</i> of Comacchio		Comacchio (Italy)	84	
<i>A. parthenogenetica</i> of Sète		Sète (France)	42	
<i>A. parthenogenetica</i> of Odessa		Odessa (USSR)	84	
<i>A. parthenogenetica</i> of India		Madras (Kutch)	?	
<i>A. parthenogenetica</i> of Australia		Port Hedland (Australia)	?	
<i>A. parthenogenetica</i> of Japan		Yamaguchi (Japan)	?	
<i>A. parthenogenetica</i> of the Dead Sea		Dead Sea	63, 105	

Postérieurement, l'étude caryotypique a permis une meilleure connaissance de la systématique du genre. Grâce à des études expérimentales en laboratoire basées sur le croisement d'animaux de localités différentes, il a été possible de distinguer différentes espèces jumelles (BARIGOZZI, 1972, 1974 et 1980, CLARK et BOWEN, 1976 et HALFER CERVINI et *al.*, 1968). Des études sur l'hémoglobine et les isoenzymes ont également permis de mettre en évidence un degré élevé de polymorphisme à l'intérieur de chaque espèce jumelle (ABREU-GROBOIS et BEARDMORE, 1980, BOWEN et *al.*, 1978, BOWEN et *al.*, 1980).

Selon BARIGOZZI (1980), le genre comprend un certain nombre d'espèces bisexuelles dont la majorité ont 42 chromosomes et un certain nombre d'espèces parthénogénétiques avec différents types de méiose et différents degrés de ploïdie. Il propose d'utiliser le terme *Artemia parthenogenetica*, suivi du nom latin du lieu d'origine pour les formes présentant une reproduction parthénogénétique. Ceci a l'avantage de simplifier la taxonomie mais ne prend pas en considération les mécanismes chromosomiaux ou le degré de ploïdie. En ce qui concerne les formes bisexuelles, il définit diverses espèces: *Artemia franciscana*, *A. tunisiana*, *A. urmania*, *A. persimilis*, *A. monica* et *A. odessensis*, le critère d'identification se basant sur le nombre de chromosomes et les caractères morphologiques. Il existe cependant encore une grande controverse quant à la taxonomie du genre. Afin d'éviter des confusions, les différents auteurs se sont mis d'accord et de plus, une convention a été adoptée lors du premier Symposium International sur *Artemia salina* (Corpus Christi, Texas, 1980): ce nom n'est utilisé que pour désigner le matériel recueilli dans les salines de Lymington (Angleterre). La systématique du genre *Artemia* est montrée au Tab.1.1.

La position systématique d'*Artemia* sp. est la suivante :

Règne : Animal

Phylum : Arthropodes

Classe : Crustacés

Sous-classe : Branchiopodes

Ordre : Anostracés

Famille : Artemiidae

Genre : *Artemia*, Leach 1819.

Les Branchiopodes sont des crustacés anatomiquement des plus primitifs. Ils possèdent des caractéristiques très primitives comme un

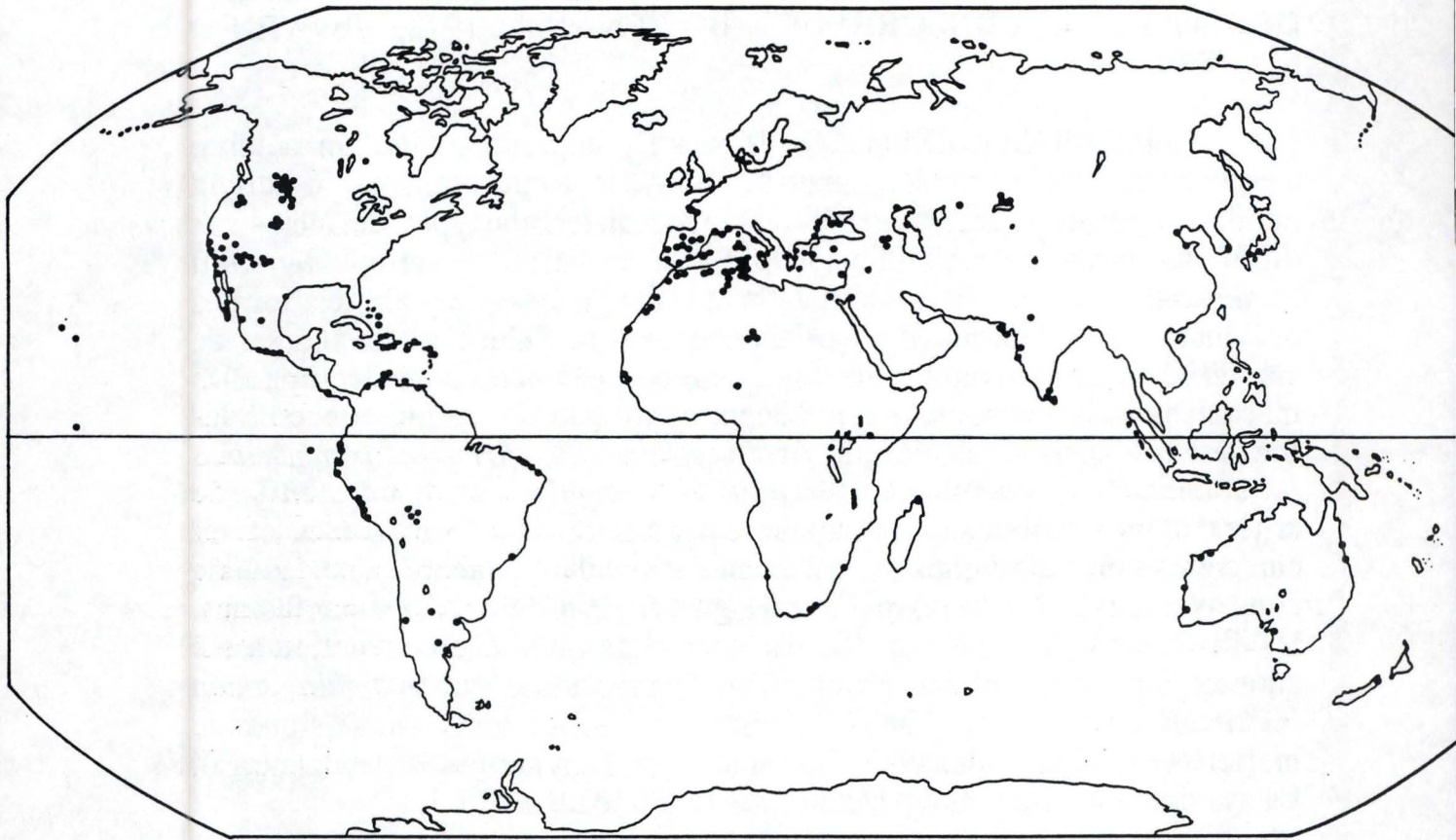


Fig.1.1. Représentation mondiale d'*Artemia* sp. (d'après VANHAECKE et al., 1987).

coeur long et tubulaire, des appendices natatoires en forme de lame, un corps aplati et un grand nombre de segments (VIEIRA, 1989). Simultanément, ils possèdent des caractéristiques de grande spécialisation tel l'adaptation éco-physiologique à différents types de biotopes.

Les Anostracés se caractérisent par l'absence de carapace, leur corps étant revêtu par une délicate cuticule, par l'existence d'une paire d'yeux pédonculés et antennes préhensibles chez les mâles mais réduites chez les femelles. Ceux-ci sont également caractérisés par la présence de 11 à 19 paires d'appendices thoraciques (PAULO, 1992).

## I.2. Distribution d'*Artemia* sp.

La distribution mondiale d'*Artemia* sp. est représentée à la Fig.1.1. Il s'agit d'un organisme cosmopolite, celui-ci étant distribué sur les cinq continents dans les lacs salés, les lagons côtiers et les marais salants, s'adaptant parfaitement aux conditions environnementales de température, de salinité ou de composition chimique (VANHAECKE et al., 1987). Au niveau régional, sa distribution présente cependant un caractère discontinu, celui-ci n'existant pas dans toutes les salines. Il présente également une distribution discontinue dans le temps, *Artemia* ayant la capacité de produire des oeufs cryptobiotiques afin de résister aux conditions adverses du milieu.

Différents auteurs (ARTOM, 1922, STELLA, 1933 et BARIGOZZI, 1957, in VIEIRA, 1989) tentèrent d'expliquer la distribution des différentes espèces sur base d'une relation existante entre le type de reproduction et le degré de ploïdie avec la latitude.

Ainsi, ARTOM (1922, in VIEIRA, 1989) a établi une distribution par régions biogéographiques dans tout l'hémisphère nord définissant la région Néarctique orientale (côte pacifique des Etats-Unis), la région Néarctique occidentale (côte atlantique des Etats-Unis) et la région Paléarctique (Europe occidentale). Selon lui, la région Néarctique occidentale est caractérisée par une prédominance de souches bisexuelles, tandis que dans la région Néarctique orientale prédominent les souches polyploïdes ou parthénogénétiques. Dans la région Paléarctique, par contre, prédomine une souche parthénogénétique diploïde.

Par contre, selon BARIGOZZI (1957, in VIEIRA, 1989), les différents degrés de ploïdies et les deux types de reproduction d'*Artemia* sont répartis sans règle apparente, montrant une distribution irrégulière parfaitement aléatoire.

MARGALEF (1974, in VIEIRA, 1989), affirme que les formes parthénogénétiques et polyploïdes sont généralement plus fréquentes dans les salines intérieures ou les lagons athalosalins, tandis que les formes bisexuelles sont plus amplement distribuées dans les salines littorales.

AMAT (1979) défend l'opinion de MARGALEF selon laquelle les différentes formes existantes se distribuent en accord avec la variation de température enregistrée annuellement dans les biotopes.

BROWNE (1984, in VIEIRA, 1989) suggère que les facteurs déterminant dans la distribution géographique d'*Artemia* sont la latitude et la polyplôidie. Ainsi, dans les zones de latitude élevée se rencontrent les formes parthénogénétiques polyploïdes, tandis que dans les zones de basse latitude se rencontrent les formes parthénogénétiques diploïdes et les formes bisexuelles.

Sur le continent américain, les formes présentes (*A. franciscana*) montrent une reproduction exclusivement bisexuelle diploïde (BROWNE et MACDONALD, 1982, in VANHAECKE et al., 1987), sauf dans les salines d'Argentine dont la forme rencontrée (*A. persimilis*) présente une hétéroploïdie avec la duplication d'une seule paire de chromosomes ( $2n+1$ ), ce qui provoque l'isolement reproductif (CLARK et BOWEN, 1976, ABREU-GROBOIS et BEARDMORE, 1980).

En Asie, toutes les formes rencontrées sont parthénogénétiques (*A. parthenogenetica*), sauf en Iran où se rencontre *A. urmiana*.

En Europe, Afrique et Australie se rencontrent à la fois les formes parthénogénétiques et bisexuelles. En Europe, prédominent les souches dont la reproduction est parthénogénétique (*A. parthenogenetica*) et les quelques populations bisexuelles rencontrées appartiennent à l'espèce *A. tunisiana* (VANHAECKE et al., 1987).

Au Portugal, les souches bisexuelles (*A. franciscana*) se rencontrent seulement dans les salines littorales comme celles de Aveiro, Faro, Castro Marim et Tavira. Il est à noter qu'*A. tunisiana* qui était une espèce autochtone a disparu, au moins depuis 1982 (NARCISO, 1989). La disparition de cette espèce est probablement en relation avec l'introduction intentionnelle ou non, au sud du Portugal, d'une espèce originaire des Etats-Unis: *A. franciscana*. Les souches parthénogénétiques se rencontrent à Aveiro, Figueira da Foz, Alcochete, Alcácer do Sal et

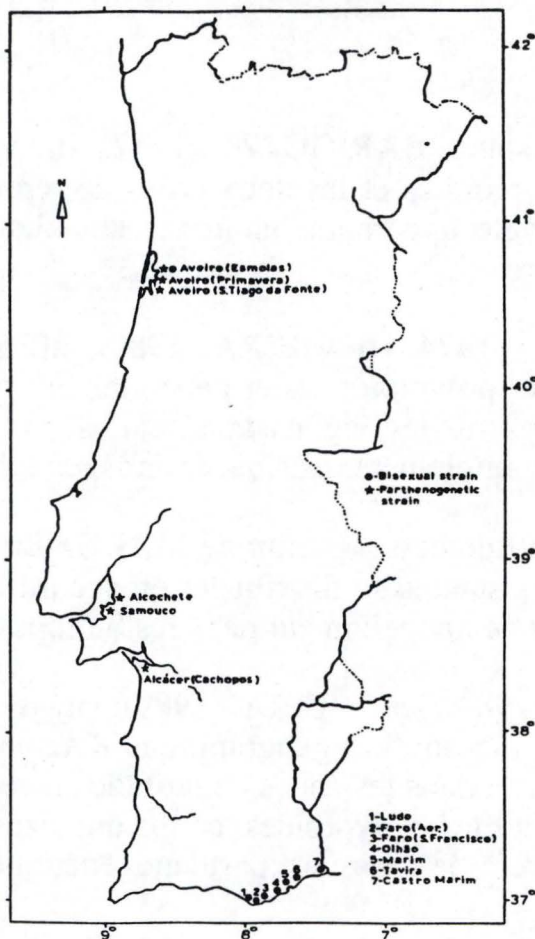


Fig.1.2. Distribution d'*Artemia* sp. au Portugal (d'après VILELA et BRANCO, 1987).

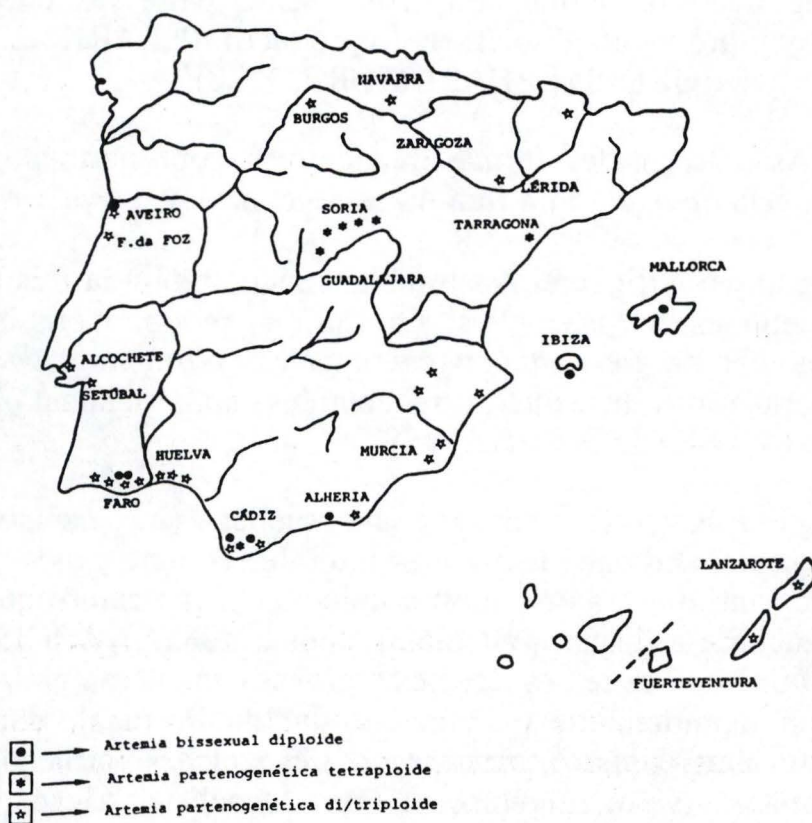


Fig.1.3. Distribution d'*Artemia* sp. sur la péninsule ibérique (d'après VIEIRA, 1989).

Setúbal (Fig.1.2). Pour synthétiser, dans les zones de hautes altitudes se rencontrent les formes bisexuelles, diploïdes et parthénogénétiques. Cependant, dans les zones où se rencontrent les formes bisexuelles, celles-ci peuvent alterner cycliquement avec les formes parthénogénétiques suivant la température. Ainsi, quand la température est basse prédominent les souches bisexuelles qui sont substituées par les souches parthénogénétiques lorsqu'est enregistrée une augmentation de celle-ci. Ce fait, qui avait déjà été observé par AMAT (1983, in VIEIRA, 1989) a été confirmé par ROMAN et RODRIGUEZ (1987, in VIEIRA, 1989) dans les salines de S. Fernando à Cádiz.

En ce qui concerne la globalité de la péninsule ibérique, nous vérifions qu'il existe une régularité de la distribution, excepté pour la forme bisexuelle qui apparaît dans les salines de Aveiro (Fig.1.3, VIEIRA et TELES, 1984). Deux hypothèses peuvent expliquer cette présence, ou la souche est réellement autochtone et ne se distribue donc pas en accord avec la latitude, ou celle-ci fut introduite par l'homme, les oiseaux ou le vent.

En règle générale, le caractère commun des biotopes où se rencontre *Artemia* est leur salinité élevée. La salinité est sans aucun doute le facteur abiotique prédominant qui détermine sa présence et qui limite donc sa distribution géographique. Ainsi, HAMMER, 1978 (in VANHAECKE et al., 1987) qui a étudié la présence d'*Artemia* ainsi que la salinité de 60 lacs salés de la région du Saskatchewan n'a trouvé celui-ci que dans 5 de ces lacs pour lesquelles la salinité était supérieure à 94‰. Une distribution analogue en fonction de la salinité a été rapportée par McCARRAHER, 1970 (in VANHAECKE et al., 1987) pour les lacs du Nebraska. D'un autre côté, *Artemia* n'est pas toujours présent dans les biotopes hautement salins comme c'est par exemple le cas en Australie (West Victoria) où il est absent de 15 lacs naturels salés (>100‰). Aucun des vecteurs de dispersion (le vent, les oiseaux ou l'homme) n'a apparemment permis la colonisation de ces lieux (VANHAECKE et al., 1987).

Malgré l'existence d'un grand nombre de vecteurs, *Artemia* n'existe pas dans toutes les salines. Ce fait peut être lié à deux situations (PAULO, 1992):

- les facteurs climatiques;
- salines dont l'isolement ne permet pas sa dispersion naturelle.

Ainsi, la distribution des biotopes d'*Artemia* selon les différents types de climat définis par THORNTHWAITE (1948, in VANHAECKE

et *al.*, 1987) révèle que la distribution géographique de la petite crevette est limitée par les conditions climatiques. Ce crustacé n'est trouvé que dans les biotopes localisés sous des climats perhumide ou humide et 97% de ces biotopes sont situés dans des régions où l'évaporation annuelle excède la précipitation annuelle. Les 3% restant sont trouvés sous le climat humide/sub-humide (France, Inde, Argentine, Japon). Les populations d'*Artemia* sont par contre absentes sous les climats de toundra et de gel, les basses températures ne permettant pas leur développement, ainsi que sous les climats tropicaux humides, comme c'est le cas pour les salines de Thaïlande, des Philippines et d'Indonésie, où la pluviosité élevée ne permet pas la fixation des populations (VANHAECKE et *al.*, 1987, NARCISO, 1987).

Une deuxième raison au fait qu'*Artemia* n'existe pas dans toutes les salines est due à son incapacité de migration d'une saline à l'autre par la mer, cet organisme ne possédant aucune structure de défense contre la prédation.

L'impact d'autres paramètres tels la température, l'intensité lumineuse, la production primaire sur la distribution de ce petit crustacé est limité au développement quantitatif de la population ou peuvent, éventuellement, causer son absence temporaire (VANHAECKE et *al.*, 1987).

### I.3. Ecologie d'*Artemia* sp.

#### I.3.1. Les mécanismes d'adaptation physiologique.

A cause de sa faible défense anatomique contre la prédation, *Artemia* a développé différents mécanismes d'adaptation physiologique à des biotopes de salinités élevées, se procurant ainsi un moyen de défense écologique effectif.

Ces organismes sont en effet capables de synthétiser différentes hémoglobines afin de pallier aux basses teneurs en oxygène dissous existantes dans les milieux de hautes salinités, de produire des cystes cryptobiotiques lorsque les conditions ambiantes deviennent défavorables pouvant mettre en danger la survie de l'espèce. Ainsi, durant certaines périodes de l'année, de grandes quantités de minuscules particules (200-300  $\mu\text{m}$  de diamètre) apparaissent, flottant à la surface de l'eau. Ces particules sont des oeufs en cryptobiose (ou cystes) d'*Artemia* (SORGELOOS et *al.*, 1986).

La cryptobiose est un terme général décrivant les états de l'organisme (dormance et quiescence) qui ne montrent pas de signe de vie visible et pour lequel l'activité métabolique devient difficilement mesurable.

Grâce à ces adaptations, il est donc possible de rencontrer des populations d'*Artemia* sp. dans des biotopes salins où la salinité est supérieure aux limites de tolérance de ses prédateurs. Des prédateurs existent cependant tels les oiseaux pour qui la barrière saline n'existe pas. Pour certaines espèces (*Himantopus himantopus*, *Tadorna tadorna*, *Recurvirostra avosetta*, *Larus fuscus*,...), *Artemia* constitue même la principale nourriture durant certaines époques de l'année (NARCISO, 1987).

### I.3.2. Les moyens de dispersion.

Les mécanismes de dispersion sont essentiellement passifs, comme par exemple le transport par le vent, les oiseaux marins, ainsi que l'introduction par l'homme (NARCISO, 1982).

Les oiseaux constituent le meilleur moyen de dispersion d'*Artemia*, non seulement par transport externe (adhérence des cystes aux pattes et plumes) mais aussi par transport interne. En effet, les oiseaux peuvent s'alimenter de femelles adultes contenant des cystes dans l'utérus, ceux-ci se retrouvent dans le tube digestif de l'oiseau et sont ainsi dispersés à des centaines de kilomètres (NARCISO, 1987). La majeure partie des cystes ingérés sont en effet capables de résister aux enzymes digestives étant toujours viables lorsqu'ils sont excrétés (MACDONALD, 1980). Ainsi, les oiseaux ont été responsables du transfert d'*Artemia* du nord au sud en Europe et en Afrique, ainsi que de sa distribution en Inde (ROYAN *et al.*, 1970, ACHARI, 1971, *in* VANHAECKE *et al.*, 1987).

Un deuxième mode de dispersion est le transport par le vent, les cystes pouvant ainsi inoculer d'autres lieux salins.

Un troisième mode de dispersion consiste en l'intervention de l'homme. GEDDES (1980) a montré que toutes les populations existantes en Australie ont probablement été importées par l'homme. Les saliniers qui considèrent que celui-ci a une influence positive dans la production de sel, inoculent les lieux de production soit avec des cystes, soit avec des adultes (NARCISO, 1987). Toutes les populations (*A. parthenogenetica* et *A. franciscana*) qui se rencontrent en Australie ont probablement été importées suivant ce mode de dispersion, celles-ci étant très similaires aux populations de la baie de San Francisco (PERSOONE et SORGELOOS, 1980).

### I.3.3. Les niveaux de tolérance.

*Artemia* est sujet aux variations écologiques du milieu dans lequel il vit et il montre une grande résistance à la variation de nombreux facteurs environnementaux.

#### I.3.3.1. La température.

La majorité des souches, à l'état adulte, ne semble pas survivre à des températures inférieures à 6°C. La température maximum tolérée varie aux alentours de 36°C. Cependant, ces niveaux de tolérance varient suivant les souches. En moyenne, la température optimum se situe entre 25 et 27°C. Sous la forme de cystes déshydratés, ils peuvent résister à une plus large gamme de température, la limite minimale étant le zéro absolu (-273°C) et le maximum se situant entre 60 et 70°C, pour autant qu'ils ne soient pas exposés à ces températures durant une longue période (CLEGG et CONTE, 1980).

#### I.3.3.2. La composition ionique du milieu.

*Artemia* résiste à des milieux dont la balance ionique est différente de celle de l'eau de mer. Ainsi, la balance ionique  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  qui est de 28 dans l'eau de mer atteint des valeurs comprises entre 8 et 173 dans certains habitats où se rencontre *Artemia*. Il est également présent dans les lieux où la balance ionique  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3^{--}$  varie de 86 à 137, la valeur en eau de mer étant de 173. En ce qui concerne la balance  $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{--}$ , les valeurs varient de 0,5 à 90; celle en eau de mer étant de 7 (COLE et BROWN, 1967).

#### I.3.3.3. La salinité.

*Artemia* est un organisme euryhalin, il est en effet capable de supporter de grandes différences de salinité. La limite inférieure, dans la majorité des cas, n'est pas fonction de la capacité de l'animal à pouvoir supporter de telles valeurs, mais de la présence de prédateurs. En réalité, il est peu fréquent de le rencontrer dans la nature à des salinités inférieures à 45‰, celui-ci étant pourtant physiologiquement capable de supporter des salinités inférieures (PERSOONE et SORGELOOS, 1980).

En règle générale, la limite minimum de salinité où il soit possible de rencontrer *Artemia* varie région par région et est déterminée par la limite maximum de tolérance de salinité du ou des prédateurs locaux (PERSOONE et SORGELOOS, 1980). Selon HEDGPETH (1959, in

NARCISO, 1982), diverses espèces de poissons et de crustacés ont des limites de tolérance supérieures à 100‰, quelques espèces de poissons pouvant même survivre à des salinités de l'ordre de 130‰.

Au contraire de ce qui se passe avec la température, il n'existe pas un optimum bien défini de salinité. Cependant, pour des raisons physiologiques, cet optimum doit se situer près de la limite inférieure de tolérance car, soumis à des salinités élevées, *Artemia* doit dépenser beaucoup plus d'énergie pour assurer son osmorégulation (NARCISO, 1982).

Un des aspects le plus important de la salinité sur le cycle de vie de la petite crevette est l'effet de ce facteur physico-chimique sur le métabolisme des cystes. Le développement des cystes est initié quand la salinité du milieu est inférieure à une valeur déterminée qui varie souche par souche. En général et pour quasi toutes les souches, les cystes n'éclosent pas à des salinités supérieures à 85‰, ceux-ci n'ayant pas la possibilité de s'hydrater suffisamment pour initialiser leur métabolisme d'éclosion (PERSOONE et SORGELOOS, 1980).

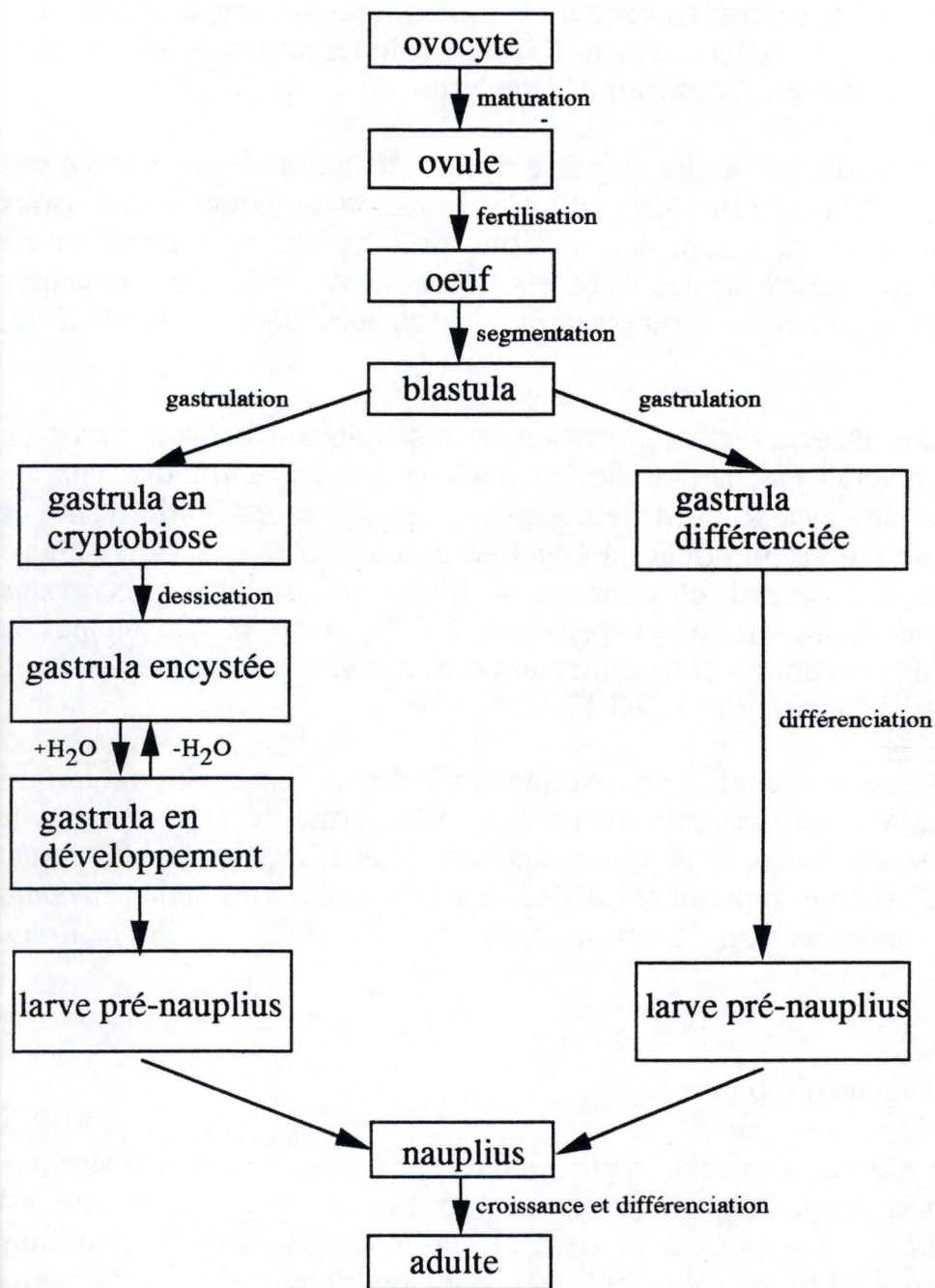
La variation de salinité provoque aussi chez *Artemia* des altérations morphologiques, spécialement au niveau de la forme de la fourche et le nombre de soies. Sur base de ces caractères, de nombreuses formes furent considérées comme appartenant à des espèces différentes telles *Artemia typica*, *A. mulhausenei*, *A. principalis*, *A. arietina*, *A. koppeniana*. (VIEIRA, 1989).

#### I.3.3.4. L'oxygène dissous.

*Artemia* est un animal typiquement "euryxybionte", il peut survivre à la fois dans des milieux dont la concentration en oxygène dissous est inférieure à 1%, ainsi qu'à des niveaux de l'ordre de 150 % de la saturation. Le niveau optimum se situe pourtant près du niveau de la saturation (PERSOONE et SORGELOOS, 1980).

#### I.3.3.5. Le pH.

Dans la nature, *Artemia* se rencontre dans des eaux neutres ou alcalines mais, l'influence du pH sur les juvéniles et les adultes est peu connue. Cependant, en relation avec les cystes, il apparaît avoir une certaine importance puisque l'efficacité d'éclosion baisse considérablement quand le pH est inférieur à 8 (PERSOONE et SORGELOOS, 1980), celle-ci étant maximale à un pH se situant entre 8,8 et 9 pour *A. franciscana* et *A. parthenogenetica*.



**Fig.1.4.** Schéma de l'évolution de la reproduction sexuée chez *Artemia* (modifié, d'après AMAT, 1985).

## I.4. Reproduction et cycle de vie.

La stratégie de reproduction d'*Artemia* est typique des invertébrés habitant des environnements instables. Celle-ci consiste en l'investissement d'énergie dans la production de nombreux descendants et la production d'embryons sous la forme de cystes (D'AGOSTINO, 1980).

ovoviviparité

### I.4.1. Types de reproduction.

*Artemia* sp. montre les deux types de reproduction suivants: bisexuel (la population est constituée de mâles et de femelles en égale proportion) et parthénogénétique (la population n'est formée que de femelles, la proportion des mâles étant de 1 à 4 pour 1000 femelles). Il n'a jamais été mis en évidence une souche ayant une alternance de ces deux types de reproduction comme c'est par exemple connu chez un cladocère, *Daphnia* sp. (AMAT, 1979).

Les femelles de l'un et l'autre type peuvent produire deux types d'oeufs:

- ceux dont le développement embryonnaire se déroule dans l'utérus de la femelle donnant naissance directement à une forme de nauplius libre (**ovoviviparité**);
- ceux se développant jusqu'au stade de gastrula, qui sont ensuite couverts par un chorion et libérés sous la forme de cystes (**oviparité**) pouvant résister aux mauvaises conditions du milieu. Lorsque les conditions redeviennent favorables, ils peuvent reprendre leur développement (NARCISO, 1987).

La Fig.1.4 représente le schéma de l'évolution du type d'oeufs produit chez *Artemia*.

A cause d'une certaine confusion dans la littérature sur la cryptobiose, il est utile de définir les différents états d'arrêt métabolique. Parmi ces états, il faut distinguer la dormance et la quiescence. La dormance est une forme spécifique de la cryptobiose mais dont le contrôle du métabolisme et du développement des cystes est endogène. La quiescence par contre, se réfère à un contrôle environnemental du métabolisme et du développement. L'embryogenèse ne reprend que lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables.

Il existe différents types de quiescence: l'anhydrobiose (manque d'eau), la cryobiose (basses températures), l'anoxybiose (manque

• **dormance**

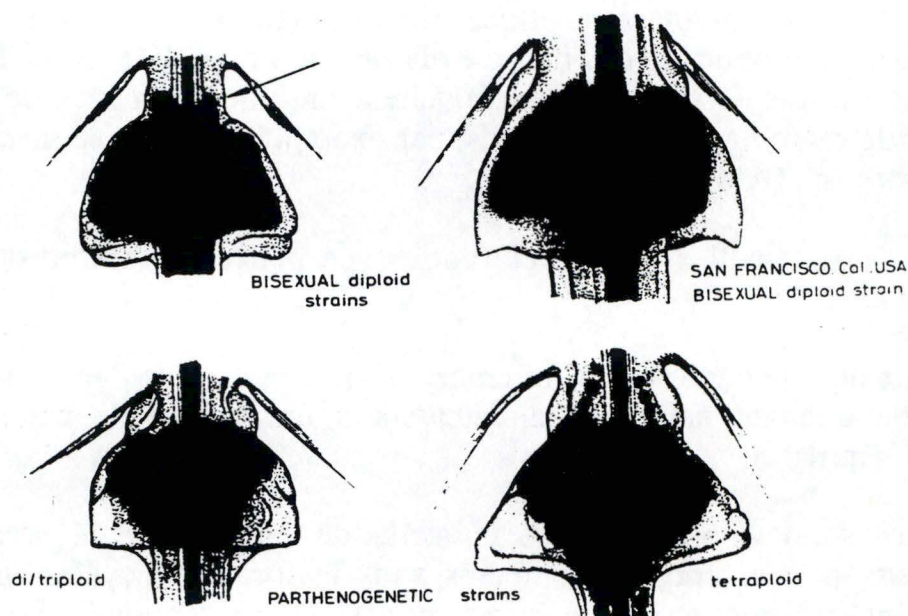
Contrôle endogène du métabolisme et du développement.

• **quiescence**

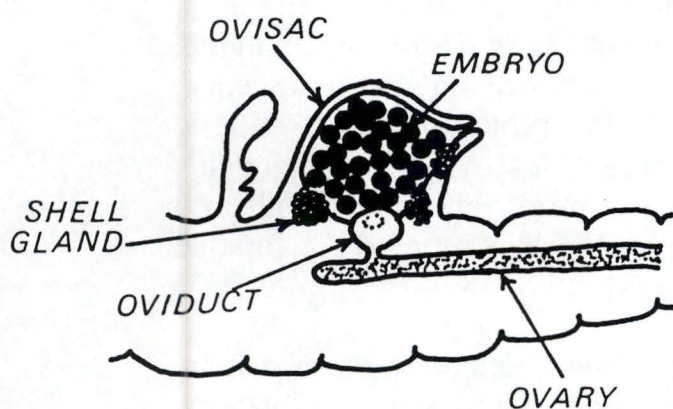
Contrôle environnemental du métabolisme et du développement.

ex.: anhydrobiose  
cryobiose  
anoxybiose  
osmobiose.

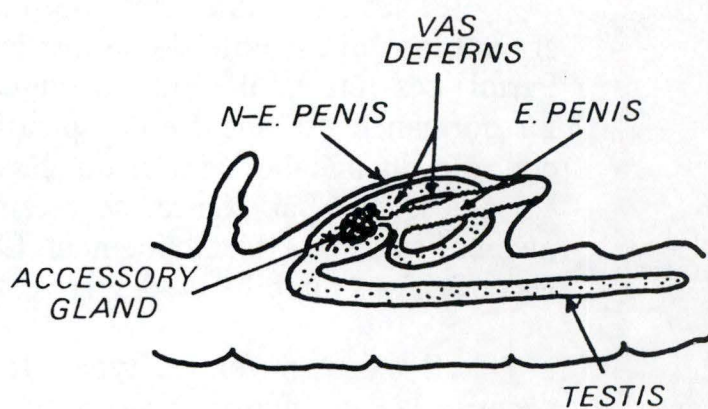
**Fig.1.5.** Figure montrant les différents états d'arrêt métabolique (d'après LAVENS et SORGELOOS, 1987).



**Fig.1.6.** Morphologie de l'ovisac chez différentes souches (bisexuelle de San Francisco Bay et parthénogénétiques d'Espagne) (d'après DOMENECH, 1980).



**Fig.1.7.** Diagramme du système reproducteur femelle adulte (d'après LOCHHEAD, in CLEGG et CONTE, 1980).



**Fig.1.8.** Diagramme du système reproducteur mâle adulte (d'après WOLFE, 1971, in CLEGG et CONTE, 1980).

d'oxygène),... (Fig.1.5). Le terme diapause est également fréquemment utilisé et indique l'état de dormance où l'arrêt du développement est initié par des facteurs internes avant que l'environnement ne devienne défavorable (LAVENS et SORGELOOS, 1987). Selon OLSON et CLEGG (1976, in LAVENS et SORGELOOS, 1987), cet état de dormance est programmé dans le développement indépendamment de l'origine géographique ou des conditions environnementales. Par contre, dans l'état de quiescence, le développement peut seulement avoir lieu quand le ou les mécanisme(s) responsable(s) de l'induction de la diapause est(sont) désactivé(s).

Dans les deux types de reproduction, une femelle adulte en parfait état reproductif peut libérer entre 100 et 400 nauplii ou cystes (VIEIRA, 1989).

## **I.4.2. Reproduction.**

### **I.4.2.1. Description de l'appareil reproducteur.**

L'appareil reproducteur des femelles, à la fois parthénogénétiques et bisexuelles, est similaire malgré l'existence de quelques différences morphologiques surtout au niveau de la forme du sac ovigère (Fig.1.6) (YANENG, 1987). Il est constitué de deux ovaires tubulaires, disposés parallèlement entre le 6<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> segment d'où partent les oviductes qui débouchent dans l'utérus ou bourse ovigère (Fig.1.7) (AMAT, 1985).

Chez les mâles, l'appareil reproducteur est formé par la fusion des segments génitaux. Ceux-ci résultent d'une modification des deux premiers segments abdominaux, qui comme chez les femelles, fusionnent et donnent origine aux deux pénis du mâle et à la bourse ovigère de la femelle (AMAT, 1985). Anatomiquement, celui-ci est constitué par deux testicules disposés parallèlement. Ceux-ci communiquent avec les vésicules séminales et postérieurement avec les vases déférents (Fig.1.8). Les mâles parthénogénétiques, malgré leur absence d'intervention dans le processus de reproduction, possèdent un appareil copulatoire fonctionnel et bien formé. La proportion des mâles dans une population parthénogénétique est de un à quatre mâles sur 1000 femelles. Ce fait semble lié à des événements déterminés ayant lieu durant le mécanisme de maturation des oocytes et qui permettent la formation du sexe homogamique (PAULO, 1992).

xx xy

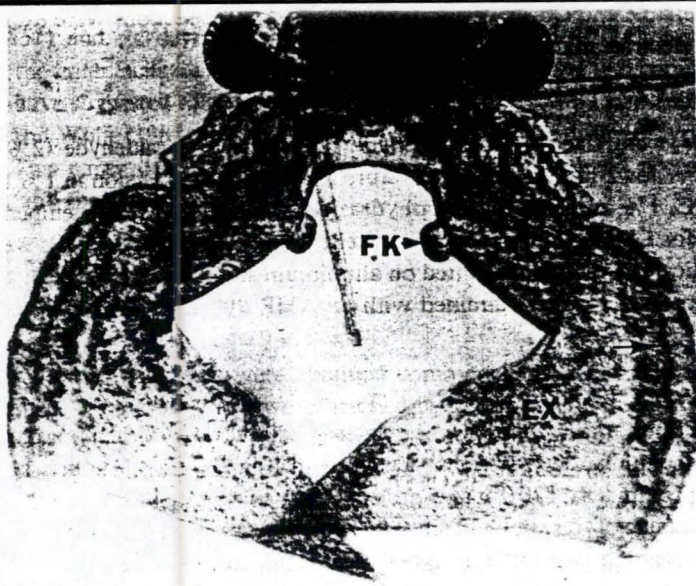


Fig.1.9. Figure représentant la tête du mâle et montrant la position des protubérances frontales (frontal knob=FK) sur le protopodite (PR) (d'après WOLFE, 1980).

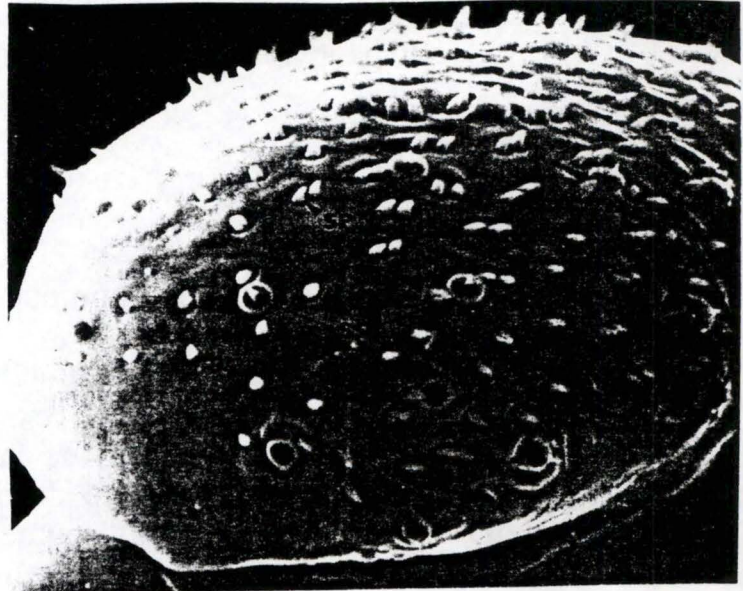


Fig.1.10. Micrographie électronique d'une protubérance frontale montrant l'arrangement et la distribution des épines (SP) et soies sensorielles (SS). Grossissement: x1100 (d'après WOLFE, 1980).

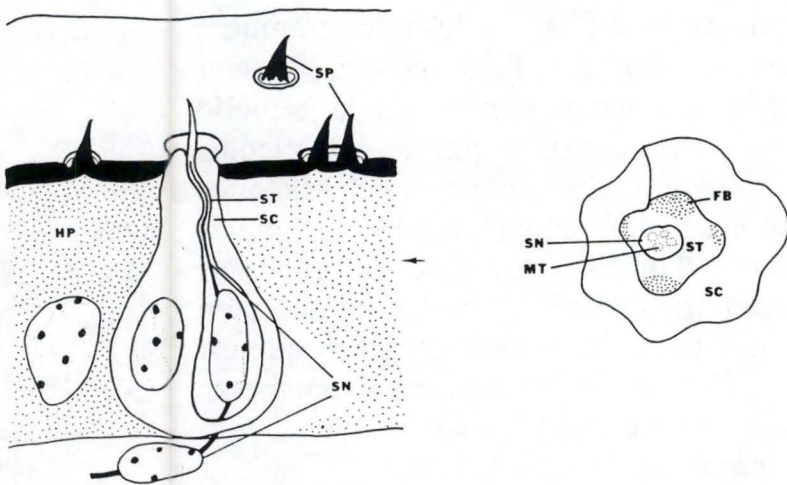


Fig.1.11. Diagramme des épines (SP) et soies sensorielles sur la protubérance frontale. La soie sensorielle consiste en une cellule de soutien (SC), une cellule "setal" (ST) et un neurone sensoriel (SN). Ces soies sensorielles sont entourées par l'hypoderme (HP) (d'après WOLFE, 1980).

Fig.1.12. Photo représentant le mâle et la femelle en position de pré-copulation (d'après SORGELOOS, 1980).

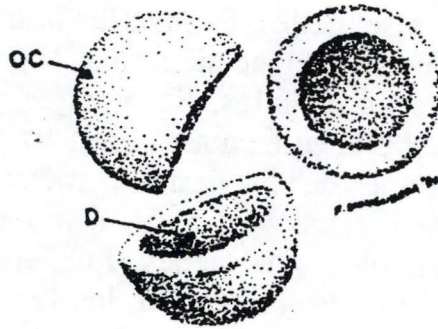


#### I.4.2.2. Reproduction proprement dite.

Dans les populations bisexuelles, lorsque les individus ont atteint la maturité sexuelle, chaque mâle s'accroche au dernier segment thoracique de la femelle grâce à ses pinces musculaires. Sur chaque protopodite de ces pinces est localisée une protubérance frontale (Fig.1.9). Ces protubérances facilitent l'étreinte et la tenue de la femelle spécialement durant la copulation. En effet, sur leur surface sont localisées deux types différents d'excroissances: les épines et soies sensorielles (Fig.1.10). Les épines sont constituées de matériel cuticulaire sécrété par les cellules de la couche hypodermique et sont remplacées à chaque mue. Dans la position normale d'étreinte, ces protubérances frontales sont en étroit contact avec le premier segment génital de la femelle. Comme les épines sont constituées entièrement de matériel cuticulaire sans éléments neuronaux associés, ces nombreuses et petites excroissances sont probablement des modifications de la surface des protubérances frontales. Leur courbure postérieure et leur distribution tout près du centre et de la partie médiane postérieure facilitent également l'étreinte et le maintien de la femelle durant la copulation. En ce qui concerne les soies sensorielles, elles sont constituées des mêmes composantes de base des mécanorécepteurs de beaucoup d'arthropodes: une cellule de soutien (tormogen cell), une cellule "setal" (trichogen cell) et un neurone sensoriel (Fig.1.11). Ceux-ci seraient capables de percevoir des stimuli tactiles. Or SCHWARTZKOPFF (1974, in WOLFE, 1980) a montré l'importance des stimuli tactiles dans l'initiation et le maintien de la copulation. Ils seraient donc également impliqués dans le comportement reproducteur.

Entretemps, chez la femelle débute l'ovogenèse. Les oeufs se développent dans les deux ovaires tubulaires situés au niveau de l'abdomen. Postérieurement, les oocytes se trouvant dans une phase plus avancée de maturation migrent dans l'utérus via les deux oviductes (SORGELOOS et *al.*, 1986). Le mâle, dans la position de pré-copulation, introduit un des pénis dans l'utérus de la femelle (Fig.1.12) fécondant ainsi les oeufs (AMAT, 1979). Comme déjà dit, les soies sensorielles seraient impliquées dans l'initiation de la copulation, ces mécanorécepteurs pouvant en effet percevoir les mouvements des ovules allant des oviductes à l'ovisac. De plus, les dépressions latérales de la femelle, en étroit contact avec les protubérances du mâle, sont localisées à proximité de la région où les oviductes pénètrent dans l'ovisac (WOLFE, 1980).

Après fécondation, les oeufs se développent en nauplii qui sont libérés par la mère. Dans des conditions extrêmes, les glandes coquillères localisées de chaque côté de l'utérus deviennent actives et accumulent un produit de sécrétion brun (hématine). Ce produit de sécrétion couvre les embryons se trouvant au stade de gastrula formant ainsi un chorion



40X

Fig.1.13. Représentation des cystes déshydratés (d'après VOS et DE LA ROSA, 1980).

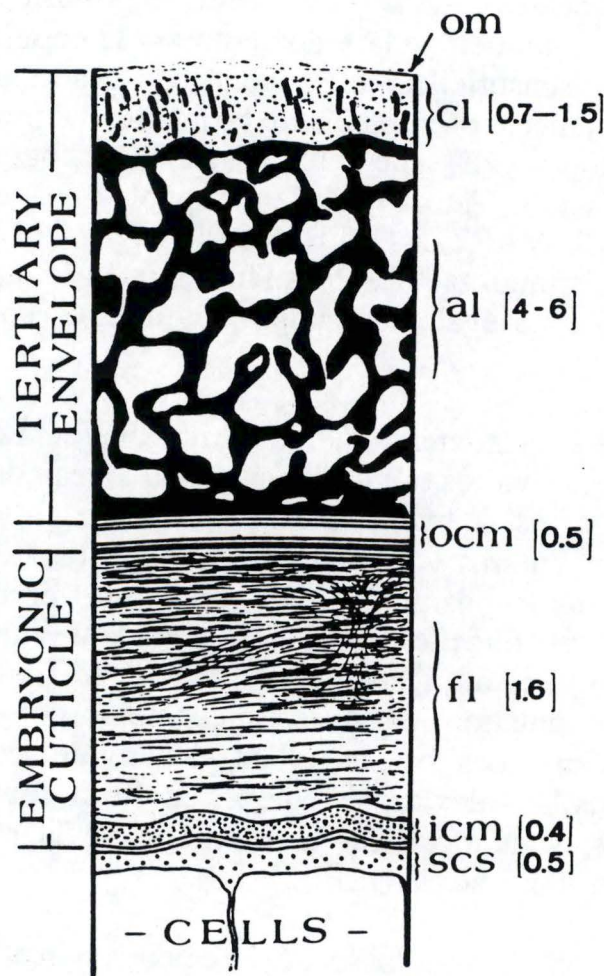


Fig.1.14. Diagramme représentant la structure de la paroi des cystes (d'après MORRIS et AFZELIUS, 1967, ANDERSON et *al.*, 1970, in CLEGG et CONTE, 1980).

**Légende:** om: membrane externe; cl: couche corticale; al: couche alvéolaire; oem: membrane cuticulaire externe; fl: couche fibreuse; icm: membrane cuticulaire interne; scs: espace sous-cuticulaire.

Les nombres entre [ ] représentent l'épaisseur approximative en  $\mu\text{m}$ .

protecteur. Ils entrent donc en cryptobiose et sont ensuite relâchés par la femelle (SORGeloos et *al.*, 1986). Si la sécrétion est peu abondante, l'aspect des cystes est similaire mais l'éclosion aura lieu quelques heures après (AMAT, 1979); ceux-ci sont nommés oeufs d'été.

Au niveau de la reproduction parthénogénétique, la fertilisation n'est pas nécessaire et le développement embryonnaire commence dès que les oeufs ont atteint l'utérus.

## I.5. Les cystes.

### I.5.1. La morphologie.

Le diamètre des cystes varie entre 200 et 270  $\mu\text{m}$ , suivant la provenance géographique de la souche. Quand ils sont hydratés, ceux-ci se trouvent sous la forme sphérique mais, après déshydratation, ils présentent une forme semi-sphérique dont l'une des hémisphères est presque totalement invaginée dans l'autre (Fig.1.13) (NARCISO, 1982).

Comme déjà cité, les cystes qui sont des gastrulas enveloppées par une cuticule peuvent rester en cryptobiose ou retourner à leur métabolisme selon les conditions ambiantes. D'autres organismes, comme les nématodes et les tardigrades, peuvent aussi subir des processus d'hydratation/déshydratation réversibles mais, ils maintiennent toujours un niveau métabolique bas. Par contre, les cystes d'*Artemia* sp. peuvent être, pour de longues périodes, complètement déshydratés (teneur en eau inférieure à 10%) et complètement amétaboliques (CLEGG, 1967 et DUTRIEU, 1960, in NARCISO, 1987).

La paroi des cystes n'est pas homogène, elle possède deux composantes principales: le chorion et la cuticule embryonnaire (NARCISO, 1987). Ces différentes couches sont schématisées à la Fig.1.14.

#### I.5.1.1. Le chorion.

Il s'agit d'une couche faite de lipoprotéines, imprégnée de chitine et d'hématine. La fonction principale de cette couche est de fournir une protection à l'embryon contre une éventuelle rupture mécanique et contre les radiations (U.V. du soleil). Cette couche peut être dissoute par un traitement oxydant avec de l'hypochlorite (décapsulation) (SORGeloos et *al.*, 1986).

Le chorion (6-8  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) peut se différencier en :

- couche corticale (1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) avec des pores de 300 Å orientés radialement et qui paraissent être remplis de cire. Il existe une fine couche supra-corticale (de 600 Å) qui enveloppe tout l'oeuf formant une superficie cérébelleuse/cuticulaire,

- couche alvéolaire constituée par un système complexe de chambres communicatives à travers de minuscules pores semblables à ceux existant dans la couche corticale. Ces chambres sont remplies d'air, paraissant être responsables de la flottabilité des cystes lorsqu'ils sont déshydratés,

- la membrane cuticulaire externe qui sépare le chorion de la cuticule embryonnaire. Elle consiste en une membrane triple de 1 à 1,2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Elle fonctionne comme une barrière relativement perméable et protège l'embryon de la pénétration de molécules plus grandes que le  $\text{CO}_2$  (SORGELOOS et *al.*, 1986).

#### I.5.1.2. La cuticule.

Celle-ci peut se diviser en :

- couche fibreuse qui est semblable à l'endocuticule de l'exosquelette des crustacés. Cette couche est formée par de la chitine et des protéines;

- la membrane cuticulaire interne qui se situe à la partie la plus interne de la paroi et qui est séparée des cellules de l'embryon par un espace de plus ou moins 0,2  $\mu\text{m}$ . Cette membrane fonctionne probablement comme la couche interne de la cuticule des crustacés, protégeant l'animal lors de la mue;

- la membrane embryonnaire.

#### I.5.2. Effet de différents facteurs sur la formation des cystes.

Suivant des situations déterminées, les femelles d'*Artemia* alternent leur mode de reproduction, cette dualité oviparité/ovoviviparité étant assez obscure. En effet, les causes qui mènent à la formation des cystes ne sont pas encore bien définies. DUTRIEU (1960) affirme que ce sont les altérations des conditions environnementales et principalement la salinité, l'oxygène, la quantité ou la qualité de la nourriture qui stimulent la glande coquillère et donc la formation du chorion. D'autres auteurs (DUTRIEU,

**Tab.1.2. Pourcentages d'oviparité observés chez les femelles d'*Artemia* ayant atteint leur maturité sous 7 conditions différentes de salinité (d'après Berth et Okazaki, 1987).**

Salinity (‰)	Replicates			Total
	1	2	3	
<b>Series 1</b>				
15	17 (6)	50 (4)	67 (6)	44 (16)
30	25 (8)	50 (6)	100 (1)	40 (15)
45	36 (14)	13 (8)	13 (8)	23 (30)
80	0 (11)	0 (12)	0 (12)	0 (35)
<b>Series 2</b>				
30	12 (26)	17 (29)	52 (31)	25 (76)
80	17 (18)	46 (13)	17 (24)	24 (55)
120	8 (39)	10 (30)	3 (29)	7 (98)
150	4 (23)	7 (15)	7 (28)	6 (66)
180	7 (15)	4 (27)	0 (11)	4 (53)

1960, D'AGOSTINO, 1980, AMAT, 1985, BERTHELEMY-OKAZAKI et HEDGECK, 1987, LAVENS et SORGELOOS, 1987, BROWNE, 1988), sont également d'accord avec cette idée mais, ajoutent également la participation de facteurs intrinsèques propres à chaque souche.

#### I.5.2.1. Facteurs environnementaux.

##### I.5.2.1.1. La salinité.

La salinité, en plus de provoquer des variations morphologiques, peut influencer la production de cystes par l'activation des glandes coquillères.

BERTHELEMY-OKAZAKI et HEDGECK (1987) ont testé l'influence de la salinité. L'oviparité décroît de 44 à 40 à 23 et à 0% lorsque la salinité augmente respectivement de 15 à 30 à 45 et à 80‰ (Tab.1.2). D'un autre côté, des salinités supérieures à 120‰ inhibent la formation de cystes au moins lors des trois premières pontes, le pourcentage d'oviparité diminuant fortement dans un gradient de salinité de 80 à 180‰ (Tab.1.2).

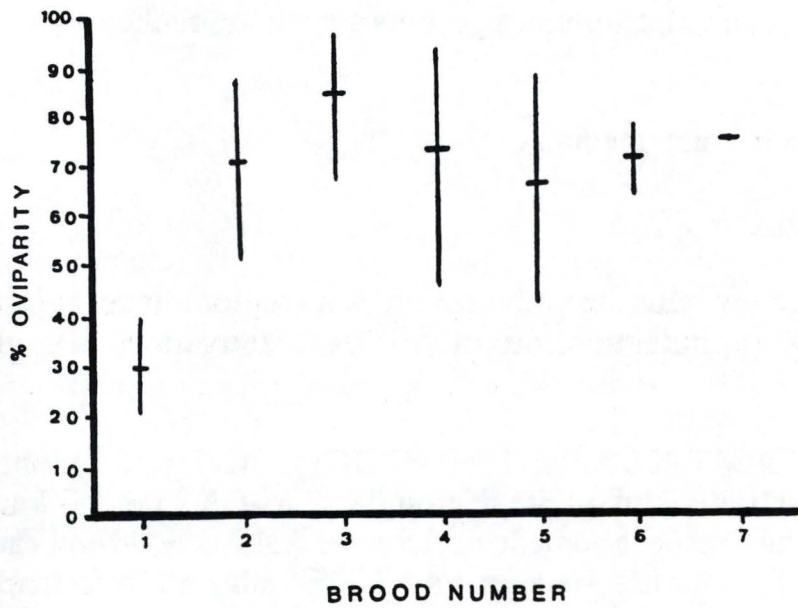
chiffres ?  
de 2 mois

##### I.5.2.1.2. L'oxygène.

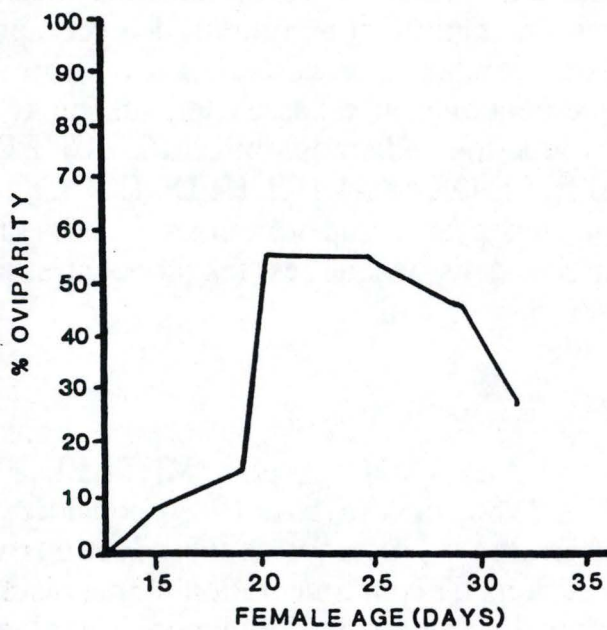
Une des caractéristiques d'*Artemia* sp. consiste dans le fait que des milieux ayant une faible teneur en oxygène dissous stimulent la synthèse d'hémoglobine. Etant donné que l'hématine est un produit de décomposition de l'hémoglobine et est une des composantes essentielles du chorion, sa formation doit être intrinsèquement liée aux basses teneurs en oxygène dissous qui stimulent la production d'hémoglobine (GILCHRIST et GREEN, 1960, in BERTHELEMY-OKAZAKI et HEDGECK, 1987, HEIP et al., 1978). De fait, les cystes sont produits à des salinités supérieures à 150‰ (conditions dans lesquelles les concentrations en oxygène sont faibles).

##### I.5.2.1.3. L'hypoalimentation.

Différents auteurs (BALLARDIN et METALI, 1963; MECDERMOTT, 1974, LENZ, 1980, in VIEIRA, 1989) considèrent que c'est l'hypoalimentation qui détermine le processus de reproduction ovipare. Les femelles d'*Artemia* en conditions d'hypoalimentation emmagasinent du glycogène qui est utilisé durant le processus d'ovulation. Le glycogène subit la glycogénolyse avec incorporation du glucose dans l'hémolymphe qui sera utilisé comme source énergétique par les oocytes. D'un autre côté,



**Fig.1.15.** Pourcentage des femelles d'*Artemia* ovipares en fonction de la séquence de ponte (d'après BERTHÉLÉMY et OKAZAKI, 1987).



**Fig.1.16.** Pourcentage des femelles d'*Artemia* ovipares en fonction de l'âge où elles atteignent leur maturité sexuelle (d'après BERTHÉLÉMY et OKAZAKI, 1987).

les bas niveaux de glycogène stimulent et provoquent des processus biosynthétiques alternatifs conduisant à la biosynthèse et au stockage du tréhalose, carbohydate de réserve propre aux états de cryptobiose (CLEGG, 1974).

#### I.5.2.2. Facteur endogène: le nombre de pontes.

Selon des expériences menées par BERTHELEMY-OKAZAKI et HEDGECOCK (1987), le pourcentage de femelles ovipares augmente de 33% (à la première ponte) à 65-85% lors des pontes suivantes (Fig.1.15). Les analyses statistiques montrent que l'effet du nombre de pontes est très significatif ( $G=169.69$ ,  $ddl=2$ ,  $p<0.005$ ). Par conséquent, l'âge des femelles influence le mode de reproduction.

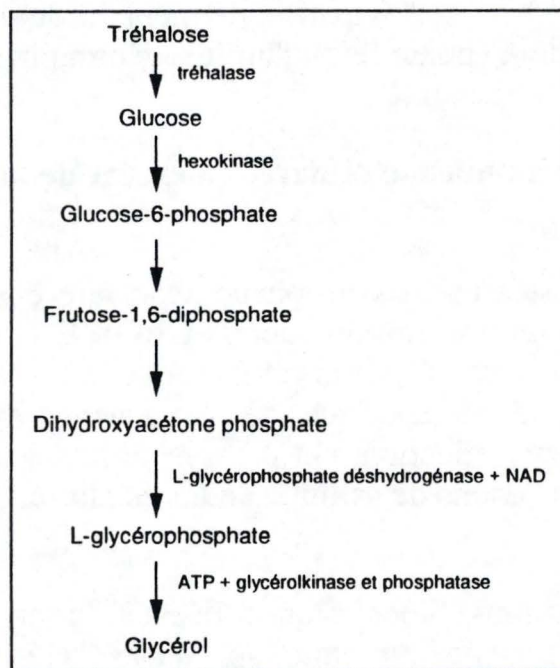
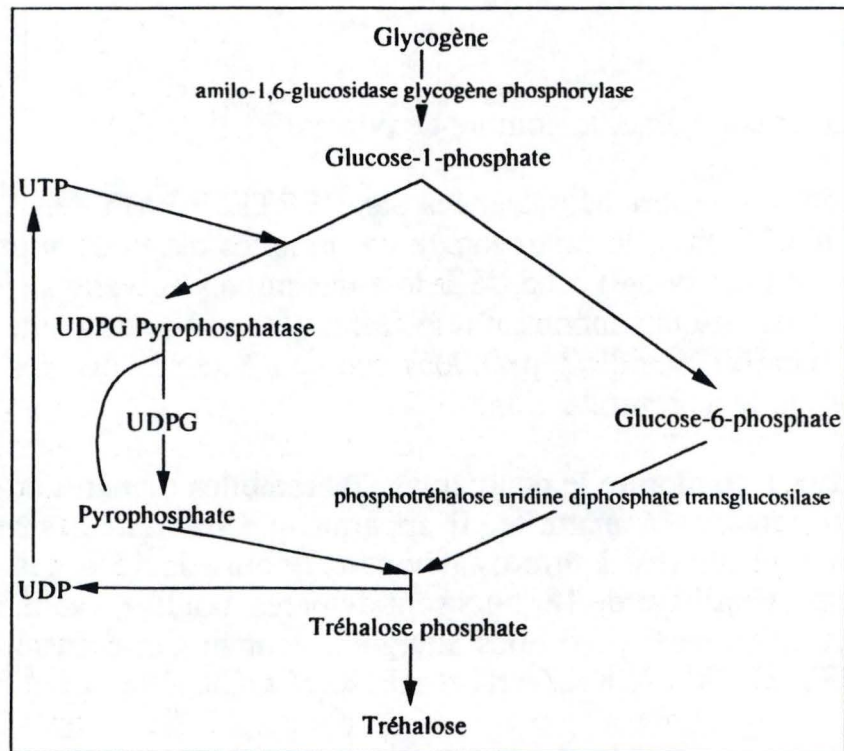
La Fig.1.16 montre le pourcentage de femelles ovipares en fonction de l'âge des femelles à maturité. Il apparaît que les femelles arrivant à maturité plus tôt tendent à être ovovivipare. Moins de 15% des femelles étant matures avant l'âge de 18 jours sont ovipares, tandis qu'au moins 50% des femelles sont ovipares si elles atteignent leur maturité entre 20 et 27 jours (BERTHELEMY-OKAZAKI et HEDGECOCK, 1987).

BROWNE (1980) a également montré l'effet du nombre de pontes sur la formation des cystes, l'oviparité augmentant de 10 à 60% entre la troisième et la quinzième ponte selon l'origine géographique des souches.

#### I.5.3. Reprise du métabolisme et développement de la gastrula à l'état de nauplius.

La cryptobiose n'est pas un phénomène rare chez les invertébrés vivant dans des conditions très variables. CROWE (1971) et HINTON (1968) découvrirent que l'état cryptobiotique est caractérisé par la réduction de l'activité métabolique de l'organisme avec l'arrêt de la croissance ou de la reproduction, cet organisme possédant la capacité de tolérer de grandes variations de salinité, de température, de radiations et de pH.

Les modifications biochimiques liées à la cryptobiose ont été étudiées profondément chez *Artemia* sp. WEISZ (1947, in NARCISO, 1987) avait déjà montré que sur des embryons d'environ 70 cellules, les embryons cryptobiotiques contenaient environ 8 fois plus de tréhalose que les embryons non cryptobiotiques. CLEGG (1965, in NARCISO, 1987) a étudié les concentrations de glycérol, de glycogène et de tréhalose dans les embryons se trouvant encore dans l'utérus des femelles. Il a démontré que cette augmentation de la concentration de tréhalose est accompagnée par



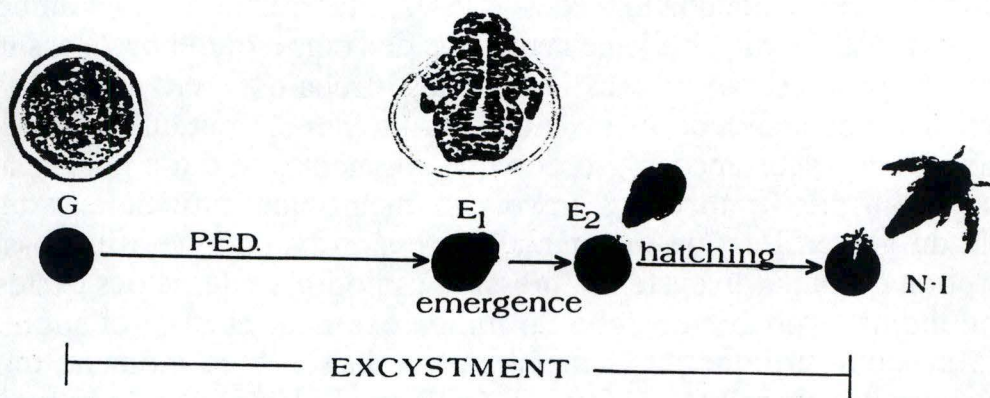
**Fig.1.17.** Figure représentant les processus de synthèse du trehalose et du glycérol (d'après NARCISO, 1987).

une diminution correspondante de la concentration en glycogène. Ce facteur suggère que le glycogène sert de substrat pour la synthèse du tréhalose, hypothèse qui est en accord avec les travaux de CABID et LELOIR (1958, in NARCISO, 1987) et de CANDY et KILBY (1961, in NARCISO, 1987). Le tréhalose s'accumule comme conséquence du catabolisme du glycogène, cette accumulation étant directement en relation avec la cryptobiose. Les processus de synthèse du tréhalose et du glycérol sont montrés à la Fig.1.17 (NARCISO, 1987).

Une hydratation minimale (0,65 g d'eau/ g de poids sec  $\pm$ 0,07) est nécessaire pour initier la reprise du métabolisme qui se fait tout d'abord lentement. Après incubation des cystes, la respiration commence immédiatement. Le métabolisme aérobique de l'embryon du cyste assure la conversion des réserves de carbohydrates (tréhalose) en glycogène et glycérol qui s'accumulent au niveau de la membrane cuticulaire externe. Le taux de cette substance hygroscopique augmente, ce qui a pour résultat la prise d'eau par l'embryon à travers sa membrane cuticulaire externe. Le rôle du glycérol est de maintenir la pression osmotique afin d'assurer l'absorption d'eau par le cyste. La pression osmotique interne des cystes est plus ou moins le double de celle du milieu extérieur et celle-ci augmente jusqu'à un point critique où la membrane se brise. A ce moment, tout le glycérol produit est relâché (SORGELOOS et *al.*, 1986). Après la rupture, le nauplius émerge, entouré par la membrane embryonnaire. Le nauplius initie une série de mouvements provoquant la rupture de cette membrane (WHEELER et *al.*, 1979). Le seul autre facteur exogène nécessaire à la reprise du développement, en plus de l'hydratation à une température acceptable, est l'oxygène moléculaire à pression partielle adéquate (CLEGG et CONTE, 1980). Ainsi, lorsque les cystes sont exposés à l'oxygène, la formation de radicaux libres permettent la destruction des systèmes spécifiques enzymatiques des cystes amétaboliques (NARCISO, 1987).

*Artemia* sp. possède donc un système hyperosmotique régulateur qui consiste en le système tréhalose/glycérol.

Comme déjà cité, une hydratation minimale est nécessaire à la reprise du métabolisme. La gastrula du cyste consiste en 3000 à 4000 cellules selon l'origine géographique. Le développement à l'état de pré-émergence (PED) nécessite habituellement entre 8 et 16 heures d'incubation dans des conditions optimales, les conditions externes influençant fortement cette durée (CLEGG et CONTE, 1980).



**Fig.1.18.** Schéma des différents stades de développement de la gastrula sous forme de cyste à l'état de nauplius au stade I (d'après CLEGG et CONTE, 1980).

**Légende:** G: gastrula; P.E.D.: développement à l'état de pré-émergence; hatching: éclosion; N-I: nauplius au stade I.

### **I.5.3.1. Energie et source de carbone permettant le développement à l'état de pré-émergence.**

Comme la cuticule embryonnaire est imperméable aux molécules organiques non-volatiles, toutes les sources d'énergie et de substrats pour le métabolisme doivent être présentes dans la gastrula. La source énergétique consiste en l' $\alpha$ ,  $\alpha$ -tréhalose, disaccharide non réduit de glucose. Le tréhalose ne sert pas seulement de substrat respiratoire, mais aussi comme source de carbone pour la synthèse de glycogène et de glycérol durant la période de développement à l'état de pré-émergence. Il servirait également de squelette carboné pour la formation de divers métabolites (CLEGG et CONTE, 1980).

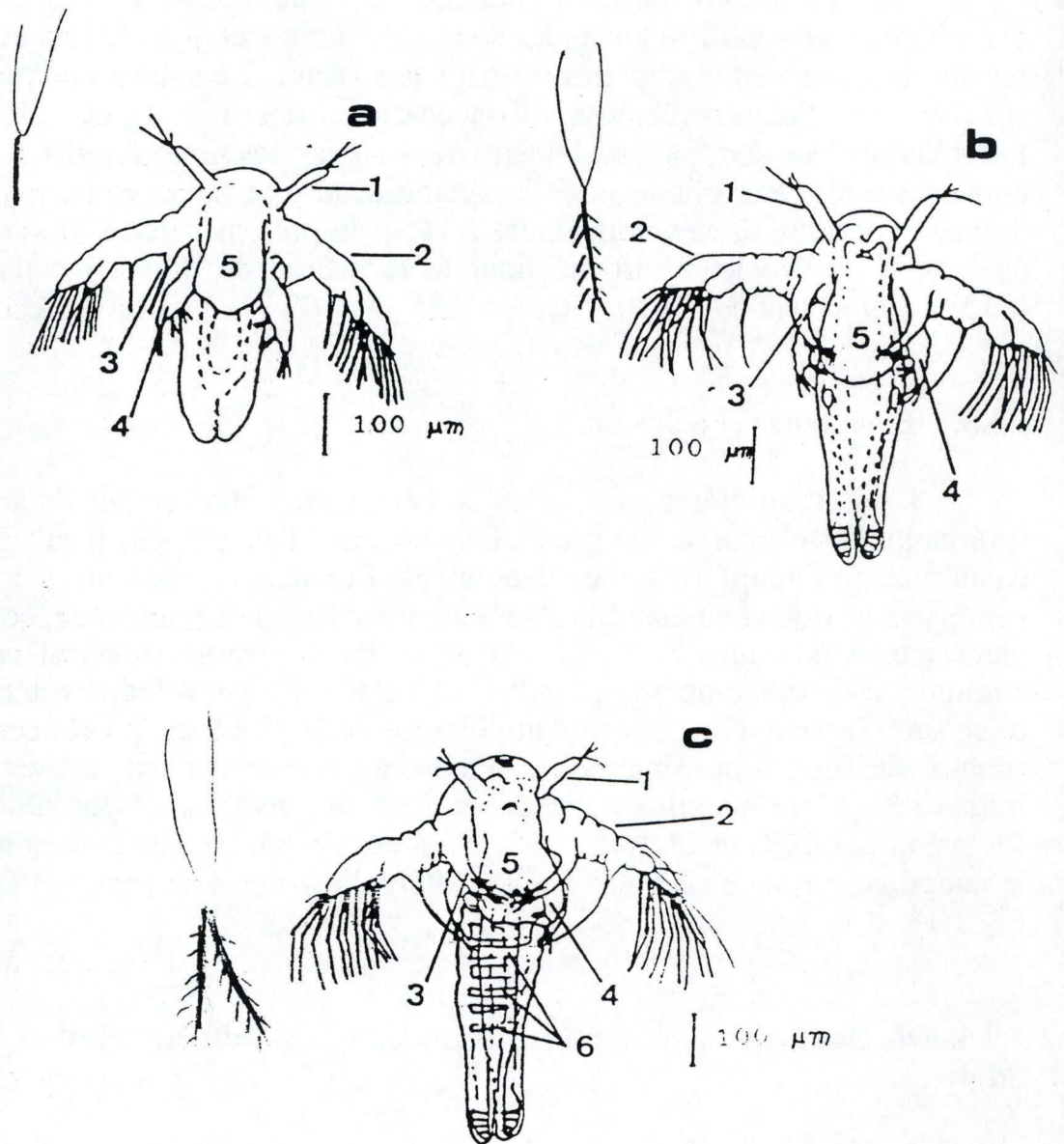
### **I.5.3.2. Emergence et éclosion.**

L'observation des cystes lors de l'émergence montre que l'embryon (pré-nauplius) n'émerge pas graduellement mais l'enveloppe, paraît plutôt éclater, le pré-nauplius sortant lentement. Lorsque le chorion se rompt, l'embryon se trouve en état de pré-émergence. Lors de l'émergence, celui-ci passe par deux stades E1 et E2. Au stade E1, le pré-nauplius est encore entouré par deux membranes, tandis qu'au stade E2, l'enveloppe externe se brise sous l'action d'une enzyme qui dissout celle-ci. En ce qui concerne la rupture de l'enveloppe interne, il semble que ce soient les mouvements initiés par le pré-nauplius devenant mobile qui seraient responsables de l'éclosion (CLEGG et CONTE, 1980). Après la rupture de cette membrane, le nauplius se trouve au stade 1. Ces différents stades sont représentés à la Fig.1.18.

### **I.5.4. Développement, croissance et morphologie du nauplius à l'état adulte.**

La larve fraîchement éclosée présente trois paires d'appendices céphaliques qui subiront des transformations morphologiques menant au dimorphisme sexuel des antennes, la réduction totale des mandibules larvaires et la formation des mandibules adultes.

Durant les périodes de développement des stades métanauplius et post-métanauplius, se développent les maxillaires, maxilles et 11 paires de thoracopodes multifonctionnels dans la région post-mandibulaire, substituant l'appareil filtreur de la larve constitué par les antennes et les mandibules larvaires (SCHREHARDT, 1987).



**Fig.1.19.** Morphologie des premiers stades larvaires d'*Artemia* sp. (modifié, d'après ANDERSON, 1987, in NARCISO, 1987).

a-stade I  
 b-stade II (métanauplius I)  
 c-stade III (métanauplius II).

**Légende:** 1: antennules; 2: antennes; 3: épine gnatobasale; 4: mandibule; 5: labrum; 6: somites.

Le développement post-embryonnaire est caractérisé par une série de phases qui peuvent être regroupées en plusieurs stades: stades nauplius, métanauplius, post-métanauplius et post-larvaire (SCHREHARDT, 1987).

D'après KAESTNER et SIEWING (in SCHREHARDT, 1987), la fin du stade nauplius est définie par le commencement de la formation des somites post-mandibulaires. Le fonctionnement de la première paire de thoracopodes marque la transition entre le stade métanauplius et post-métanauplius, tandis que la segmentation complète du tronc et la perte de la fonction natatoire des antennes, indiquent le début du stade post-larvaire.

La définition de quatre périodes de développement ne fait pas l'unanimité de tous les auteurs, notamment en ce qui concerne le nombre de larves. Un tel fait est dû au manque d'information sur les altérations morphologiques qui ont lieu durant le développement d'*Artemia*.

#### I.5.4.1. Stade nauplius.

Le nauplius (Fig.1.19a) possède trois paires d'appendices céphaliques, un ocelle situé dans la région de la tête entre les premières antennes et est dépourvu de segmentation dans la région du tronc. Sa longueur varie d'espèce à espèce entre 450 et 475  $\mu\text{m}$ . Il présente une couleur orange due aux réserves vitellines.

Les trois paires d'appendices céphaliques consistent en:

- une paire d'antennules uniramées, fournies de soies à leur extrémité et ayant une fonction sensorielle;
- une paire d'antennes biramées qui fonctionnent comme organe locomoteur;
- une paire de mandibules possédant un palpe terminal doté de soies.

Les antennes sont différenciées en protopodite, endopodite et exopodite. Le protopodite présente une structure conique courbée fournie d'une soie nue et non bifurque. Cette structure ou épine gnathobasale est le caractère le plus utilisé pour distinguer les trois premiers stades (AMAT, 1985 et SCHREHARDT, 1987).

La larve présente encore, dans la région dorsale, l'organe osmorégulateur qui s'étend des antennes à la région d'insertion des mandibules et, dans la région ventrale, un labrum de forme rectangulaire

qui couvre la base des appendices céphaliques et qui aura un rôle dans la prise de nourriture (transfert des particules au niveau de la bouche). A ce stade, la larve ne se nourrit pas encore, son système digestif n'étant pas fonctionnel (bouche et anus sont fermés) (SORGELLOOS et *al.*, 1986).

#### I.5.4.2. Stade métanauplius.

La première mue signale la transition du stade nauplius au stade métanauplius, dont nous pouvons distinguer quatre étapes de développement:

- métanauplius I: ce stade est caractérisé par l'apparition d'un plus grand nombre de soies sur les antennules, augmentant ainsi l'efficacité de l'appareil filtreur qui à ce stade devient fonctionnel. Le métanauplius I mesure entre 600 et 650  $\mu\text{m}$  de longueur, est plus translucide et l'épine gnatobasale est uniramée et fournie de soies (Fig.1.19b). La région post-mandibulaire s'étend et montre le début d'une segmentation. De petites particules (cellules algales, bactéries, débris) dont la taille varie de 1 à 40  $\mu\text{m}$  sont filtrées par les secondes antennes et sont ingérées dans l'appareil digestif devenu fonctionnel (SORGELLOOS et *al.*, 1986).

- métanauplius II: après la troisième mue, la larve mesure entre 700 et 750  $\mu\text{m}$  et les réserves vitellines sont totalement épuisées. A cette phase, l'épine gnatobasale est biramée et dépourvue de soies (Fig.1.19c). La complexité de l'appareil filtreur augmente à mesure que certaines zones des antennes et des mandibules se spécialisent en des tâches déterminées. Les bords des endopodites et exopodites des antennes ainsi que les exopodites des mandibules deviennent actifs dans la filtration des particules, tandis que d'autres zones se spécialisent dans le transfert des particules vers l'atrium buccal. La région post-mandibulaire s'allonge et les lobules des trois premiers appendices thoraciques deviennent visibles.

- métanauplius III: morphologiquement, cet état est très similaire à son antécédent. Les mandibules et les maxilles présentent une différenciation morphologique bien que ceux-ci n'interviennent pas encore dans l'ingestion des aliments. Les quatre aux cinq premiers lobules thoraciques sont parfaitement définis.

- métanauplius IV: dans la région dorsale commencent à être visibles les antennules et les rudiments des yeux composés qui apparaissent très pigmentés. Le labrum prend une forme discoïde et les mandibules régressent à mesure que les rudiments des mandibules adultes apparaissent. Dans la région post-maxillaire, les thoracopodes I et II et parfois le troisième initient l'articulation.

Jusqu'à ce stade, l'activité de filtration de la nourriture n'est pas très efficace, celle-ci étant seulement assurée par une paire d'appendices: les secondes antennes (DOBBELEIR *et al.*, 1980).

#### I.5.4.3. Stade post-métanauplius.

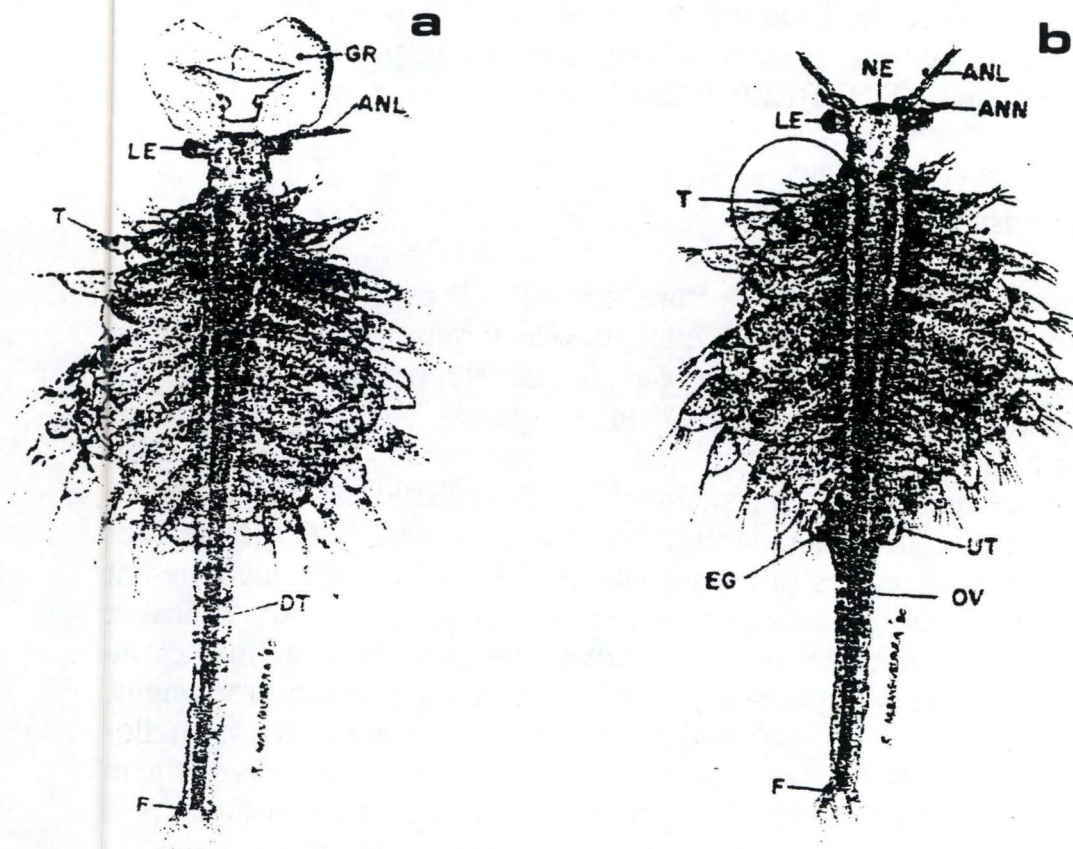
La cinquième mue limite la transition entre la période métanauplius et la période post-métanauplius. Cette période comprend sept stades de développement et est caractérisée par le développement complet de l'appareil filtreur constitué de onze paires de thoracopodes multifonctionnels utilisés pour la locomotion, l'osmorégulation (exopodites), la respiration (épipodites) et la nutrition. Les membres thoraciques limitent un canal ventral, le sillon ventral. Le mouvement chronique des thoracopodes provoque un flux d'eau, les nutriments étant aspirés dans ce sillon et transportés par les soies des protopodites et endopodites vers la bouche. Tous les segments sont bien définis et au dernier stade post-métanauplius apparaissent déjà l'appareil reproducteur: une paire de pénis chez les mâles et un ovisac chez les femelles (SCHREHARDT, 1987). Au stade 10, un important changement morphologique apparaît: les antennes perdent leur fonction locomotrice et subissent une différenciation sexuelle. Chez les futurs mâles, elles se développent en pinces musculaires, tandis que chez les femelles, elles dégénèrent en appendices sensoriels. Les thoracopodes sont aussi différenciés en trois parties fonctionnelles:

- les télopodites;
- les endopodites;
- les membranes exopodites qui fonctionnent comme des branchies.

Les télopodites et les endopodites ont une fonction de locomotion et de filtration (SORGELLOOS *et al.*, 1986).

#### I.5.4.4. Stade post-larvaire.

Cette période comprend cinq états de développement et est caractérisée par le développement des antennes et structures génitales. La 17<sup>e</sup> mue achève le développement post-embryonnaire et les deux sexes possèdent les caractéristiques typiques des adultes (SCHREHARDT, 1987).



**Fig.1.20.** Représentations schématiques du mâle (a) et de la femelle (b) adultes d'*Artemia* sp.

**Légende:** NE: oeil du naupliaire, LE: oeil composé, ANL: antennules, ANN: antennes, UT: utérus, T: thoracopodes, OV: segments abdominaux, F: fourche caudale.

#### I.5.4.5. Morphologie des adultes.

Les adultes mesurent plus ou moins 10 mm de longueur dans les populations bisexuelles et jusqu'à 20 mm au niveau des populations parthénogénétiques polyploïdes. La morphologie externe varie légèrement entre les formes bisexuelles et parthénogénétiques (AMAT, 1979), ces différences étant plus accentuées suivant les variations des facteurs physico-chimiques du milieu dans lequel ils vivent. Extérieurement, le corps présente trois régions bien différenciées: la tête, le thorax et l'abdomen. La tête présente une paire d'yeux complexes et deux paires d'antennes. Le thorax présente onze paires de thoracopodes de structure morphologique identique. L'abdomen présente huit segments apodes. Au niveau des deux premiers se localisent les organes génitaux et le dernier dénommé telson présente une fourche caudale (VIEIRA, 1989). Il existe un dimorphisme sexuel, le mâle possède une paire de pinces musculaires au niveau de la tête et une paire de pénis à la partie postérieure de la région du tronc (Fig.1.20a). La femelle ne possède pas d'appendices distinctifs au niveau de la tête mais elle peut être facilement reconnue par la présence d'un utérus situé juste derrière la onzième paire de thoracopodes (Fig.1.20b) (SORGeloos et *al.*, 1986).

#### I.5.5. Développement physiologique de la larve à l'état adulte.

Le développement morphologique a déjà été décrit (cfr.I.5.4). Plusieurs changements d'ordre physiologique vont également avoir lieu durant le développement dont la formation d'une glande permettant la régulation osmotique et ionique, la formation de pigments respiratoires ainsi que la formation du premier organe sensoriel, l'ocelle.

##### I.5.5.1. Régulation osmotique et ionique.

Différentes études montrent que l'hémolymphe durant le développement du nauplius maintient les concentrations en sels considérablement plus basses et sa composition différente du milieu externe. Cela implique l'existence d'une structure permettant la prise d'eau et l'élimination des ions en excès. La structure céphalothoracique est l'organe responsable de cette régulation. CONTE et *al.* (1977) ont montré que la transition du mécanisme hyperosmotique tréhalose-glycérol utilisé chez l'embryon à l'état de pré-émergence à une régulation de type osmotique est entièrement basée sur la régulation du sodium et du chlorure. Ce système requiert la présence de (Na+K) ATP ase (CLEGG et CONTE, 1980).

Lors de la segmentation de la région thoracique, chaque appendice thoracique se développe et acquiert de nouvelles structures. Ainsi, les membres du tronc se spécialisent et possèdent plusieurs fonctions chez l'adulte: tout d'abord une fonction locomotrice, ensuite un rôle dans la respiration par la formation de nombreux feuillets branchiaux et finalement le rôle d'organe extrarénal responsable de l'excrétion des électrolytes en excès. C'est la couche épithéliale du metepipodite qui contient les "salt organelles", celles-ci formant le système rénal chez l'adulte. Ces "salt organelles" résultant du développement segmentaire de la larve ne sont pas physiologiquement actives tant que le développement n'est pas achevé. C'est à ce moment précis qu'a lieu la destruction de la glande larvaire. Lorsque les mandibules sont formés, la glande s'autolyse complètement et est réabsorbée. Apparemment, la coexistence des deux systèmes rénaux larvaire et adulte est biologiquement incompatible (CLEGG et CONTE, 1980).

L'hémolymphe peut maintenir ses concentrations à des niveaux inférieurs à ceux du milieu extérieur. Le mécanisme compensatoire impliqué afin de maintenir l'homéostasie consiste en la compensation de la perte d'eau par l'assimilation active de NaCl. L'eau qui accompagne cette assimilation maintient le volume du fluide, tandis que l'excès de NaCl est expulsé par extrusion active contre un gradient électrochimique via un organe effectif. Chez l'adulte, cet organe consiste en les feuillets branchiaux. Ceux-ci sont couverts par une cuticule hautement perméable. De plus, l'épithélium de ces feuillets montre une activité sécrétrice d'ions.

Chez *Artemia*, le tractus alimentaire et les feuillets branchiaux apparaissent donc être les organes responsables des mécanismes homéostatiques.

#### I.5.5.2. Biogenèse des cellules sanguines et ontogenèse des pigments respiratoires.

LOCHHEAD (1941, in CLEGG et CONTE, 1980) a montré l'existence de nodules spécialisés localisés à la base de chaque membre du tronc et dont la fonction consiste à former les cellules sanguines. Cependant, le cytoplasme sans couleur de ces cellules suggère que celles-ci ne contiennent pas de pigment respiratoire du type hémoglobine.

*Artemia* est capable de biosynthétiser l'hémoglobine, cette synthèse étant dépendante du contenu en oxygène du milieu extérieur. Il existe quatre hémoglobines distinctes (Hb-1, Hb-2, Hb-x et Hb-3) dont les concentrations varient suivant le génotype et les conditions environnementales (NARCISO, 1987). Celles-ci sont synthétisées durant

croissance du nauplius. La synthèse ne commence pas directement après l'éclosion, les taux les plus importants de synthèse de l'Hb-2 et de l'Hb-3 étant observés chez des nauplii âgés de 2-3 jours. Chez des nauplii âgés de 20 jours, la synthèse de l'Hb-1 domine. Les taux respiratoires chez l'adulte et les nauplii sont entièrement différents. Chez l'adulte et les stades métanauplius, le transport de l'oxygène est facilité par la participation d'hémoglobine extracellulaire (CLEGG et CONTE, 1980).

#### I.5.5.3. Formation du premier oeil.

L'oeil apparaît très tôt, déjà aux stades de pré-nauplius. En effet, au moment de l'éclosion, les cellules photoréceptrices primitives ainsi que les cellules neuronales s'intègrent en un oeil. Cet oeil est responsable des réponses phototactiques développées dans le comportement locomoteur de la larve. L'oeil du nauplius est composé de deux types de cellules: des grandes cellules pigmentées et des cellules neuronales. Ces deux types sont intégrés en un complexe neuronal, laquelle développe des interdigitations avec des neurones bipolaires formant un organe récepteur (CLEGG et CONTE, 1980).

#### I.5.5.4. Respirations aérobie et anaérobie.

La fonction première du système respiratoire est l'apport d'oxygène et le retrait du gaz carbonique des tissus. L'hémoglobine extracellulaire assure cette fonction chez *Artemia*.

GILCHRIST (1954, in CLEGG et CONTE, 1980) a montré que les adultes des deux sexes répondent aux basses teneurs en oxygène en synthétisant de l'hémoglobine. Si la concentration en oxygène du milieu ambiant descend à des niveaux inférieurs à 1,5 ml/l, les taux respiratoires tombent et les animaux montrent une réduction marquée des mouvements locomoteurs. Le niveau en dessous duquel la majeure partie des activités est supprimée (nage, alimentation,...) est de l'ordre de 2 ml O<sub>2</sub>/l chez le mâle adulte à une salinité de 35 ‰. En dessous de ce niveau, les processus anaérobiques sont invoqués afin de répondre aux exigences énergétiques des tissus. *Artemia* répond au manque en oxygène par la stimulation de la synthèse d'hémoglobine. A des niveaux inférieurs à 1,0 ml/l, l'Hb-3 est la forme principale synthétisée, celle-ci ayant la plus grande affinité pour l'oxygène et le plus petit effet de Bohr. Par contre les nauplii âgés de moins de 36 heures ne peuvent synthétiser de grandes quantités d'Hb-3. Chez ceux-ci, la diffusion passive des gaz serait le mécanisme de transport adéquat pour fournir l'oxygène aux tissus. Lorsque les concentrations en

oxygène du milieu tombent en dessous de 1,0 ml/l, la voie anaérobie C-4 est stimulée au contraire de la stimulation et de la production d'hémoglobine extracellulaire chez l'adulte (CLEGG et CONTE, 1980).

#### I.5.5.5. Tractus digestif: absorption d'eau, digestion et nutrition.

L'intestin de l'adulte est le site d'absorption de l'eau. Ce fait est basé sur la concentration basse en NaCl des fluides de celui-ci. Des études ultrastructurales montrent des spécialisations telles une amplification du plasmalemme le long des surfaces apicale et basale des cellules, ainsi qu'une augmentation concomitante du niveau des (Na+K)-ATPase. Ces spécialisations suggèrent ce rôle absorbant du NaCl (CLEGG et CONTE, 1980).

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

**Tab.2.1.** Liste de quelques sources nutritives vivantes et inertes utilisées pour assurer la croissance d'*Artemia* sp. (d'après DOBBELEIR et al., 1980).

**Algues vivantes.**

Diatomées: *Chaetoceros*, *Cyclotella*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*.

Chlorophycées: *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Platymonas*, *Stichococcus*, *Stephanoptera*, *Brachiomonas*.

Chrysophycées: *Isochrysis*, *Monochrysis*, *Stichochrysis*, *Syracosphaera*.

**Algues séchées.**

*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*.

**Levures.**

Levures de bière et de boulangerie.

**Divers produits inertes.**

foie homogénéisé, poudre de riz, froment, farine de poisson, poudres de soja et de son, petit lait...

## II.1. Réalisation de cultures d'algues.

Il est bien connu qu'une grande variété d'aliments peut être utilisée afin de nourrir les *Artemia* (Tab.2.1; SORGELLOOS et *al.*, 1986), ceux-ci étant des filtreurs non sélectifs. Différentes conditions doivent cependant être remplies :

- la taille des particules alimentaires doit être inférieure à 50µm;
- l'aliment doit être facilement digestible et avoir une bonne valeur nutritionnelle;
- la solubilité de l'aliment doit être minimale. En effet, les produits solubles ne sont pas assimilés et ceux-ci peuvent alors polluer le milieu de culture (SORGELLOOS et *al.*, 1986).

Divers produits de l'agriculture (riz, soya, blé), des bio-industries (poudres de lait) ou des produits spécifiques pour *Artemia* constituent une source alimentaire acceptable. Nous avons cependant choisi d'utiliser les cultures de microalgues, certaines de celles-ci étant également nutritionnellement satisfaisantes.

### II.1.1. Types d'algues cultivées.

Différentes espèces algales sont cultivées au laboratoire, il s'agit de *Chlorella* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* (T-iso) et *Chaetoceros calcitrans*.

Pour des raisons de facilité (facilité de leur obtention, de leur manutention ainsi que leur croissance rapide), nous avons choisi de produire deux de ces algues marines: *Chlorella* sp. et *Phaeodactylum tricornutum*. Toutes les deux constituent en effet une source alimentaire appréciable parmi d'autres aliments utilisés (Tab.2.1).

Les cultures sont réalisées par ensemencement de tubes à essai à partir d'un inoculum et par repiquages successifs dans un erlenmeyer de 2 l, un ballon de 10 l et enfin, un sac plastique de 65 l.

## II.1.2. Le milieu de culture utilisé.

### II.1.2.1. Types de milieu.

Le milieu de culture est constitué par de l'eau de mer filtrée, stérilisée et enrichie avec différents éléments, l'eau de mer ayant des teneurs en éléments nutritifs très faibles. Trois types d'éléments y sont ajoutés:

- les éléments nutritifs majeurs: azote, phosphate et silice (utilisée seulement pour les diatomées);
- les microéléments métalliques;
- les microéléments organiques: vitamines B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> et biotine...

Nous avons utilisé deux types de milieu: le milieu de Walne et le milieu de Miquel suivant qu'il s'agisse des erlenmeyers, des ballons ou des sacs plastiques.

### II.1.2.2. Filtration et stérilisation de l'eau de mer.

L'eau est pompée à partir de la mer et est emmagasinée dans un réservoir en fibre de verre d'une capacité de 4000 l. Par gravité, celle-ci entre dans les salles de culture par un tube en PVC qui mène directement au système de filtration et de stérilisation. Le système de filtration est constitué de 5 filtres de diamètres de pores différents (50, 10, 5, 1 et 1 µm). Ces filtres sont fréquemment lavés avec de l'hypochlorite de sodium et de l'eau désionisée afin d'augmenter leur efficacité et leur durabilité. Cette filtration permet de retenir les débris particulaires, le zoo- et le phytoplancton. Après la filtration, l'eau de mer est ensuite stérilisée par passage sur une lampe ultra-violette, éliminant ainsi la majorité des microorganismes.

### II.1.2.3. Préparation des milieux de culture.

Jusqu'au stade des ballons de 10 l, nous utilisons le milieu de Walne comme milieu nutritif. Le milieu se prépare comme suit: à 1 litre d'eau de mer 30‰, nous ajoutons les quantités suivantes:

- 2 ml de la solution 1;
- 0,5 ml de la solution 2;
- 0,2 ml de la solution 3;

Tab.2.2. Composition du milieu de Walne (modifié).

<u>Solution 1</u>	<u>qté/l eau dist.</u>
FeCl <sub>3</sub> 30% (fondu)	2 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6 gr
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O.EDTA	52,3 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	20 gr
NaNO <sub>3</sub>	100 gr
<u>Solution 2</u>	<u>qté/l eau dist.</u>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22 gr
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,8 gr
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 gr
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180 gr
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	6,8 gr
<u>Solution 3</u>	<u>qté/l eau dist.</u>
Vitamine B <sub>12</sub>	100 mg
Vitamine B <sub>1</sub>	2000 mg
Vitamine H (biotine)	1200 mg

Tab.2.3. Composition du milieu de Miquel (modifié).

<u>Solution A</u>	<u>qté/l d'eau distillée</u>
KNO <sub>3</sub>	202 gr
<u>Solution B</u>	
CaCl <sub>2</sub>	40 gr
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 gr
ClFe	20 ml
HCl concentré	20 ml

-2 ml de métasilicate sodique s'il s'agit de la diatomée *Phaeodactylum*;

-2 ml de Tris s'il s'agit de l'algue verte *Chlorella*.

La composition des solutions utilisées est donnée au Tab. 2.2.

Pour les cultures en sacs plastiques, nous utilisons le milieu de Miquel. Ce changement de milieu est effectué pour des raisons de facilité, ce milieu ne contenant que deux solutions et étant également meilleur marché. De plus, celui-ci donne de bons résultats de croissance.

La préparation du milieu se fait comme suit, pour 1 l d'eau de mer 25‰, nous ajoutons:

-1 ml de la solution A;

-0,5 ml de la solution B;

-0,5 gr de phosphonitrate 220.

La composition des solutions A et B utilisées est donnée au Tab.2.3. La solution B se prépare de la manière suivante:

Dissoudre le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) dans 400 ml d'eau distillée et ajouter l'acide chlorhydrique concentré. Séparément, dissoudre le phosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) dans 400 ml d'eau distillée et ajouter le chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ). Ajouter la solution de phosphate à la solution acide.

Il est à noter que toutes les solutions utilisées pour la préparation des milieux sont préparées le plus stérilement possible (autoclavage des solutions) et maintenues le plus stérile possible (ajouts des solutions sous la flamme) afin d'éviter la contamination des cultures, au moins jusqu'au stade des ballons de 10 l de volume.

### II.1.3. Les différentes étapes de culture.

Les cultures sont réalisées par repiquages successifs, celles-ci devant être maintenues en phase exponentielle tant pour leur utilisation comme aliment que pour l'inoculation de nouvelles cultures. Les repiquages sont effectués lorsque les algues atteignent leur phase de croissance exponentielle. La détermination de l'état des cultures est réalisé par comptages cellulaires à l'aide de la chambre de Bürker. Ces comptages sont effectués journalièrement à partir d'un petit échantillon de la culture. Le logarithme népérien du nombre de cellules/ml en fonction du temps (jours) permet de tracer la courbe de croissance des cultures et ainsi de déterminer la phase exponentielle de croissance.

### II.1.3.1. Manutention des cultures "stock".

#### II.1.3.1.1. Culture "stock" en milieu liquide.

Les cultures "stocks" sont maintenues en tubes à essai et erlenmeyers de 250 ml contenant du milieu de culture (eau de mer 30‰ enrichie avec le milieu de Walne) préalablement autoclavés à 120°C durant 20 minutes. Des repiquages dans de nouveaux tubes et erlenmeyers de 250 ml sont effectués afin de garantir la rénovation des stocks et la production d'inoculum.

Les cultures sont maintenues dans une chambre isothermique (19-20°C), sous illumination continue fournie par diverses lampes fluorescentes type "day-light" ainsi que par des lampes "grolux" spéciales pour la croissance des végétaux car favorisant la photosynthèse. L'intensité lumineuse fournie aux tubes à essai, erlenmeyers et ballons est de 1400 Lux à la surface, tandis que pour les sacs plastiques, celle-ci est de 5500 Lux.

#### II.1.3.1.2. Culture "stock" en milieu solide.

Par mesure de sécurité et dans le cas d'éventuelles contaminations par des bactéries, protozoaires hétérotrophes ou autres espèces microalgales, des cultures en milieu solide sont également effectuées au laboratoire. Celles-ci se font dans des boîtes de Petri et le milieu de culture est constitué par de l'eau de mer enrichie avec le milieu de Walne et solidifié avec 1,5% d'agar. L'incubation des boîtes est faite sous illumination continue et les cultures sont maintenues ensuite à basse température (frigo).

### II.1.3.2. Culture en plus grands volumes.

#### II.1.3.2.1. Erlenmeyer de 2 l et ballon de 10 l.

Les erlenmeyers de 250 ml sont utilisés comme inoculum pour ensemercer les erlenmeyers de 2 l contenant également du milieu de culture et sont préalablement autoclavés à 120°C durant 20 minutes.

Les ballons de 10 l sont ensemençés à partir des erlenmeyers de 2 l lorsque la concentration algale est assez forte.

Toutes les cultures, à partir de 2 l de volume, sont aérées continuellement afin de fournir le dioxyde de carbone, stabiliser le pH et éviter la sédimentation des algues. Pour cela, les erlenmeyers et les ballons sont fermés à l'aide d'un bouchon de caoutchouc muni de deux tubes en verre:

- un tube long permettant l'arrivée d'air;
- un tube court permettant la sortie d'air en excès.

#### II.1.3.2.2. Sac plastique de 65 l.

Les sacs sont inoculés à partir des ballons de 10 l bien concentrés. Les sacs en polyéthylène sont maintenus dans une salle bien climatisée (19-20°C), sous illumination et aération continues, dans les mêmes conditions que pour les erlenmeyers de 2 l et ballons de 10 l.

Le milieu de culture utilisé pour cette production à grand volume est par contre de l'eau de mer filtrée enrichie avec le milieu de Miquel.

La salinité est également plus basse, 25‰. Ceci est dû au fait qu'il existe une ouverture permettant le passage du tuyau d'aération mais, par conséquent, également l'évaporation de l'eau et l'augmentation de la salinité du milieu qui peut être plus ou moins importante suivant le temps de vie de la culture (de l'ordre d'un mois). Pour cela, l'eau de mer est diluée avec de l'eau désionisée afin de compenser cette augmentation.

Avant l'addition des nutriments (solutions du milieu de Miquel), l'eau contenue dans les sacs est stérilisée avec une solution commerciale d'hypochlorite de sodium (0,5 ml/l) qui est ensuite neutralisée, après une durée de 24 heures par une solution de thiosulfate de sodium (0,13 ml/l). Les nutriments sont ensuite ajoutés et les sacs sontensemencés à partir des ballons de 10 l.

## II.2. Sélection d'*Artemia* par croisements intra-spécifiques.

### II.2.1. Souches utilisées.

Le projet du travail avait pour principal objectif la sélection de deux lots de cystes d'*Artemia* sp. par le croisement d'animaux nés dans chaque lot afin d'obtenir deux populations biométriquement distinctes. Nous avons donc tout d'abord sélectionné l'espèce et la souche à étudier. Il s'agit d'*Artemia parthenogenetica* (Alcochète: Portugal) et *Artemia franciscana* (Faro: Portugal et Great Salt Lake: Etats-Unis).

### II.2.2. Sélection des géniteurs.

#### II.2.2.1. Mesure du diamètre des cystes.

Afin de sélectionner les progéniteurs, nous avons mesuré le diamètre de 500 cystes pour chacune des espèces et populations étudiées.

Avant d'effectuer ces mesures, il est nécessaire de mettre les cystes à hydrater durant minimum deux heures afin de rendre la forme de ceux-ci sphériques.

Une fois hydratés, les mesures sont effectuées à l'aide d'un microscope de type LEITZ (DZAL/176) fourni d'un adaptateur trinoculaire LEITZ PERIPLAN (GF 10 x /18) et d'un inoculaire micrométrique de précision 0,01 mm. Le diamètre des cystes nous est donné par le nombre de divisions lu sur l'oculaire, ce nombre étant ensuite converti en  $\mu\text{m}$  à l'aide d'une table de conversion. Ce tableau donne le diamètre (en  $\mu\text{m}$ ) en fonction du nombre de divisions et du grossissement utilisé. Il est à noter que les données notées dans la table ont été arrondies à la dizaine, la table n'étant pas suffisamment précise.

#### II.2.2.2. Sélection biométrique.

A partir de ces mesures, nous avons représenté graphiquement la courbe de distribution des fréquences des diamètres pour chacune des espèces et populations utilisées. C'est à partir de ces courbes de distribution des diamètres pour chacune des populations que nous avons choisi le diamètre des cystes à sélectionner. Nous avons isolé les cystes dont les diamètres se situent aux deux extrêmes de la courbe et donc de la population.

### II.2.2.3. Isolement des cystes.

Pour isoler les cystes, nous les mettons tout d'abord à hydrater afin d'obtenir la forme sphérique. Après deux heures d'incubation, nous vérifions à la loupe que les cystes présentent bien la forme sphérique. Nous mesurons ensuite le diamètre des cystes au microscope et isolons ceux qui nous intéressent à l'aide d'une micropipette.

### II.2.2.4. Stockage des cystes sélectionnés.

Les cystes sélectionnés sont ensuite placés dans de petits tubes en plastique contenant de l'eau saturée en chlorure de sodium afin de les déshydrater efficacement. Ceux-ci peuvent alors être stockés durant plusieurs années.

### II.2.2.5. Mise à l'éclosion des cystes sélectionnés.

Avant de mettre les cystes sélectionnés à éclore, nous avons tout d'abord vérifié que ceux-ci étaient bien déshydratés, cette condition étant nécessaire pour la reprise du métabolisme. Nous les avons alors mis à éclore dans les conditions standards de température, pH, salinité et lumière.

#### II.2.2.5.1. Température.

Le synchronisme et l'efficacité d'éclosion les plus élevés sont obtenus à des températures variant de 25 à 30°C (SORGELOOS et *al.*, 1986). Nous avons donc mis les cystes à éclore à température ambiante.

#### II.2.2.5.2. Le pH.

Le pH du milieu est un des facteurs primordiaux pour obtenir un pourcentage d'éclosion élevé. La dissolution de la membrane embryonnaire est en effet initiée par l'enzyme d'éclosion dont le maximum d'activité se situe entre un pH variant de 8 à 9 (SORGELOOS et *al.*, 1980).

Nous avons travaillé avec des densités faibles (au maximum 30 cystes par boîte de Petri), les cystes sont alors simplement mis dans de l'eau de mer diluée, le pH étant de l'ordre de 8.

### II.2.2.5.3. La salinité.

L'eau de mer utilisée pour l'éclosion des cystes est diluée afin d'obtenir une salinité inférieure à 30‰.

### II.2.2.5.4. L'intensité lumineuse.

L'illumination des cystes durant les premières heures après l'hydratation est essentielle. Cependant, il existe de grandes différences entre les souches d'*Artemia* sp. (VANHAECKE et al., 1981), l'effet de l'intensité lumineuse pouvant varier suivant la souche. Etant donné ces différences, SORGELOOS et al. (1986) recommandent une intensité lumineuse minimale de 1000 lux. Nous avons utilisé une simple lampe dont l'intensité lumineuse fournie est de 750 lux, cette intensité étant suffisante dans le cas de la souche bisexuelle de Great Salt Lake *A. franciscana*.

## **II.2.3. Culture des géniteurs.**

### **II.2.3.1. Conditions de culture.**

Après 24 à 48 heures d'incubation, les nauplii nés sont placés dans de petits aquariums de 2 l contenant de l'eau de mer (35‰) sous les conditions standards de température et d'intensité lumineuse et sous aération constante fournie par un petit diffuseur relié à une pompe à air. L'eau utilisée pour la culture de ces animaux est également filtrée.

Ces animaux sont nourris journalièrement avec les microalgues dont les cultures sont effectuées simultanément. Chaque bac, contenant chacun les nauplii d'une population déterminée (Alcochète, Faro, Great Salt Lake) et provenant des cystes sélectionnés d'un certain diamètre (petit ou grand), reçoit la même quantité de nourriture.

Les animaux sont gardés dans ces bacs jusqu'à ce qu'ils atteignent leur maturité sexuelle (15 à 21 jours). Durant leur croissance, l'eau des bacs est renouvelée tous les 4 à 5 jours afin d'éliminer certains métabolites pouvant devenir toxiques à partir d'une certaine concentration, tels les éléments azotés. L'eau des bacs est retirée par siphonnage, un filtre de 90 µm permettant de retenir les nauplii.

Lorsque les *Artemia* ont atteint leur maturité sexuelle, nous isolons les couples qui se forment naturellement et qui seront les géniteurs. Cette condition est importante car il pourrait exister une certaine incompatibilité



Fig.2.1. Photo d'un couple d'*Artemia* en position de pré-copulation (d'après SORGELOOS, 1980).

Légende: o: utérus; p: pénis.

morphologique entre les individus si ceux-ci sont retirés des bacs et placés au hasard dans les tubes. Nous appelons "riding position", la position dans laquelle se trouve le mâle et la femelle en pré-copulation (Fig.2.1) ou en copulation.

#### II.2.3.2. Isolement des couples.

Chaque couple est placé dans un tube à essai contenant de l'eau de mer à 35‰, toujours dans les conditions standards de température et de lumière. Les tubes n'étant pas aérés, l'eau est changée tous les deux jours.

#### II.2.3.3. Suivi des couples.

Les couples sont inspectés journalièrement afin d'observer s'ils sont toujours en "riding position" ou non. Nous vérifions également la présence ou non de nauplii (génération F1), ceux-ci provenant de la reproduction ovovivipare. S'il y en a, ceux-ci sont comptés et placés dans de nouveaux bacs spécifiques à chaque population et diamètre sélectionné. Toutes les observations sont notées dans un tableau à deux entrées (date/numéro du couple).

Les individus sont ainsi gardés jusqu'à leur mort. Si un des individus d'un couple meurt, l'autre est replacé dans son bac afin qu'il puisse reformer un nouveau couple naturellement.

#### II.2.4. Culture des descendants.

Les nauplii (génération F1) sont donc placés dans de nouveaux bacs dans les mêmes conditions que décrites précédemment (cfr.II.2.3.1), à part le fait que nous augmentons graduellement la salinité de l'eau afin de déclencher l'oviparité et d'obtenir ainsi, à partir des couples qui se formeront, des cystes (génération F2). La salinité est donc augmentée graduellement chaque fois que nous changeons l'eau des bacs pour atteindre une valeur de 60‰ lorsque les individus atteignent leur maturité sexuelle. Afin d'augmenter naturellement la salinité de l'eau, celle-ci est mise à évaporer et est ensuite filtrée sur papiers filtres WHATMAN de 5,5 cm de diamètre et de qualité 1. Nous avons également utilisé du chlorure de sodium NaCl (MERCK).

L'isolement des reproducteurs s'effectue comme dans le cas des géniteurs (cfr.II.2.3.2), sauf que nous continuons à augmenter progressivement la salinité du milieu jusqu'à des valeurs de 90-100‰

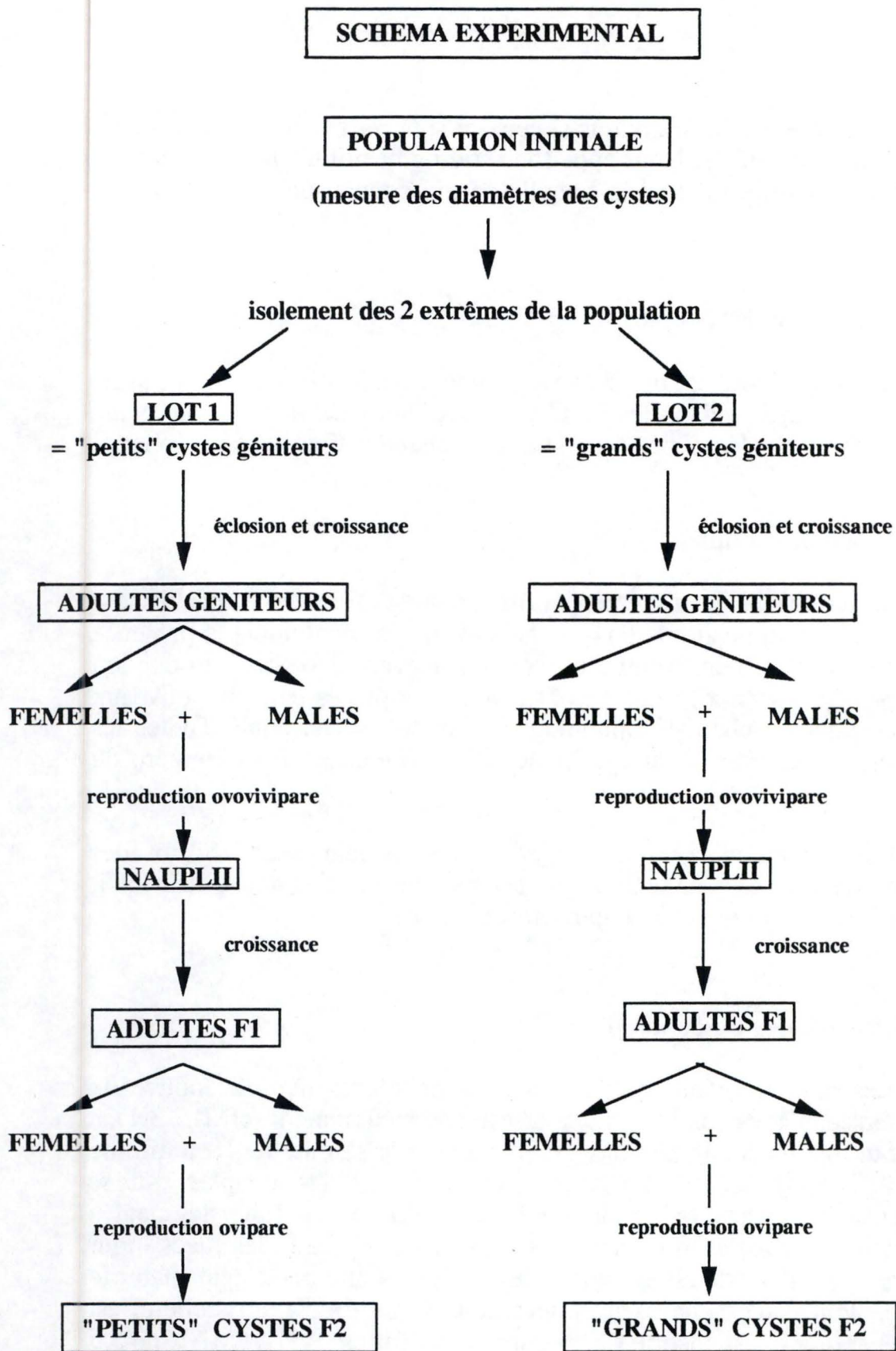
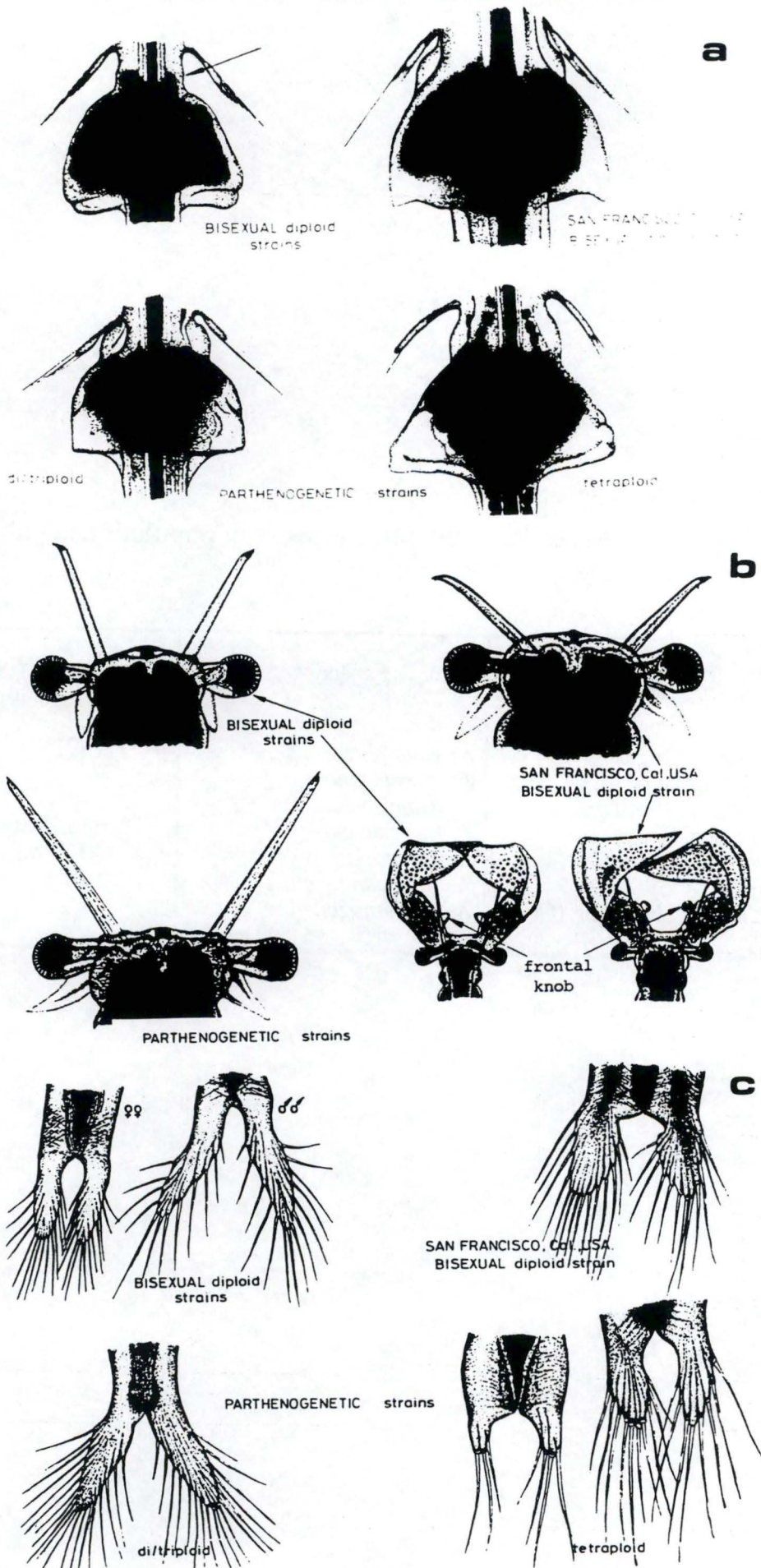


Fig.2.2. Schéma représentant les différentes étapes expérimentales.



**Fig.2.3.** Exemples de différences morphologiques concernant la forme de l'ovisac (a), la forme des antennes (b), la forme de la fourche (c) chez différentes souches d'*Artemia* sp. (d'après DOMENECH, 1980)

Tab.2.4. Références sur les différentes espèces et populations étudiées.

<u>Origine</u>	<u>Espèce</u>	<u>Année de récolte ou n° du lot</u>
Alcochète (Portugal)	<i>Artemia parthenogenetica</i>	1991
Great Salt Lake (E.U.)	<i>A. franciscana</i>	-
Castro Marim (Portugal)	<i>A. franciscana</i>	-
Faro (Portugal)	<i>A. franciscana</i>	déc.1986
Chypre	<i>A. tunisiana</i>	ARC ref. 1011
Tientsin (Chine)	<i>A. parthenogenetica</i>	1984
Chai Yaneng, Shandong (Chine)	<i>A. parthenogenetica</i>	-

afin d'avoir la certitude d'obtenir des cystes. Par la suite, ces cystes, stockés dans de petits pots en plastique contenant une solution saturée en NaCl, sont mis à éclore dans les mêmes conditions que déjà décrites précédemment (cfr.II.2.2.5). Un schéma reprenant les différentes étapes est montré à la Fig.2.2.

### II.3. Caractérisation biométrique de différentes espèces d'*Artemia* sp.

La caractérisation biométrique de différentes espèces d'*Artemia* suppose l'existence de caractères phénotypiques déterminés pouvant servir de critère taxonomique.

Différents caractères présents chez l'adulte tels la morphologie du sac ovigère, la forme de la fourche, le nombre et l'insertion des soies, la forme des antennes sont considérés comme caractères taxonomiques (Fig.2.3) à condition que les individus proviennent d'un même milieu où qu'ils soient cultivés dans des conditions identiques de salinité (AMAT, 1985). Selon TACKAERT et *al.* (1987), le diamètre des cystes et l'épaisseur du chorion peuvent aussi être considérés comme de bons critères pour la caractérisation de diverses espèces d'*Artemia*. Ces paramètres ainsi que d'autres tels le pourcentage, le temps et la synchronie d'éclosion sont également essentiels pour la détermination de la qualité des cystes (SORGeloos, 1979).

#### II.3.1. Etude comparative du diamètre des cystes, de l'épaisseur du chorion et de la taille totale des nauplii.

##### II.3.1.1. Matériel utilisé.

Nous avons effectué la comparaison entre différentes espèces bien connues, mais également entre différentes populations. Les populations étudiées sont celles de Great Salt Lake, de Tunisie, de Chypre et du Portugal (Alcochete, Castro Marim, Faro). Les différentes espèces, ainsi que leur lieu d'origine est donné au Tab.2.4.

##### II.3.1.2. Méthodologie.

Le diamètre des cystes, ainsi que l'épaisseur du chorion ont été déterminés sur un échantillon de 300 cystes pour chaque espèce et population étudiées.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Second block of faint, illegible text.

Third block of faint, illegible text.

Fourth block of faint, illegible text.

Fifth block of faint, illegible text.

Sixth block of faint, illegible text.

Seventh block of faint, illegible text.

Eighth block of faint, illegible text.

Ninth block of faint, illegible text.

Tenth block of faint, illegible text.

Eleventh block of faint, illegible text.

### II.3.1.2.1. Mesure du diamètre des cystes.

La mesure du diamètre des cystes se fait de la même manière que déjà décrite précédemment (cfr.II.2.2.1).

### II.3.1.2.2. Mesure de l'épaisseur du chorion.

Afin de mesurer l'épaisseur du chorion, nous avons utilisé la technique de décapsulation. Celle-ci comprend différentes étapes: l'hydratation des cystes, le traitement dans une solution décapsulante, lavage et désactivation des résidus de chlore actif, usage direct ou déshydratation pour stockage.

#### - Hydratation des cystes.

L'enlèvement du chorion peut seulement se faire si les cystes sont sphériques. Pour la plupart des souches, l'hydratation est atteinte après deux heures d'incubation dans de l'eau douce ou de l'eau salée à 25°C (SORGELOOS *et al.*, 1986). Les cystes sont donc mis à incuber dans de l'eau douce durant deux heures. Une fois l'hydratation terminée, ceux-ci peuvent subir le traitement par la solution décapsulante.

#### -Traitement par la solution décapsulante.

L'hypochlorite de sodium (lessive commerciale avec 5% de chlore actif) est utilisé comme agent réactif pour dissoudre le chorion lipoprotéique des cystes. Les cystes sont donc mis en contact avec la solution décapsulante (quelques ml par boîte de Pétri).

A mesure que la décapsulation a lieu, les cystes varient d'une couleur brune à grise puis orange. Ces changements de couleur sont le résultat de la dissolution du chorion, la couleur orange indiquant que le processus de décapsulation est terminé. Cette couleur est également fonction de la composition en caroténoïdes de l'embryon (*in* PAULO, 1992) entouré uniquement par la membrane embryonnaire. Le traitement par la solution décapsulante dure 5 à 15 minutes.

#### -Lavage et désactivation.

Le pH auquel les cystes sont décapsulés mène à la formation d'une couche de saponification autour des embryons et à l'intérieur de laquelle les composés chlorés sont capturés. Les cystes décapsulés sont donc filtrés et

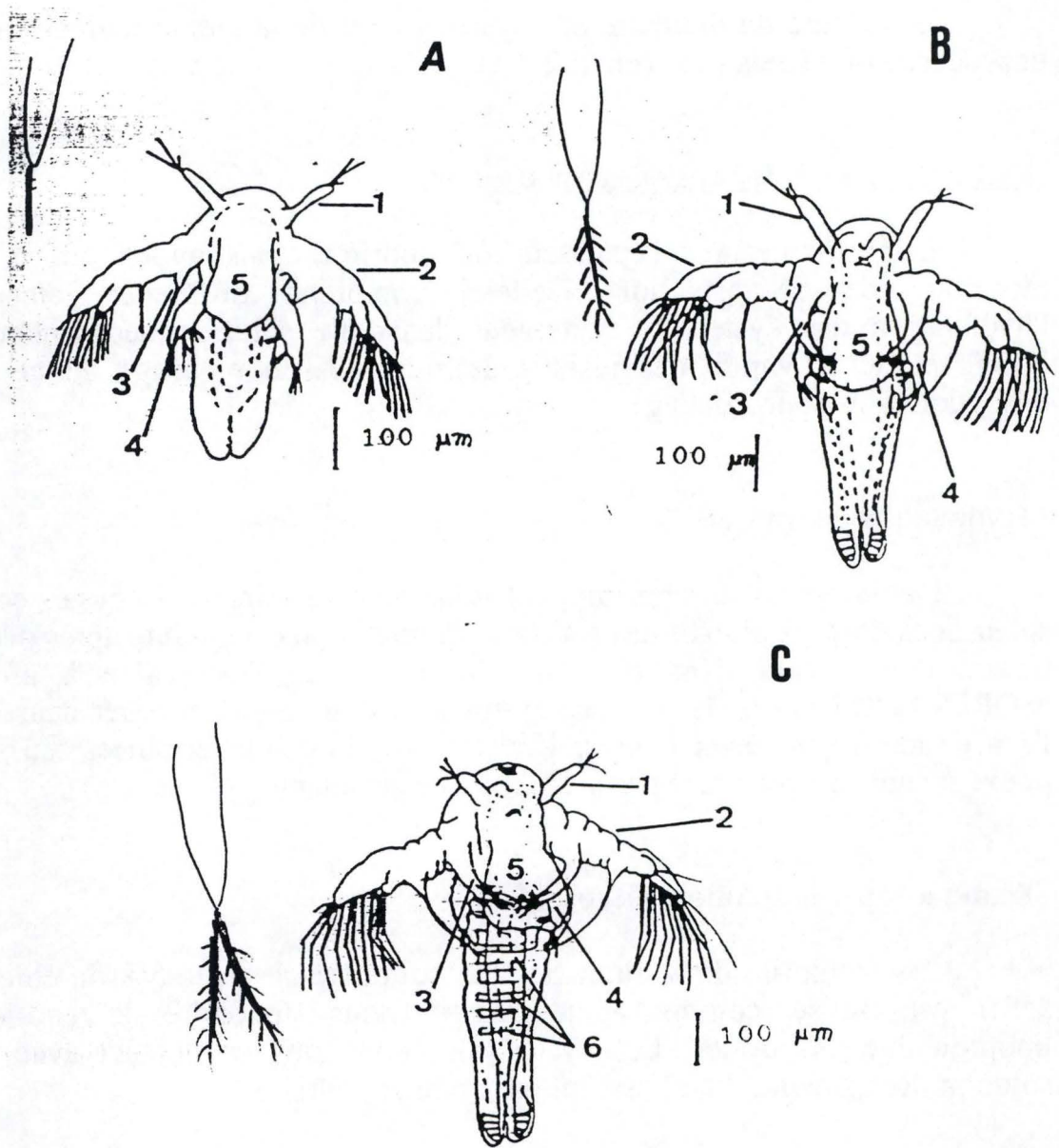


Fig.2.4. Morphologie des premiers stades larvaires d'*Artemia* sp. (d'après NARCISO, 1987)

Légende: A-Stade I; B-stade II; C-stade III.

1: antennules; 2: antennes; 3: épine gnatobasale; 4: mandibule; 5: labrum; 6: somites.

lavés abondamment à l'eau à travers un filtre de 90  $\mu\text{m}$ . Les résidus hypochlorites qui sont absorbés par les cystes décapsulés peuvent être désactivés à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium 0,5 M durant 30 secondes. Les cystes sont ensuite de nouveau lavés abondamment à l'eau salée à travers un filtre de 90  $\mu\text{m}$ .

-Utilisation directe ou stockage.

Après le lavage des cystes décapsulés, ceux-ci sont prêts à être utilisés directement ou à être séchés pour stockage. Les mesures des diamètres des cystes décapsulés sont effectuées directement après le traitement de décapsulation.

#### II.3.1.2.3. Mesure de la longueur totale des nauplii.

La mesure de la longueur des nauplii implique la mise à éclore des cystes des différentes espèces et populations étudiées. Il s'agit de celles:

- d'Alcochete (Portugal): *A. parthenogenetica*;
- de Castro Marim (Portugal): *A. franciscana*;
- de Faro (Portugal): *A. franciscana*;
- de Great Salt Lake (Etats-Unis): *A. franciscana*.

Les cystes sont mis à éclore dans de petites boîtes de Pétri contenant de l'eau de mer diluée afin d'obtenir une salinité inférieure à 30‰ et sous intensité lumineuse de 750 lux.

Après 18 à 24 heures d'incubation suivant les populations, les cystes éclosent, les nauplii sortent et nagent librement. Les mesures sont effectuées sur les nauplii fraîchement éclos. Ceux-ci sont tués avec du formol 5% neutralisé. Le stade des nauplii est déterminé au microscope. L'identification est facile, l'épine gnathobasale au stade I étant uniramée et sans soies (Fig.2.4). La longueur totale des nauplii est déterminée à l'aide d'un microscope LEITZ (DZAL/176) muni d'un trinoculaire LEITZ PERIPLAN (GF 10x/18) et d'un oculaire micrométrique de précision 0,01 mm.

### **II.3.3. La fécondité en relation avec la taille des femelles.**

#### **II.3.3.1. Matériel utilisé.**

Nous avons utilisé les femelles d'*Artemia franciscana* de Great Salt Lake. Celles-ci sont cultivées à l'extérieur dans des réservoirs de culture.

#### **II.3.3.2. Mesure de la taille et comptage du nombre d'oeufs.**

Les femelles ayant l'utérus plein sont retirées des réservoirs de culture et mise dans de petits pots en plastique contenant du formol 5% neutralisé. Une fois celles-ci tuées, la taille est mesurée à la loupe de type WILD M5A munie d'un oculaire micrométrique calibré.

Pour compter le nombre d'oeufs, nous incisons l'utérus à l'aide d'une petite pince et les comptons sous la loupe.

Les mesures ont été effectuées sur un échantillonnage de 100 femelles.

### **II.3.4. Relation entre la taille des mâle/femelle en copulation.**

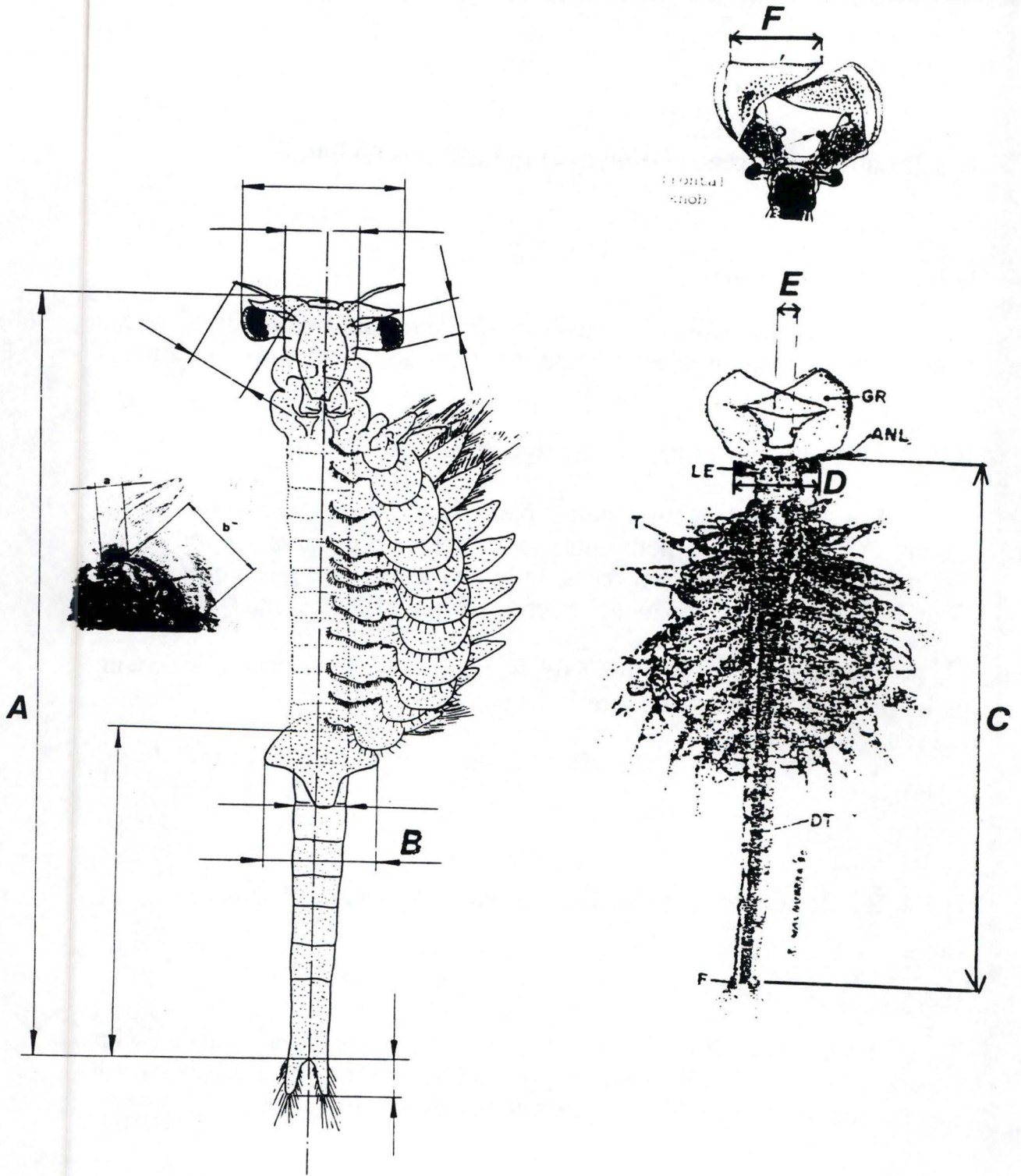
#### **II.3.4.1. Matériel utilisé.**

Pour cette étude, nous avons également utilisé les individus appartenant à l'espèce *A. franciscana* de Great Salt Lake cultivés dans les mêmes conditions que décrites précédemment (cfr.II.3.3.1.).

#### **II.3.4.2. Mesures effectuées.**

L'échantillonnage a été effectué sur 100 couples. Les mesures effectuées sont les suivantes:

- la longueur totale du mâle et de la femelle (LT)
- chez les mâles:
  - longueur de la pince (LP)
  - distance entre les yeux (DY)
  - distance entre les protubérances frontales (DP)



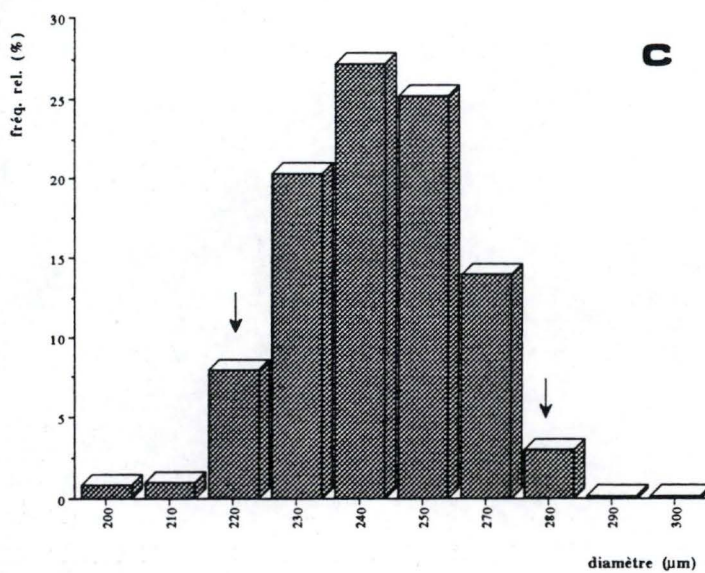
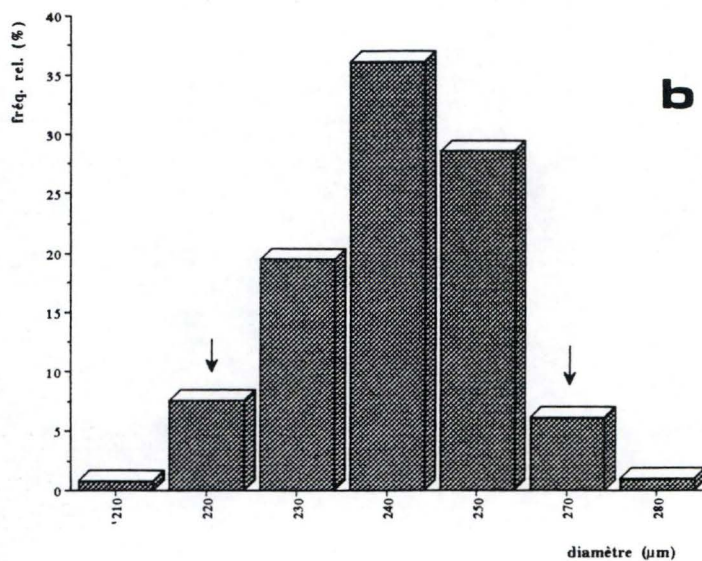
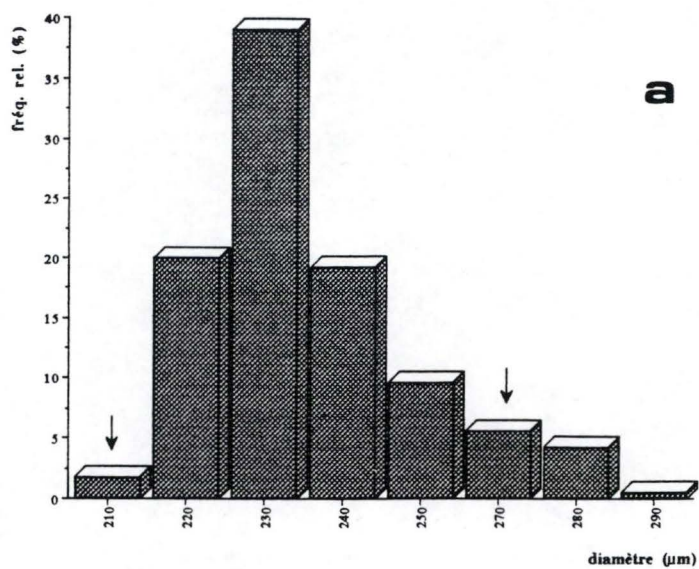
**Fig.2.5.** Représentations schématiques d'une femelle (d'après DOMENECH, 1980) et d'un mâle d'*Artemia* montrant les différentes mesures effectuées.

**Légende:** A: longueur totale de la femelle; B: largeur maximale du sac ovigère; C: longueur totale du mâle; D: distance entre les yeux; E: distance entre les protubérances frontales; F: longueur de la pince.

-chez les femelles: -la largeur totale de l'utérus (IU).

Ces différentes mesures sont montrées sur le schéma à la Fig.2.5 et ont été faites à l'aide d'une loupe type WILD M5A munie d'un oculaire micrométrique calibré.

### III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.



**Fig.3.1.** Hisogrammes des fréquences relatives des diamètres des cystes pour différentes populations:

a) *Artemia parthenogenetica* - Alcochete, Portugal.

b) *A. franciscana* - Castro Marim, Portugal.

c) *A. franciscana* - Great Salt Lake, Etats-Unis.

### III.1. Sélection d'*Artemia* sp. par croisements intra-spécifiques.

#### III.1.1. Isolement des géniteurs.

Les résultats des mesures des diamètres des cystes sont présentés sous la forme d'histogrammes de fréquence. C'est à partir de ces graphiques que nous avons choisi les diamètres des cystes à sélectionner afin d'isoler les deux extrêmes de la population initiale.

##### - *Artemia parthenogenetica* (Alcochete, Portugal).

Les résultats sont présentés à la Fig.3.1.a. Le diamètre des cystes varie de 210  $\mu\text{m}$  à 290  $\mu\text{m}$ . A partir de ce graphe, nous avons isolé les cystes dont le diamètre est inférieur ou égal à 210  $\mu\text{m}$  et supérieur ou égal à 270  $\mu\text{m}$ , sélectionnant ainsi 12,2% de la population initiale. Les données de fréquence sont présentées en Annexe 1.

##### - *Artemia franciscana* (Castro Marim, Portugal).

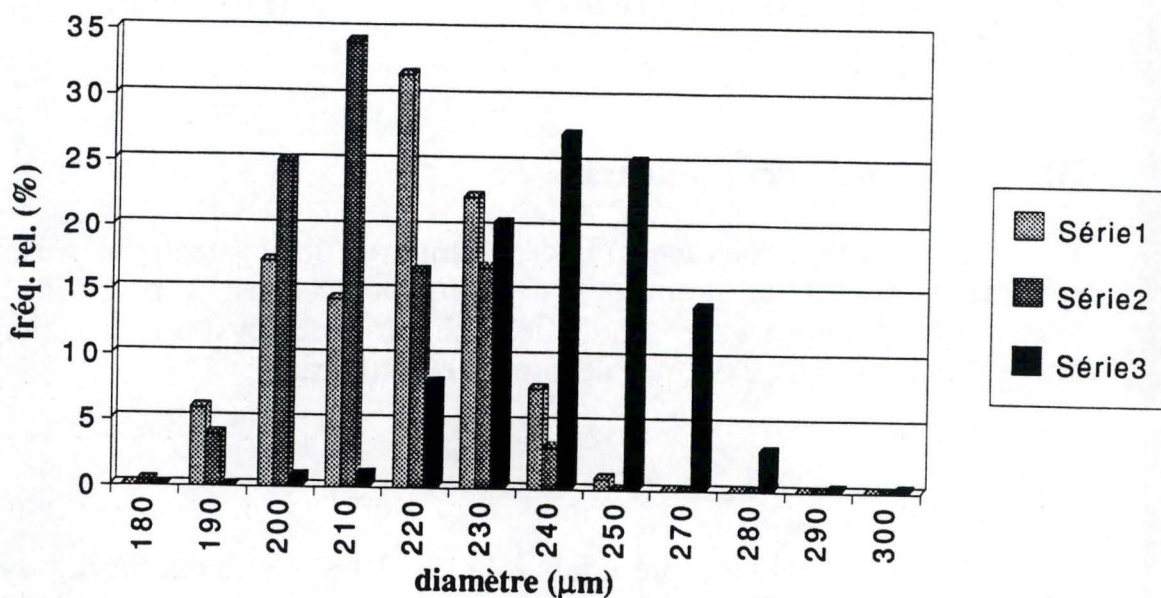
Les résultats sont montrés à la Fig.3.1.b. Les diamètres mesurés varient de 210  $\mu\text{m}$  à 280  $\mu\text{m}$ . Les cystes dont le diamètre est inférieur ou égal à 220  $\mu\text{m}$  ou supérieur ou égal à 270  $\mu\text{m}$  ont été isolés. Nous avons ainsi sélectionné 15,6% de la population initiale (Annexe 1).

##### - *Artemia franciscana* (Great Salt Lake, Etats-Unis).

La distribution de fréquence du diamètre des cystes est représentée à la Fig.3.1.c. et sur base de celle-ci nous avons isolé les cystes dont le diamètre est inférieur ou égal à 220  $\mu\text{m}$  ou supérieur ou égal à 280  $\mu\text{m}$ , sélectionnant 13,2% de la population (Annexe 1).

A partir de chaque lot de cystes isolés, nous avons obtenu les nauplii et ensuite les adultes qui nous ont servi de géniteurs.

Les lots de cystes provenant des populations portugaises ne nous ont donné aucun résultat, la mortalité des nauplii étant de 100%. Ce problème de mortalité a déjà été observé chez ces souches (NARCISO, comm.pers.). Par rapport à la souche américaine, la croissance était très lente et nous n'avons pas réussi à les maintenir jusqu'à l'état adulte. Seulement quelques uns y sont parvenus. Les croisements n'ont donc été effectué qu' à partir de la population de Great Salt Lake (*A. franciscana*).



**Fig.3.2.** Superposition des histogrammes de fréquence relative des diamètres des cystes géniteurs et des cystes F2.

Série 1. "grands" cystes F2

Série 2. "petits" cystes F2

Série 3. cystes géniteurs.

**Tab.3.1.** Tableau récapitulatif des résultats du test t de Student effectué pour la comparaison de différents groupes.

**Légende:** groupe 1: cystes obtenus en F2 provenant des croisements successifs effectués à partir des "petits" cystes géniteurs;  
groupe 2: cystes obtenus en F2 provenant des croisements successifs effectués à partir des "grands" cystes géniteurs;  
groupe 3: cystes géniteurs.

Groupe	Fréquence	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Groupe 1	284	213	12,25	0,73
Groupe 2	237	217	13,81	0,9
Groupe 3	500	244	16,46	0,74
Comparaison		ddl	t de Student	Prob.
Groupe 1- Groupe 2		519	-4,15	SS
Groupe 1- Groupe 3		782	27,9	SS
Groupe 2- Groupe 3		735	21,37	SS

### III.1.2. Sélection de deux populations biométriquement distinctes.

A partir de ces géniteurs, nous avons obtenu les nauplii (génération F1) que nous avons également fait grandir. Les croisements successifs des adultes effectués pour chaque lot nous ont donné des cystes de la génération F2. Pour des raisons de facilité, nous parlerons de "petits cystes" pour les cystes géniteurs dont le diamètre était inférieur à 220  $\mu\text{m}$  et de "grands" cystes pour ceux dont le diamètre était supérieur à 280  $\mu\text{m}$ .

Les distributions de fréquence des diamètres de ces cystes obtenus à partir de deux lots différents ont été comparées avec la distribution de fréquence de la population initiale (géniteurs). Les résultats sont représentés à la Fig.3.2. D'après celle-ci, nous pouvons voir que les courbes sont déplacées vers la gauche par rapport à la distribution initiale. La valeur du diamètre moyen obtenu pour la population initiale est de 244  $\mu\text{m}$ . En ce qui concerne les cystes de la génération F2, le diamètre moyen de ceux provenant du croisement des "petits" cystes géniteurs sélectionnés est de 212  $\mu\text{m}$  et celui des cystes F2 provenant des croisements successifs des "grands" cystes géniteurs est de 217  $\mu\text{m}$ .

Afin de comparer les moyennes des cystes obtenus en F2 par rapport à la moyenne de la population initiale, nous avons effectué le test t de Student après avoir vérifié l'homogénéité des variances et effectué la transformation des données si nécessaire. Les résultats sont donnés au Tab.3.1. Ceux-ci sont hautement significatifs, les moyennes des 2 lots de cystes obtenus en F2 sont donc différentes de la moyenne de la population initiale. Celles-ci sont plus petites et cela confirme les résultats observés par VANHAECKE et SORGELOOS (1980), ainsi que VANHAECKE (1983) selon lesquels, la plupart des cystes produits à partir de croisements purs sont plus petits que le matériel parental.

La comparaison effectuée entre les 2 lots de cystes obtenus en F2 a également été effectuée par un test t de Student. Le résultat est présenté au Tab.3.1. Les moyennes apparaissent significativement différentes. De plus, le diamètre moyen des cystes F2 provenant des croisements des "grands" cystes géniteurs est plus grand (217  $\mu\text{m}$ ) que celui obtenu pour les cystes F2 provenant des croisements des "petits" cystes géniteurs (212  $\mu\text{m}$ ). Ceci nous permet de penser que nous avons isolé deux populations biométriquement distinctes.

Selon TACKAERT et *al.* (1987), le diamètre des cystes paraît présenter une forte composante génotypique et le ou les facteurs génétiques responsables de cette caractéristique seraient liés aux chromosomes sexuels, dépendant exclusivement de la femelle parentale.

**Tab.3.2.** Résultat du test de l'analyse de la variance (ANOVA 1) effectué pour connaître l'effet du facteur ponté.

Source de la variation	ddl	S. des carrés	carré moyen	F de Scheffé	Prob.
entre groupes	15	69742,58	4649,51	119,14	SS
intra groupes	374	14595,15	39,02		
total	389	84337,73			

Afin de vérifier ce fait, nous avons également effectué la mesure des diamètres des cystes obtenus par ponte de femelles différentes. Les données sont présentées en Annexe 2. A partir de celles-ci, nous avons effectué le test d'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA 1). Les résultats sont présentés au Tab.3.2. Le facteur ponte a un effet hautement significatif. Si le diamètre des cystes est dépendant de la composante génotypique maternelle, cela suppose que la descendance de chaque femelle montre un ensemble de cystes ayant un diamètre similaire, mais qui varie de femelle par femelle.

Cependant, TACKAERT et *al.* (1987), VANHAECKE et SORGELOOS (1987) n'omettent pas le fait que des facteurs abiotiques déterminés puissent influencer le diamètre, surtout la salinité et le régime alimentaire. Ce fait paraît être confirmé par l'apparition d'oeufs d'été qui possèdent un chorion beaucoup plus fin et consécutivement un diamètre moindre. De fait, le diamètre moyen mesuré des oeufs d'été est de 201  $\mu\text{m}$  alors que le diamètre moyen des cystes F2 provenant du croisement de ces mêmes géniteurs est de 217  $\mu\text{m}$ . La différence entre ces deux valeurs divisée par deux nous donne l'épaisseur du chorion qui est donc de 8  $\mu\text{m}$ .

### III.1.3. Reproduction, fécondité et viabilité.

#### III.1.3.1. Ovoviviparité *versus* oviparité.

Les caractéristiques de la reproduction d'*Artemia* constituent un des aspects les plus spectaculaires de sa biologie, ceux-ci ayant la possibilité de produire des cystes. Ce phénomène est encore controversé et n'est pas complètement éclairci.

Les deux modes de reproduction (ovoviviparité ou oviparité) sont influencés par divers facteurs environnementaux tels la salinité, l'oxygène dissous, la qualité et la quantité d'aliment ainsi que des facteurs intrinsèques propres à chaque souche (cfr.I.5.2).

De fait, pour les individus de la première génération, nous avons augmenté graduellement la salinité pour arriver à minimum 60‰ à l'état adulte afin de provoquer la production de cystes (oviparité). Les premiers cystes ont été obtenus pour des salinités de l'ordre de 70‰.

La production d'oeufs d'été marque la transition entre le mode de reproduction ovovivipare et le mode de reproduction ovipare. En effet, les glandes coquillères ne secrètent pas encore le produit protecteur qui couvrira les embryons "dormants" dont le métabolisme est interrompu au stade de gastrula. Il s'agit bien d'embryons "dormants" car l'arrêt du

métabolisme est provoqué par le changement des conditions environnementales qui dans notre étude consiste en l'augmentation de la salinité du milieu et par conséquent une diminution de la quantité d'oxygène dissous. Cette diminution de la quantité en oxygène dissous provoque une augmentation de la concentration en hémoglobine et par là, la production d'hématine qui constituera le chorion protecteur (VIEIRA, 1989).

D'après D'AGOSTINO (1980), le type d'oeufs produit serait aussi influencé par la qualité et la quantité d'alimentation. Selon cet auteur, en conditions de laboratoire et naturelle, la première ponte des femelles d'*Artemia* est toujours ovovivipare, mais celle-ci peut être ovipare lorsque les femelles sont alimentées avec des phytoflagellés. Ce fait n'est cependant pas vérifié. D'après les données notées dans les tableaux des suivis journaliers (Annexe 3), la première ponte n'est pas toujours ovovivipare et l'alimentation n'est constituée que de chlorophycées ou de diatomées. Un tel fait a également été observé par VIEIRA (1989).

Que ce soit dans le cas de l'ovoviviparité ou de l'oviparité, les données existantes quant à la fécondité des souches d'*Artemia* sont très variables (VIEIRA, 1989). A partir de nos données notées dans les tableaux journaliers, nous avons étudié la fréquence ainsi que la dimension des pontes d'*A. franciscana* de Great Salt Lake.

### III.1.3.2. Fréquence des pontes.

En ce qui concerne la souche de Great Salt Lake étudiée, l'observation des tableaux des suivis journaliers des couples (Annexe 3) nous montre que la fréquence de ponte (nombre de jours entre le moment où est observé un couple en pré-copulation et le moment où la femelle libère les nauplii ou cystes) est de 4-5 jours comme cela l'a déjà été montré par différents auteurs sur différentes souches d'*Artemia* (DWIVEDI et al., 1980). Cependant, quelques cas sont notés où la fréquence de ponte est de 6 jours. Ceci peut être dû au fait que nous avons inspecté les couples une fois journalièrement. Il se peut que lors d'inspections à un jour d' intervalle, ceux-ci ne se trouvaient pas en position de pré-copulation mais que durant cet intervalle ils aient copulés. Des pontes de cystes ou de nauplii avec une fréquence constante variant de 4 à 6 jours ont cependant déjà été observées (VIEIRA, 1989).

Il est aussi à noter que le nombre de pontes par femelle n'est pas très important et varie de une à trois pontes dans le cas des géniteurs, la mortalité des individus étant atteinte après 4 à 6 semaines de leur isolement, c'est-à-dire âgés de 6 à 8 semaines. La mortalité chez les adultes

de la première génération est également observée 4 à 6 semaines après qu'ils aient atteints leur maturité sexuelle. Les femelles de la génération F1 n'ont effectué que une à deux pontes mais toujours avec une périodicité variant de 4 à 5 jours.

### III.1.3.3. Fécondité.

Les données notées dans les tableaux journaliers (annexe 3) montrent que le nombre de nauplii lors de la première ponte est assez variable (de 2 à 145 nauplii), mais avec en moyenne 34 nauplii/ponte.

En ce qui concerne le nombre de cystes, celui-ci aussi est variable avec en moyenne 23 cystes/ponte. Ces données correspondent à celles données par WIRICK (1972). Ainsi, selon cet auteur, pour une souche de Great Salt Lake, le nombre de nauplii par ponte est de 30 à 50 lorsque la reproduction est ovovivipare et de  $\pm 20$  cystes lorsque celle-ci est ovipare.

La fécondité (nombre d'oeufs) est donc variable. Selon AMAT (1985), il existe une relation entre le nombre de cystes ou de nauplii, l'âge de la femelle et sa longueur. Ainsi, lors de la première ponte, le nombre de cystes ou de nauplii peut varier de 10 à 30, tandis que lors des pontes suivantes, celui-ci peut aller de 100 à 400. Cependant, ce nombre apparaît très variable et est aussi dépendant des conditions ambiantes (salinité, alimentation) et présente également une certaine variabilité suivant la souche (WEAR et HASLETT, in LENZ, 1987, BROWNE, 1982 et VIEIRA, 1989).

### III.1.3.4. Eclosion et viabilité.

Afin de poursuivre nos expériences de croisements intra-spécifiques, nous avons mis les cystes F2 à éclore dans les mêmes conditions que les géniteurs, mais nous n'avons obtenus aucun nauplii. Les cystes ont d'abord été placés dans de l'eau saturée en sel. Suite à cette opération, comme ils n'étaient pas déshydratés, nous les avons mis à l'étuve pendant 24 heures à une température de 30°C. Avant de mettre ces cystes à éclore, nous avons vérifié, sous la loupe, que ceux-ci avaient bien la forme de cystes déshydratés. Ce laps de temps s'est révélé insuffisant pour obtenir la déshydratation qui n'a été obtenue, pour la majorité des cystes, qu'après 92 heures. Les cystes ont alors été mis à éclore mais aucun nauplii n'est né.

Le fait que ces cystes F2 provenant de cystes géniteurs sélectionnés n'aient pas éclos peut avoir plusieurs causes. En effet, différents facteurs

peuvent affecter l'éclosion des cystes. Parmi ceux-ci nous pouvons citer les facteurs génétiques, les conditions de culture, mais aussi les techniques appliquées pour le nettoyage, le séchage et le stockage du matériel.

#### III.1.3.4.1. Les facteurs génétiques.

La capacité d'éclosion des cystes d'*Artemia* diffère en fonction des espèces ou de l'origine géographique. Des différences génotypiques peuvent être à la base de caractéristiques d'éclosion différentes parmi les populations d'*Artemia* (VANHAECKE et SORGELOOS, 1982, TACKAERT et *al.*, 1987) comme c'est le cas chez les rotifères. Cependant, il n'existe pas de preuve décisive. BROWNE et *al.* (1984) ont comparé ces caractéristiques chez 12 souches et ils ont trouvé que l'éclosion était fortement corrélée avec l'environnement et non avec le génotype.

#### III.1.3.4.2. Les conditions de culture.

Le biotope peut interférer sur la qualité d'éclosion des cystes. Il semble qu'il y ait une interaction étroite entre la quantité de nourriture ou la salinité du milieu et les cystes produits.

- la quantité de nourriture.

La quantité de nourriture disponible pour les adultes en phase de reproduction apparaît être le paramètre de première importance agissant sur la qualité d'éclosion des cystes descendants (LAVENS et *al.*, 1986). Cette corrélation a été confirmée par TACKAERT et *al.* (1987) qui utilisent des algues vivantes comme source nutritive. Cette interaction n'est cependant pas claire et l'hypothèse d'un effet sur la viabilité des cystes au sens strict a été émise (LAVENS et SORGELOOS, 1987).

- la salinité.

Selon VERSICHELE et SORGELOOS (1980), les cystes produits à une basse salinité ont un taux d'éclosion plus faible. Ainsi, 50% de différence sont notées chez des populations de San Francisco Bay cultivées en laboratoire à des salinités de 35 et 90‰. D'un autre côté, de trop hautes salinités (>150‰) semblent avoir un effet négatif sur l'éclosion (DANA et LENZ, 1986, VERSICHELE et SORGELOOS, 1980). VERSICHELE a

par ailleurs mis en évidence une corrélation directe entre la capacité d'éclosion faible des cystes et la concentration moindre en hématine contenue dans la paroi des cystes produits à de faibles salinités.

Différents facteurs semblent donc influencer l'éclosion des cystes d'*Artemia*. Cependant, en rapport à ces facteurs, nous avons travaillé avec une souche utilisée commercialement, possédant donc de bonnes caractéristiques d'éclosion. En ce qui concerne le quantité de nourriture et la salinité, les animaux étaient nourris journalièrement avec des algues vertes vivantes tandis que, la salinité utilisée pour la production de cystes variait de 70 à 120‰. Ceux-ci ne semblent donc pas responsables de l'incapacité d'éclosion des cystes obtenus en F2.

- autres facteurs.

D'autres facteurs réduisent aussi l'éclosion des cystes d'*Artemia*: Des niveaux de déshydratation insuffisants, de trop longues périodes d'hydratation/déshydratation peuvent mener à une sérieuse perte de la viabilité des cystes (SORGeloos et al., 1986, LAVENS et SORGeloos, 1987).

Ainsi, les cystes exposés durant une trop longue période à des niveaux en eau excédant 65% complètent leur développement jusqu'à l'état de pré-émergence. Une déshydratation successive ne mènera pas à l'interruption réversible du métabolisme mais à la mort des embryons différenciés (LAVENS et SORGeloos, 1987).

Une déshydratation insuffisante qui se marque par un contenu en eau variant de 30 à 65% empêchera un arrêt des activités métaboliques et par là, une perte du contenu énergétique. Celui-ci n'a plus alors un niveau suffisant pour permettre la reprise du métabolisme lorsque les cystes sont mis à incuber sous les conditions optimales. Une perte du contenu énergétique peut aussi avoir lieu lorsque les cystes sont soumis à des cycles successifs d'hydratation/déshydratation.

En rapport avec notre expérience, il semble qu'il y ait un problème au niveau de la perméabilité du chorion protecteur. En effet, le laps de temps nécessaire à la déshydratation des cystes était anormalement long. Durant ce laps de temps, les cystes n'étaient probablement pas complètement amétaboliques. En effet, les cystes ne sont amétaboliques que lorsque leur contenu en eau est inférieur à 0,1 g d'eau/g de poids sec. Cette condition (10% du poids en eau) est nécessaire pour la reprise

**Tab.3.3.** Statistiques descriptives concernant les mesures des diamètres des cystes (a) et des cystes décapsulés (b) pour divers échantillons.

**Légende:** GSL: Great Salt Lake,  
 CM: Castro Marim,  
 Al: Alcochete,  
 Tt: Tientsin,  
 CYS: Chai Yaneng, Shandong.

**a**

	GSL	Chypre	CM	Faro	Al	Tt	CYS
Moyenne	254,9	251,0	252,0	232,3	234,2	272,0	266,9
Minimum	210	220	210	200	210	220	200
Maximum	300	280	280	250	290	310	310
Dev.std.	16,61	15,69	14,13	10,60	16,31	16,28	17,39
Erreur std.	0,96	0,91	0,82	0,61	0,94	0,94	1,00
Variance	275,92	246,09	199,80	112,26	265,91	264,88	302,27
Coef.var.	6,52	6,25	5,61	4,56	6,96	5,98	6,51

**b**

	GSL	Chypre	CM	Faro	Al	Tt	CYS
Moyenne	235,6	224,4	234,3	220,5	226,1	245,9	247,2
Minimum	200	190	200	190	200	210	210
Maximum	290	250	280	250	280	300	290
Dev.std.	14,70	11,30	11,67	10,33	12,18	15,91	16,44
Erreur std.	0,85	0,65	0,67	0,60	0,70	0,92	0,95
Variance	216,07	127,69	136,30	106,74	148,36	253,03	270,25
Coef.var.	6,24	5,04	4,98	4,68	5,39	6,47	6,65

ultérieure du métabolisme. Si les cystes ne sont pas complètement amétaboliques, ceux-ci continuent à dépenser de l'énergie, celle-ci n'étant plus suffisante pour permettre la reprise du métabolisme par la suite.

Nous avons également déjà fait référence à l'imperméabilité de la membrane cuticulaire externe aux molécules organiques non volatiles (cfr.I.5.1.1). Les sources énergétiques et les substrats nécessaires au métabolisme doivent donc être présents dans la gastrula. La principale source d'énergie est l'  $\alpha$ ,  $\alpha$ -tréhalose. Celui-ci fournit aussi le substrat pour la synthèse du glycérol et du glycogène. Or, le glycérol est impliqué dans l'absorption d'eau par les cystes qui mène à la rupture du chorion protecteur.

Nous pensons donc que le fait que les cystes n'aient pas éclos soit la conséquence d'une carence énergétique due à une déshydratation anormalement longue.

Nous ne pouvons cependant avancer aucune explication biochimique avec certitude car nous ne possédons aucune indication sur les concentrations de tréhalose et de glycérol contenues dans ces cystes, ni sur leur contenu en eau.

## III.2. Analyse des caractéristiques biométriques.

### III.2.1. Analyse de la variabilité interpopulationnelle.

#### III.2.1.1. Etude comparative du diamètre des cystes et des cystes décapsulés.

Les données reprenant les statistiques descriptives (moyenne, minimum, maximum, déviation standard, erreur standard, variance et coefficient de variation) effectuées à partir des mesures des diamètres des cystes non décapsulés et décapsulés sont montrées au Tab.3.3 (a et b).

A première vue, il apparaît que les diamètres mesurés sur les échantillons provenant de Tientsin et de Chai Yaneng (espèces parthénogénétiques) sont plus grands (272  $\mu\text{m}$  et 266,9  $\mu\text{m}$  respectivement) par rapport à ceux des espèces bisexuelles du Portugal, des Etats-Unis et de Chypre (moyennes allant de 232,3 à 254,9  $\mu\text{m}$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de VANHAECKE et SORGELOOS (1980) suivant lesquels les cystes des souches parthénogénétiques présentent un diamètre plus grand que celui des souches bisexuelles. Par

contre, c'est le contraire qui est observé en ce qui concerne l'échantillon d'Alcochete (espèce parthénogénétique) dont le diamètre moyen est de 234,2  $\mu\text{m}$ . Ces mêmes résultats sont obtenus à partir des mesures effectuées sur les cystes décapsulés: les échantillons provenant des populations parthénogénétiques de Tientsin et de Chai Yaneng présentent aussi un diamètre plus grand (245,9 et 247,2  $\mu\text{m}$  respectivement), à l'exception de l'échantillon d'Alcochete dont le diamètre moyen est de l'ordre de ceux trouvés pour les échantillons des populations bisexuelles.

En ce qui concerne les populations portugaises, le diamètre moyen des cystes mesurés des populations d'Alcochete (234,2  $\mu\text{m}$ ) et de Faro (232,3  $\mu\text{m}$ ) sont proches de ceux obtenus par VILELA et BRANCO (1987), lesquels ont effectué la caractérisation des souches portugaises. Ainsi, selon ces auteurs, le diamètre moyen des cystes d'Alcochete serait de  $241,2 \pm 10,2$   $\mu\text{m}$  et, dans le cas de Faro (S.Francisco), de  $230,4 \pm 11,1$   $\mu\text{m}$ . Par contre, nos mesures pour la population de Castro Marim (252  $\mu\text{m}$ ) diffèrent grandement des leurs ( $231,2 \pm 8$   $\mu\text{m}$ ). Cela peut être dû au fait que leurs mesures n'aient été effectuées que sur un échantillonnage de 50 cystes, ce nombre paraissant assez faible. Un échantillon de 100 cystes ne paraît pas non plus suffisant pour détecter des différences spécifiques et caractériser la population correspondante (PAULO, 1992).

En ce qui concerne la population de Chypre (*A. tunisiana*), nos mesures (251  $\mu\text{m}$ ) correspondent à celles effectuées sur *A. tunisiana* de Tunisie. Ainsi, le diamètre moyen de différentes populations tunisiennes est de  $258,8 \pm 14,9$   $\mu\text{m}$  (population de Mégrine) et de  $251,6 \pm 13,6$   $\mu\text{m}$  (population de Bekalta) (VAN BALLAER et al., 1987). Ces résultats correspondent également pour les cystes décapsulés, la population de Chypre présentant un diamètre moyen de 224,4  $\mu\text{m}$ , celle de Mégrine un diamètre moyen de  $234,1 \pm 11,7$   $\mu\text{m}$  et celle de Bekalta un diamètre moyen de  $228,0 \pm 12,2$   $\mu\text{m}$ .

Ces résultats nous montrent qu'il existe donc des différences entre les souches bisexuelles et parthénogénétiques, mais que nous pouvons également mettre en rapport certaines populations sur base de l'étude du diamètre des cystes. Pour vérifier cela, nous avons étudié la variabilité interpopulationnelle.

De nos résultats, il apparaît aussi que les souches parthénogénétiques de Chine (Tientsin et Chai Yaneng) sont caractérisées par un plus grand diamètre des cystes, comme cela l'a déjà été montré pour les souches parthénogénétiques de Chine, France, Italie et Inde par VANHAECKE et SORGELOOS (1980). Cette caractéristique peut être mise en rapport avec le degré de ploïdie.

**Tab.3.4.** Résultat du test de l'analyse de la variance (ANOVA 1) effectué pour étudier la variabilité interpopulationnelle.

Source	ddl	S. des carrés	Carré moyen	Test-F	Prob.
Entre groupes	6	400833,24	66805,54	280,51	SS
Intra-groupes	2093	498471,33	238,16		
Total	2099	899304,57			

**Tab.3.5.** Tableau récapitulatif donnant les résultats du test de Scheffé effectué à la fois pour les cystes et les cystes décapsulés.

Comparaison	Cystes			Cystes décapsulés		
	Diff.Moy.	F de Scheffé	t de Dunnett	Diff.Moy.	F de Scheffé	t de Dunnett
Alcochete vs. Great Salt Lake	-20,7	45,12*	16,45	-9,5	12,55*	8,68
Alcochete vs. Castro Marim	-17,8	33,13*	14,1	-8,2	9,43*	7,52
Alcochete vs. Faro	1,9	0,37	1,48	5,5	4,26*	5,05
Alcochete vs. Tientsin	-37,8	149,99*	30	-19,8	54,7*	18,12
Alcochete vs. Chypre	-16,8	29,74*	13,36	1,7	0,4	1,55
Alcochete vs. Shai Yaneng	-32,7	112,47*	25,98	-21,2	62,3*	19,33
Great Salt Lake vs. Castro Marim	3,0	0,92	2,35	-1,3	0,22	1,16
Great Salt Lake vs. Faro	22,6	53,61*	17,94	-15,0	31,43*	13,73
Great Salt Lake vs. Tientsin	-17,1	30,57*	13,54	-10,3	14,85*	9,44
Great Salt Lake vs. Chypre	3,9	1,6	3,1	11,2	17,44*	10,23
Great Salt Lake vs. Shai Yaneng	-12,0	15,12*	9,52	11,7	18,93*	10,66
Castro Marim vs. Faro	19,6	40,46*	15,58	13,8	26,36*	12,58
Castro Marim vs. Tientsin	-20,0	42,13*	15,9	-11,6	18,71*	10,6
Castro Marim vs. Chypre	0,9	0,09	0,74	9,9	13,72*	9,07
Castro Marim vs. Shai Yaneng	-15,0	23,51*	11,88	12,9	23,26*	11,81
Faro vs. Tientsin	-39,7	165,17*	31,48	-25,4	89,48*	23,17
Faro vs. Chypre	-18,7	36,71*	14,84	-3,8	2,04	3,5
Faro vs. Shai Yaneng	-34,6	125,67*	27,46	26,7	99,14*	24,39
Tientsin vs. Chypre	21,0	46,15*	16,64	21,5	64,48*	19,67
Tientsin vs. Shai Yaneng	5,1	2,69*	4,02	1,3	0,25	1,22
Chypre vs. Shai Yaneng	-15,9	26,54*	12,62	22,9	72,71*	20,89

\* Significatif à 95%

Nous avons effectué une analyse de la variance à un critère de classification à la fois pour les données concernant les cystes et les cystes décapsulés. Les résultats sont donnés aux Tab.3.4. Le facteur population a un effet hautement significatif dans les deux cas. Nous rejetons donc l'hypothèse nulle de l'homogénéité des moyennes.

Afin de connaître les groupes qui diffèrent, nous avons effectué le test des comparaisons multiples de Scheffé's. Les résultats sont présentés au Tab.3.5.

En ce qui concerne les cystes, différents groupes d'échantillons ne paraissent pas différer. Il s'agit des suivants:

- Alcochete-Faro;
- Great Salt Lake-Castro Marim;
- Great Salt Lake-Chypre;
- Castro Marim-Chypre.

En ce qui concerne les cystes décapsulés, les groupes d'échantillons qui ne paraissent pas différer sont les suivants:

- Alcochete-Chypre;
- Chai Yaneng-Tientsin;
- Castro Marim-Great Salt Lake;
- Faro-Chypre.

Ces résultats sont très intéressants. Tout d'abord, les populations originaires de Chine ne diffèrent pas, ce à quoi nous nous attendions. Il s'agit en effet de deux populations parthénogénétiques.

Un deuxième point est le fait que la population de Castro Marim ne diffère pas de celle de Great Salt Lake. Ce résultat confirme celui déjà trouvé par PAULO (1992). La population de Castro Marim (*A. franciscana*) aurait été introduite et serait originaire de celle des Etats-Unis. Cette population existerait d'ailleurs au moins depuis 1982 (NARCISO, 1989).

Nous avons également obtenu une similarité entre les populations de Castro Marim (Portugal) et de Chypre. En effet, la possibilité de l'existence d'une population d'*Artemia tunisiana* à Castro Marim a été invoquée par PAULO (1992). La possibilité d'une coexistence des deux espèces (*A. tunisiana* et *A. franciscana*) dans une saline est tout à fait plausible. De fait, *A. tunisiana* est présente dans les salines du sud de l'Espagne (AMAT, 1985), ainsi qu'au niveau de toute l'Europe et du nord de l'Afrique. Son introduction pourrait donc être due aux migrations des oiseaux. Ceux-ci peuvent transporter les cystes d'une saline à l'autre,

Tab.3.6. Tableau donnant l'épaisseur du chorion calculée pour divers échantillons.

Origine	Epaisseur du chorion ( $\mu\text{m}$ )
Great Salt lake	9,7
Chypre	13,3
Castro Marim	8,8
Faro	5,9
Alcochete	4,1
Tientsin	13
Chai Yaneng, Shandong	9,8

procédant ainsi à des inoculations successives. Par ailleurs, l'existence d'une population d'*A. franciscana* est confirmée par des expériences qui ont mis en évidence l'isolement reproducteur entre *A. franciscana* et *A. tunisiana* (NARCISO, 1989).

Un autre point important consiste au fait que nous puissions arriver à identifier différentes populations à partir de la mesure du diamètre des cystes. VANHAECKE et SORGELOOS (1980) ont déjà démontré qu'il existait des différences fondamentales entre la taille des cystes et également des nauplii des diverses souches. En effet, l'isolement géographique et les conditions d'habitats spécifiques ont mené à divers phénotypes possédant des caractéristiques biologiques, chimiques et physiologiques différentes. La caractérisation biométrique ainsi que l'étude d'autres paramètres tels le pourcentage d'éclosion, la valeur nutritive des nauplii fraîchement éclos sont importants en vue d'applications spécifiques en aquaculture (VANHAECKE et SORGELOOS, 1987).

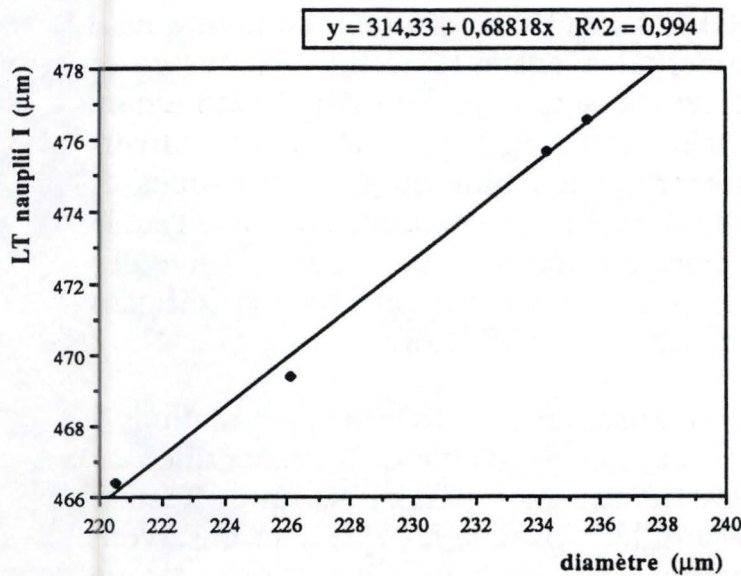
En ce qui concerne la caractérisation de différentes populations à partir de la mesure du diamètre des cystes, il semble qu'un échantillon de 300 cystes soit suffisant à cet effet. Cependant, il paraît plus sûr d'effectuer les mesures à partir des cystes décapsulés. Ainsi, le fait que nous observons une différence entre les populations de cystes de Chai Yaneng et de Tientsin, alors que celles-ci ne diffèrent pas si nous comparons le diamètre des cystes décapsulés peut être lié à l'épaisseur du chorion. En effet, celle-ci est variable suivant les conditions écologiques du milieu et spécialement dans des conditions de stress en oxygène dissous. Celui-ci provoque une augmentation d'hématine et en conséquence une plus grande épaisseur du chorion (AMAT, 1982). Nous avons également observé une similarité entre les populations d'Alcochete et de Faro, ainsi que celle d'Alcochete et de Chypre alors que la population d'Alcochete est parthénogénétique et celles de Faro et de Chypre bisexuelles.

Les mesures des diamètres des cystes et des cystes décapsulés nous ont également permis de calculer l'épaisseur du chorion des différentes populations. Les résultats sont présentés au Tab.3.6.

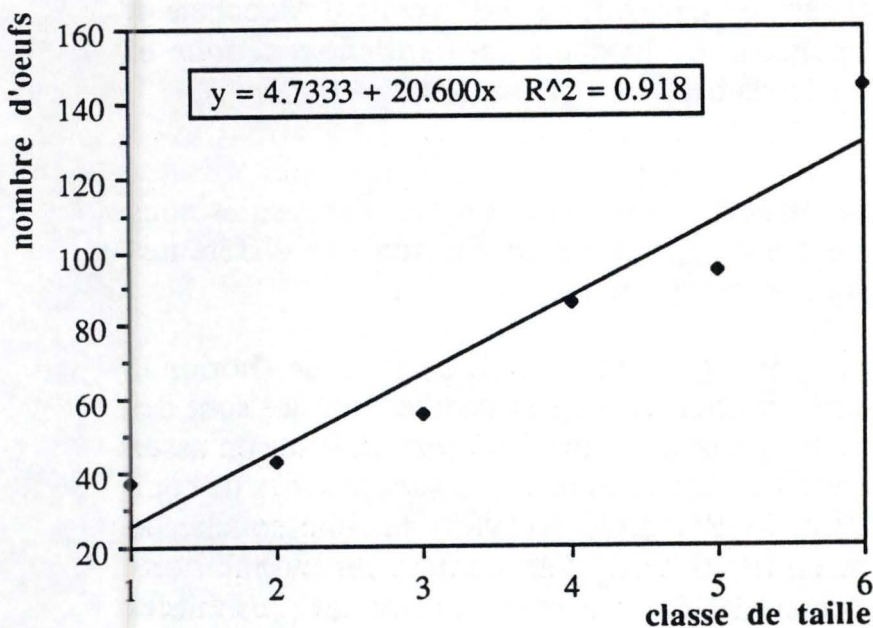
C'est la population de Chypre qui présente l'épaisseur de chorion la plus épaisse. Les populations de Chai Yaneng et de Tientsin qui sont des populations parthénogénétiques présentent une épaisseur de chorion assez épaisse (13,3 et 9,8  $\mu\text{m}$  respectivement). Ces résultats sont proches de ceux trouvés par VANHAECKE et SORGELOOS (1980) sur une souche de Chine de localité inconnue (10,20  $\mu\text{m}$ ). Par contre, les populations d'Alcochete et de Faro présentent les épaisseurs de chorion les plus faibles (4,1 et 5,9  $\mu\text{m}$ ).

**Tab.3.7.** Tableau récapitulatif présentant le diamètre moyen des cystes et des cystes décapsulés, l'épaisseur du chorion et la longueur totale des nauplii fraîchement éclos pour différentes populations.

Origine	Diamètre moyen des cystes (µm)	Diamètre moyen (µm) des cystes décapsulés	Epaisseur du chorion (µm)	Longueur tot. nauplii I(µm)
Great Salt Lake	254,9	235,6	9,7	476,6
Castro Marim	252	234,3	8,8	475,7
Faro	232,3	220,5	5,9	466,4
Alcochete	234,2	226,1	4,1	469.4



**Fig.3.3.** Graphe représentant la taille des nauplii fraîchement éclos en fonction du diamètre des cystes décapsulés.



Classes de taille: 1: 6,6-7,9 mm;  
 2: 8,1-8,9 mm;  
 3: 9,2-9,8 mm;  
 4: 10-11 mm;  
 5: 11,1-11,9 mm;  
 6: 12,1-12,7 mm

**Fig.3.4.** Graphe représentant le nombre d'oeufs en fonction de la classe de taille des femelles d'*Artemia franciscana* (Great Salt Lake, Etats-Unis).

VANHAECKE et SORGELOOS (1980) ont déjà démontré qu'il existait de grandes différences en ce qui concerne la taille des cystes et l'épaisseur du chorion de différentes souches. D'après ces auteurs, les paramètres biométriques en général sont des caractéristiques spécifiques et peuvent être considérés comme de bons outils pour la caractérisation des souches d'*Artemia*.

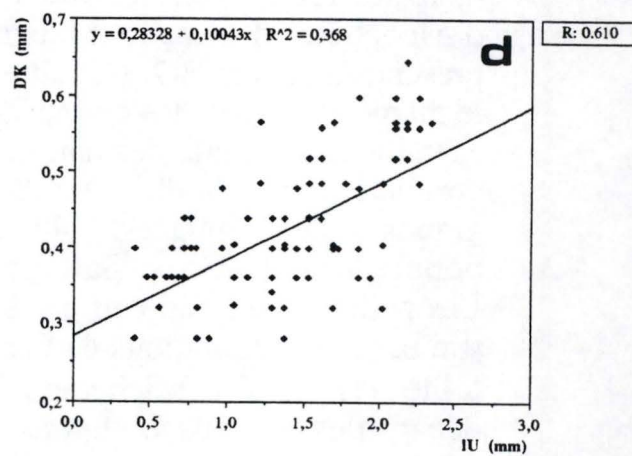
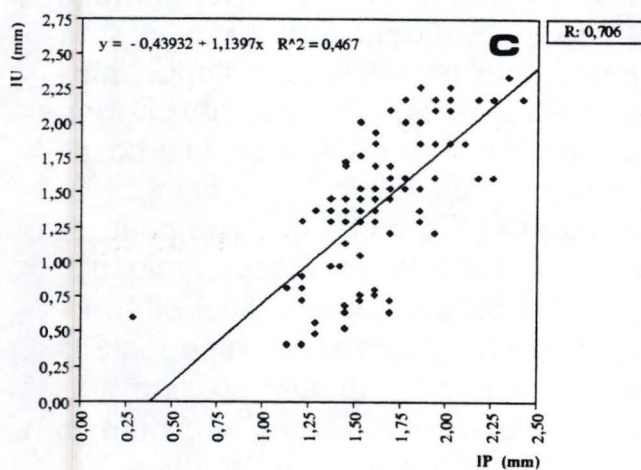
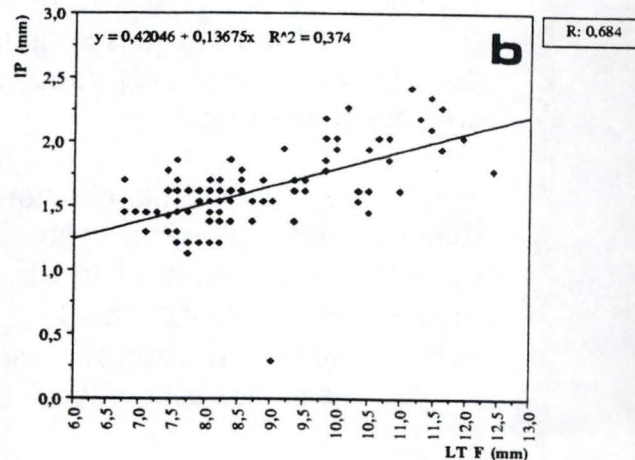
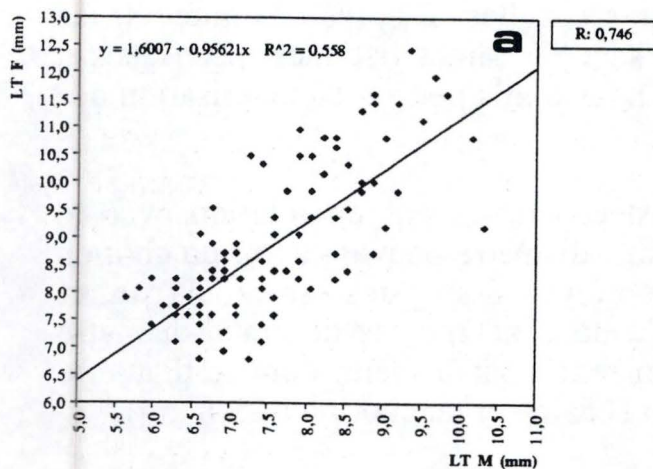
L'épaisseur du chorion n'est cependant pas en relation avec le diamètre des cystes, un cyste de faible diamètre pouvant avoir un chorion épais (ex: Chypre dont le diamètre moyen des cystes est de 251  $\mu\text{m}$  et l'épaisseur du chorion de 13,3  $\mu\text{m}$ ), alors qu'un cyste de grand diamètre peut posséder un chorion assez fin (ex: Chai Yaneng dont le diamètre moyen des cystes est de 266,9  $\mu\text{m}$  et l'épaisseur du chorion de 9,8  $\mu\text{m}$ ).

### III.2.1.2. Etude comparative du diamètre des cystes et de la longueur totale des nauplii.

Nous avons également effectué la mesure de la longueur totale des nauplii fraîchement éclos. Ces mesures concernent les populations d'Alcochete, de Castro Marim, de Faro et de Great Salt Lake et sont présentées au Tab.3.7. Ce tableau reprend pour les différentes populations le diamètre moyen des cystes, des cystes décapsulés, l'épaisseur du chorion et la longueur totale des nauplii. Nous pouvons voir qu'il existe une bonne corrélation entre le diamètre des cystes et la longueur totale des nauplii, les grands cystes donnant de plus grands nauplii (476,6 et 475,7  $\mu\text{m}$  pour les populations de Great Salt Lake et de Castro Marim respectivement). Les petits cystes donnent par contre de plus petits nauplii (466,4 et 469,4  $\mu\text{m}$  pour les populations de Faro et d'Alcochete). Nous avons représenté la taille des nauplii fraîchement éclos en fonction du diamètre des cystes décapsulés et nous obtenons une droite de régression linéaire dont le coefficient de corrélation  $R^2$  est de 99,4 (Fig.3.3). Cette corrélation a déjà été mise en évidence par VANHAECKE et SORGELOOS (1980) ainsi que par VILELA et BRANCO (1987).

### III.2.2. Taux de fécondité.

Les données obtenues sont représentées sous la forme de graphe donnant le nombre d'oeufs en fonction de la classe de taille des femelles (Fig.3.4). Celui-ci nous montre qu'il existe une corrélation positive ( $R^2=0,918$ ) entre les deux variables, classe de taille et nombre d'oeufs, comme attendu et comme l'a déjà établi MARGALEF (1974) pour les femelles de copépodes cyclopoïdes. Dans le cas d'*Artemia*, la capacité reproductive augmente avec la taille comme cela l'a également été



**Fig.3.5.** Graphiques de corrélation des différentes mesures effectuées:

- a) longueur totale de la femelle/ longueur totale du mâle,
- b) largeur de la pince du mâle/ longueur totale de la femelle,
- c) largeur de l'utérus/ longueur de la pince du mâle,
- d) distance entre les yeux du mâle/ largeur de l'utérus.

démontré par AMAT (1980) et VIEIRA (1989). Cependant, cette relation peut se modifier à partir d'un certain âge lorsque les capacités reproductives des femelles commencent à diminuer (VIEIRA, 1989).

AMAT (1980) a en effet étudié le taux de fécondité de femelles bisexuelles et parthénogénétiques de souches espagnoles. Ainsi, en conditions de culture, les femelles parthénogénétiques tétraploïdes produisent à peu près 30 nauplii ou cystes lorsqu'elles atteignent des longueurs de 10-11 mm et 150 à 160 lorsque leur taille atteint 16-17 mm. Les souches bisexuelles américaines apparaissent donc beaucoup plus prolifères, les femelles de Great Salt Lake produisant en moyenne 144 oeufs pour une taille variant de 12,1 à 12,7 mm. Ce fait est également montré chez les femelles de San Francisco Bay, celles-ci produisant de l'ordre de 50 nauplii ou cystes durant leur premier cycle reproductif et 300 à 350 lorsqu'elles atteignent 14 à 15 mm de longueur. Ce taux de fécondité différent entre les souches bisexuelles et parthénogénétiques peut être dû à la différenciation chromosomique ou à la polyploïdie (BROWNE, 1982).

Le nombre de cystes ou de nauplii par ponte peut être relié allométriquement à la taille de la femelle et le nombre haploïde de chromosome. Cette relation peut aussi être exprimée par les équations mathématiques suivantes (VILELA et BRANCO, 1987):

$$N = a L^3 \text{ et } N = b L^3/n \text{ où}$$

- N=nombre de cystes ou de nauplii par ponte et taille des femelles;
- L=taille de la femelle (mm);
- n=nombre haploïde de chromosomes.

### III.2.3. Interactions morphologiques entre le mâle et la femelle en copulation.

Les résultats sont présentés sous la forme de graphes montrant la corrélation existante entre deux variables (Fig.3.5.a, b, c et d). Les meilleurs résultats sont obtenus dans les 4 cas suivants:

- tailles totales du mâle et de la femelle;
- largeur de l'utérus et largeur de la pince du mâle;
- longueur totale de la femelle et largeur de la pince du mâle;
- largeur de l'utérus et distance entre les protubérances frontales.

Dans ces quatre cas, nous obtenons une corrélation positive, la meilleure étant obtenue entre les longueurs totales du mâle et de la femelle ( $R:0,746$ , Fig.3.5.a). Il existe également une bonne corrélation entre la largeur de l'utérus de la femelle et la longueur de la pince du mâle ( $R:0,706$ , Fig.3.5.c), comme nous pouvions nous y attendre. Les relations existantes sont de type linéaire. En effet, en période de pré-copulation plus communément nommée "riding position", le mâle s'accroche et s'agrippe à l'aide de ses antennes modifiées en pinces au niveau de l'utérus de la femelle. Il faut donc que la longueur des pinces, ainsi que la distance entre les protubérances frontales soient suffisamment grandes pour permettre au mâle de s'accrocher et de tenir la femelle. D'après nos résultats, il semble également cependant exister une relation entre les longueurs totales du mâle et de la femelle. Ces résultats nous montre donc qu'il pourrait exister certaines incompatibilités morphologiques entre les individus de sexe opposé lors de la copulation.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

## IV. CONCLUSION GÉNÉRALE.

Un pas très important est fait en aquaculture lorsque SEALE en 1933 et ROLLEFSEN en 1939 découvrent que les nauplii d'*Artemia* de 400  $\mu\text{m}$  constituent un excellent aliment pour les larves de poissons et de crustacés. Actuellement, les nauplii d'*Artemia* constituent un aliment indispensable dans toutes les unités de culture larvaire de poissons et de crustacés marins.

*Artemia* est un petit crustacé branchiopode. Cet animal possède des adaptations éco-physiologiques aux conditions hypersalines des milieux où il vit (salines et lacs salés). De telles adaptations consistent en un système d'osmorégulation efficace, la possibilité de synthétiser différents pigments respiratoires et finalement leur possibilité de se reproduire selon deux modes: ovoviviparité et oviparité suivant que les conditions environnementales soient favorables ou non. Quand la reproduction est ovipare, *Artemia* produit des oeufs qui se trouvent en cryptobiose. Ceux-ci sont des embryons amétaboliques entourés par un chorion protecteur et sont nommés cystes.

Techniquement, *Artemia* présente donc un grand avantage puisque nous pouvons travailler à partir d'un produit inerte, les cystes déshydratés. Les cystes, lorsqu'ils sont préservés de toute humidité peuvent rester viables durant plusieurs décades. Cette caractéristique représente tout d'abord un avantage pour la préservation de l'espèce dans des biotopes inhospitaliers telles les salines et est ensuite d'une importance primordiale en aquaculture, étant donné la facilité de manutention et de stockage de ce crustacé. De plus, cette caractéristique alliée au profil nutritif remarquable font de celui-ci un des éléments trophiques fondamentaux utilisés dans toutes les cultures larvaires de poissons et de crustacés marins.

Étant donné la distribution cosmopolite d'*Artemia*, il existe un grand nombre de souches possédant des caractéristiques différentes tels le taux d'éclosion, la taille des nauplii, la viabilité, la température optimale,... Différents critères de qualité ont été définis, et ont comme conséquence l'utilisation de certaines souches en fonction de ces caractéristiques et des usages auxquels elles sont destinées. La souche la plus connue et la plus utilisée est celle de San Francisco Bay, Californie, États-Unis. Celle-ci est actuellement remplacée par d'autres souches spécifiques disponibles localement dans divers pays. Les études biométriques des populations d'*Artemia* sont indispensables afin de caractériser ces souches et de recueillir des informations quant à leur possible utilisation en aquaculture marine.

Les différents critères de qualité concernent l'éclosion mais aussi la biométrie. Les résultats de la variabilité interpopulationnelle nous montrent que nous pouvons déterminer l'origine spécifique des populations à partir d'un échantillonnage de 300 cystes. Le diamètre des cystes présente donc

une forte composante génotypique qui serait le résultat des adaptations à long terme des souches aux différentes conditions locales (VANHAECKE et SORGELOOS, 1987). De plus, le diamètre des cystes est également dépendant de la composante génotypique maternelle, la descendance de chaque femelle présentant un ensemble de diamètres similaires mais qui varie de femelle par femelle. Cependant, il ne faut pas omettre le fait que des facteurs abiotiques déterminés (salinité et régime alimentaire) influencent également ce diamètre (TACKAERT et al., 1987). Quant à l'épaisseur du chorion, celle-ci n'est pas en relation avec le diamètre des cystes, mais est influencée par les conditions environnementales. En raison de ce fait, nous conseillons d'effectuer les mesures des diamètres sur des cystes décapsulés, c'est-à-dire sur des cystes dont le chorion a été dissous. Il ne reste alors que l'embryon entouré par la cuticule embryonnaire. Le diamètre des cystes est donc une caractéristique spécifique qui présente une forte composante génotypique liée au sexe.

Les cystes d'*Artemia*, après 24 heures d'incubation dans de l'eau de mer, donnent naissance à des nauplii libres. Ces nauplii fraîchement éclos constituent non seulement la meilleure, mais aussi la source d'aliment vivant la plus utilisée pour les larves de poissons et de crustacés dans la majorité des programmes d'aquaculture. La taille des nauplii fraîchement éclos paraît corrélée avec le diamètre des cystes, en prenant en compte l'épaisseur du chorion respective. La connaissance de la taille de ces nauplii est de grande importance. En effet, pour beaucoup de larves de poissons et de crustacés, la taille des nauplii est un facteur limitant déterminant leur valeur comme aliment. Beaucoup d'états larvaires de diverses espèces doivent être nourris en premier avec des microalgues, suivi de zooplancton, avant d'être alimentés avec les nauplii et métonauplii d'*Artemia* (SORGELOOS et al., 1986). Cependant, de graves problèmes peuvent surgir quand la relation taille prédateur/proie n'est pas respectée et que nous fournissons aux larves en culture des nauplii de taille supérieure à ce que les prédateurs peuvent déglutir. Des mortalités massives peuvent alors se produire étant donné que les larves en culture meurent de faim. La possibilité de sélectionner deux populations biométriquement distinctes prend donc ici tout son intérêt à des fins d'utilisation en aquaculture, la taille des nauplii étant en étroite relation avec le diamètre des cystes.

Nous avons réussi par croisements successifs à isoler deux populations biométriquement distinctes. Par croisements successifs des "petits" géniteurs, nous avons obtenu une population de "petits" cystes F2. Par contre, les croisements successifs des "grands" géniteurs nous ont donné une population F2 dont le diamètre moyen était plus grand que celui des "petits" cystes mais inférieur à celui de la population initiale.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons travaillé avec deux extrêmes d'une population, ce qui correspond statistiquement à la

taille ♀  
- taille  
- sexe

probable nauplii

viabilité  
cyste

zone de rejet. Les résultats ne sont donc pas prévisibles. Toutefois, au niveau populationnel, le diamètre des cystes est bien un caractère déterminé génétiquement.

Cependant, les cystes ainsi obtenus n'ont pas éclos. Ceci semble lié à la déshydratation des cystes qui est anormalement longue. Les cystes continuent à dépenser de l'énergie, celle-ci n'étant plus suffisante pour permettre la reprise du métabolisme.. Il serait intéressant de voir les résultats obtenus sur les générations suivantes vu le caractère héréditaire et la grande variation de la biométrie des cystes. Les techniques de croisement sélectif sont donc de bons outils afin de permettre le développement de souches qui produisent de "mini" cystes d'*Artemia* et qui seraient utilisés en addition pour nourrir les larves en culture.

Nous avons également étudié la fécondité (dimension et fréquence de ponte) d'*Artemia franciscana* de Great Salt Lake. Deux modes de reproduction existent chez *Artemia*: bisexuelle et parthénogénétique. Le mode de reproduction est contrôlé par les conditions environnementales tels le contenu ou la fluctuation en oxygène dissous, le type de nourriture mais aussi par l'histoire de la femelle. Les pontes ont lieu à des fréquences régulières variant de 4 à 6 jours. Les femelles émettent, par ponte, soit des nauplii, soit des cystes mais jamais les deux en même temps. Ce que nous pouvons avoir, ce sont des oeufs d'été émis en même temps que des nauplii. Ces oeufs d'été sont des embryons entourés par un très fin chorion, mais ceux-ci donneront naissance à des nauplii libres quelques heures après la ponte. Ils marquent la transition entre les deux types de reproduction. La dimension des pontes est de l'ordre de 34 nauplii pour la reproduction ovovivipare et de l'ordre de 23 cystes dans le cas de l'oviparité en conditions de laboratoire.

Enfin, nous avons montré que la fécondité des femelles (ou le nombre d'oeufs émis par les femelles cultivées dans de bonnes conditions et par ponte) est liée à la taille de celles-ci, les grandes femelles produisant plus d'oeufs que les petites. → *gk nauplii?*

A l'avenir, afin de compléter cette étude, il serait intéressant de continuer nos expériences de sélection par croisements sur plusieurs générations afin de s'assurer que nos expériences sont reproductibles. En rapport avec la non éclosion des cystes, il serait capital d'effectuer des dosages biochimiques des substances énergétiques, ainsi que l'analyse du chorion, la déshydratation étant anormalement longue.

→ pas d'altération  
de l'ov - labou  
→ nd  
ponte possible  
de l'ov  
l'autre?

## BIBLIOGRAPHIE.

## BIBLIOGRAPHIE.

ABREU-GROBOIS, F.A. et BEARDMORE, J.A., 1980. International study on *Artemia*. II. Genetic characterization of *Artemia* populations-an electrophoretic approach. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 113-116.

AMAT, F., 1979. Diferenciacion y distribucion de las poblaciones de *Artemia* (Crustaceo Branquiopodo) de España. Thèse. Université de Barcelone, 251 p.

AMAT, F., 1980. Diferenciacion y distribucion de las poblaciones de *Artemia* (Crustaceo, Branquiopodo) de España. I. Analises morfologico. Estudios alométricos referidos al crecimiento y a la forma. *Inv. Pesq.*, 44 (1), 217-240.

AMAT, F., 1985. Biologia de *Artemia*. *Inf. Técn. Inst. Pesq.*, 60 p.

BARIGOZZI, C., 1972. Problems of speciation in the genus *Artemia*. *Proc. 5th. European Marine Biology Symposium*. Ed. Battaglia, B., Piccin Editore, Padova, Italy, 348 p.

BARIGOZZI, C., 1974. *Artemia*: a survey of its significance in genetic problems. *Evolutionary Biology*, Vol.7. Eds Dobzhansky, T., Hecht, M.K., Steeve, W.C., Plenum Press, New-York, U.S.A., 314 p.

BARIGOZZI, C., 1980. Genus *Artemia*: problems of systematics. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 147-153.

BERTHÉLÉMY-OKAZAKI, N., HEDGECOCK, D., 1987. Effect of environmental factors on cyst formation in the brine shrimp *Artemia*. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 167-182.

BOWEN, S.T., DURKIN, J.P., STERLING, G. et CLARCK, L.S., 1978. *Artemia* hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations. *Biol. Bull.*, 155, p. 273-287.

BOWEN, S.T., DAVIS, M.L., FENSTER, S.R., LINDWALL, G.A., 1980. Sibling species of *Artemia*. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 55-167.

BROLUNE, R.;A, et MACDONALD, G. H. , 1982. Biogeography of the crine skrimp *Artemia* : distribution of parthenogenetic and sexual populations. *Journal of Biogeography*, 9 , p. 331-338.

BROWNE, R.A., 1980. Reproductive pattern mode in the brine shrimp. *Ecology*, 61 (3), p. 466-470.

BROWNE, R.A., 1988. Ecological and genetic of sexual and asexual brine shrimp (*Artemia*) from the mediterranean basin. *National Geographic Research*, 4 (4), p. 548-554.

BROWNE, R.A, et MACDONALD, G.H., 1982. Biogeography of the brine shrimp *Artemia* : distribution of parthenogenetic and sexual populations. *Journal of Biogeography*, 9, p. 331-338.

CLARCK, L.S. et BOWEN, S.T., 1976. The genetics of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. *J. Hered.*, 67 (6), p. 385-388.

CLEGG, J.S., 1974. Biochemical adaptations with the embryonic dormancy of *Artemia salina*. *Trans.Amer.Micro.Soc.*, 93 (4), p. 481-490.

CLEGG, J.S., CONTE, F.P., 1980. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 11-54.

COLE, G.A. et BROWN, R.J., 1967. Chemistry of *Artemia* habitats. *Ecology*, 48 (5), p. 858-861.

CONTE, F.P., DROUKAS, P.C. et EWING, R.D., 1977. Development of sodium regulation and de novo synthesis of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> activated ATPase in larval brine shrimp *Artemia salina*. *J. Exp. Zool.*, 202 (3), p. 339-361.

CROWE, J.H., 1971. Anhydrobiosis: an unsolved problem. *Amer.Nat.*, 105, p. 563-574.

CROWE, J.H. et COOPER, A. Jr., 1971. Cryptobiosis. *Sci. American*, 225 (6), p. 30-36.

D'AGOSTINO, A., 1965. Comparative studies of *Artemia salina* (development and physiology). Thesis, New-York University, 83p. University microfilms, 66-5653.

D'AGOSTINO, A., 1980. The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 55-82.

DANA, G.L. et LENZ, P.H., 1986. Effects of increasing salinity on an *Artemia* population from Mono Lake, California. *Oecologia*, 68, 428-436.

DOBBELIER, J., VERSICHELE, D., LAVINA, E. et BERNADINO, A., 1980. Culture of *Artemia* on rice bran: the conversion of waste product into highly nutritive animal protein. *Aquaculture*, 21, p. 393-396.

DUTRIEU, J., 1960. Quelques observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'*Artemia salina*. *Rend. Inst. Sci. Univ. Camerino*, 1, p. 196-224.

DWIVEDI, S.N., ANSARI, S.K.R. et AHMED, M.Q., 1980. Mass culture of brine shrimp under controlled conditions in cement pools in Bombay, India. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 175-183.

GEDDES, M.C., 1980. The brine shrimp *Artemia* and *Parartemia* in Australia. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 57-65.

GILCHRIST, B.Y., 1960. Growth and form of the brine shrimp *Artemia salina* (L.). *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 134 (2), p. 221-235.

GIRIN, M. et PERSON-LE-RUYET, J., 1977. L'élevage larvaire des poissons marins: chaînes alimentaires et aliments composés. 2nd. European Congress on Ichthyology, Paris, 20 p.

HALFER-CERVINI, A.M., PICCINELLI, M., PROSDOCIMI, T. et BARATELLI-ZAMBRUNI, L., 1968. Sibling species in *Artemia* evolution, 22, p. 373-381.

HEIP, J., MOENS, L. et KONDO, M., 1978. Effect of concentrations of salt and oxygen on the synthesis of extracellular hemoglobins during development of *Artemia salina*. *Devl.biol.*, 63, p. 247-251.

HINTON, H.E., 1968. Reversible suspension of metabolism and the origin of life. *Proc. R. Soc., Series B*, 171, p. 43-56.

LAVENS, P., TACKAERT, W. et SORGELOOS, P., 1986. International study on *Artemia*. *XLI*. The influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of *Artemia* cysts, produced in a standard culture system. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 31, p. 197-203.

LAVENS, P., SORGELOOS, P., 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 27-63.

LÉGER, P., BENGTON, D.A., SIMPSON, K.L. et SORGELOOS, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24, p. 521-623.

LENZ, P.H., 1980. Ecological studies on *Artemia*: a review. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 5-18.

MACDONALD, G., 1980. The use of *Artemia* cysts by the flamingo (*Phoenicopterus ruber roseus*) and the shellduck (*Tadorna tadorna*). In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O.A. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 97-104.

MARGALEF, R., 1974. *Ecologia*. Editorial Omega, Barcelona, 951 p.

NARCISO, L., 1982. Estudo e processamento dos cistos de *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) de Portugal. Relatório de estágio. INIP, Lisboa, 102 p.

NARCISO, L., 1987. A utilização dos cistos de *Artemia* sp. em aquacultura. Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica referidas no artº58, nº2a do Estatuto da Carreira Docente Universitária. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 80 p.

NARCISO, L., 1989. The potential use of *Artemia* sp.: an example of the danger of introduced species in aquaculture. *E.A.S. Spec. Publ.*, 10, p. 183-184.

PAULO, A.C., 1992. Efeito da temperatura e da salinidade na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de três populações de *Artemia* Leach, 1819. Relatório de estágio profissionalizante, Faculdade de Ciências de Lisboa, 101 p.

PERSOONE, G. et SORGELLOOS, P., 1980. General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O.A. et Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 3-24.

SCHREHARDT, A., 1987. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.1. Sorgeloos, P., Bengtson, W., Decler, W. et Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 5-32.

SORGELLOOS, P., 1973. First report on the triggering effect of light on the hatching mechanism of *Artemia salina* dry cysts. *Mar. Biol.*, 22, 7p. 5-76.

SORGELLOOS, P., 1979. Occurrence of *Artemia* in nature and its morphological development from nauplius to adult. In: *Fundamental and Applied Research on the Brine Shrimp Artemia salina (L.) in Belgium*. EMS Special publ. N°2. Jaspers, E. et Persoone, G (Eds). *Inst. Mar. Soc. Res.*, Bredene, Belgium, p. 1-7.

SORGELLOOS, P., 1980a. Life history on the brine shrimp *Artemia*: XIX-XXII. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 1-2.

SORGELLOOS, P., 1980b. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium., p. 25-46.

SORGELLOOS, P., PERSOONE, G., BAEZA-MESA, M., BOSSUYT, E. et BRUGGEMAN, E., 1978. The use of *Artemia* cysts in aquaculture: the concept of "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. Proc. 9th Ann. Meeting W.M.S. Ed. Avault, J.W., Louisiana State University, Baton Rouge, U.S.A., p. 715-721.

SORGELLOOS, P., LAVENS, P., LEGER, P., TACKAERT, W. et VERSICHELE, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. State University of Ghent, Faculty of Agriculture, 319 p.

TACKAERT, W., VANHAECKE, P. et SORGELOOS, P., 1987. Preliminary data on the heritability of some quantitative characteristics in *Artemia*. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.1. Sorgeloos, P., Bengtson, W., Decler, W. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 241-248.

URRICK, C. D. , 1972 . *Dunaliella-Artemia* plankton community of the Great Salt lake, Utah. Thesis Univ. Utah. Utah (USA), 449 p.

VANBALLAER E., VERSICHELE, D., VANHAECKE, P., Léger, P., BEN ABDELKADER, N., Turki, S. et SORGELOOS, P., 1987. Characterization of *Artemia* from different localities in Tunisia with regard to their use in local aquaculture. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.1. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 199-209.

VANHAECKE, P., COOREMAN, A. et SORGELOOS, P., 1981. International study on *Artemia*. XV. Effect of light intensity on hatching rate of *Artemia* cyst from different geographic origin. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 5, p. 111-114.

VANHAECKE, P., 1983. Vergelijkende studie van diverse geografische rassen van het pekelkreeftje *Artemia* ter verbetering van zijn gebruik in de aquakultuur. Ph. D. Thesis, State Univ., Ghent, Belgium, 420 p.

VANHAECKE, P. et SORGELOOS, P., 1980. International study on *Artemia*. XIV. Growth and survival of *Artemia* larvae of different geographical origin in a standard culture test. *Mar. Ecol., Prog. Ser.*, 3, p. 303-307.

VANHAECKE, P. et SORGELOOS, P., 1982. International study on *Artemia*. XIX. Hatching data on ten commercial sources of brine shrimp cysts and re-evaluation of the "hatching efficiency" concept. *Aquaculture*, 30 (1/4), 43-52.

VANHAECKE, P., TACKAERT, W., SORGELOOS, P., 1987. The biogeography of *Artemia*: an updated review. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.1: Morphology, Genetics, Strain Characterization. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p.129-155.

VERSICHELE, D. et SORGELOOS, P., 1980. Controlled production of *Artemia* cysts in batch culture. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium., p. 231-246.

VIEIRA, M.N. et TELES, A.O., 1984. First contribution to the characterization of *Artemia* sp. from Aveiro salt ponds. *Publ. Inst. Zool. Dr. Augusto Nobre*, 186, 5 p.

VIEIRA, M.N., 1989. Contribuição para o conhecimento da biologia de *Artemia* sp. proveniente das salinas de Aveiro. Sua importância daquele ecossistema. Thèse, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 324 p.

VILELA, M.H., BRANCO, M.A.C., 1987. Characterization of portuguese *Artemia* strains. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol.1. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 211-217.

VOS, J. et DE LA ROSA, N., 1980. Manual on *Artemia* production in salt ponds in the Philippines. FAO/UNDP-BFAR Brackishwater Aquaculture Demonstration and training Project Manual PHI/75/005/WP6, Quezon City, 48 p.

YANENG, C., 1987. Observations on parthenogenetic and bisexual brine shrimp from People's Republic of China: 227-232 In: *Artemia Research and its Applications*. Vol. 1. P. Sorgeloos, P., Bengtson, W., Decler, W. et Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium, 380 p.

WATANABE, T., ARAKAWA T., KITAJIMA, C., FUKUSHO, K. et FUJITA, S., 1978. Nutritional quality of living feed from the view-point of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 44, 11, 1123-1227.

WHEELER, R., JUDIN, A.I. et CLARCK, W.H. Jr., 1979. Hatching events in the cysts of *Artemia salina*. *Aquaculture*, 18, p. 59-67.

WIRICK, C.D., 1972. *Dunaliella-Artemia* plankton community of the Great Salt Lake. Utah. Thesis Univ. Utah. Utah (USA), 44 p.

WOLFE, A.F., 1980. A light and electron microscopic study of the frontal knobs of *Artemia* (Crustacea, Branchipoda). In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. et Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 117-130.

## Liste des figures.

Fig.1.1. Représentation mondiale d'*Artemia* sp. (d'après VANHAECKE et al., 1987).

Fig.1.2. Distribution d'*Artemia* sp. au Portugal (d'après VILELA et BRANCO, 1987).

Fig.1.3. Distribution d'*Artemia* sp. sur la péninsule ibérique (d'après VIEIRA, 1989).

Fig.1.4. Schéma de l'évolution de la reproduction sexuée chez *Artemia* (modifié, d'après AMAT, 1985).

Fig.1.5. Figure montrant les différents états d'arrêt métabolique (d'après LAVENS et SORGELOOS, 1987).

Fig.1.6. Morphologie de l'ovisac chez différentes souches (bisexuelle de San Francisco Bay et parthénogénétiques d'Espagne) (d'après DOMENECH, 1980).

Fig.1.7. Diagramme du système reproducteur femelle adulte (d'après LOCHHEAD, in CLEGG et CONTE, 1980).

Fig.1.8. Diagramme du système reproducteur mâle adulte (d'après WOLFE, 1971, in CLEGG et CONTE, 1980).

Fig.1.9. Figure représentant la tête du mâle et montrant la position des protubérances frontales ("frontal knob"=FK) sur le protopodite (PR) (d'après WOLFE, 1980).

Fig.1.10. Micrographie électronique d'une protubérance frontale montrant l'arrangement et la distribution des épines (SP) et soies sensorielles (SS). Grossissement: x1100 (d'après WOLFE, 1980).

Fig.1.11. Diagramme des épines (SP) et soies sensorielles sur la protubérance frontale. La soie sensorielle consiste en une cellule de soutien (SC), une cellule "setal" (ST) et un neurone sensoriel (SN). Ces soies sensorielles sont entourées par l'hypoderme (HP) (d'après WOLFE, 1980).

Fig.1.12. Photo représentant le mâle et la femelle en position de pré-copulation ("riding position") (d'après SORGELOOS, 1980).

Fig.1.13. Représentation des cystes déshydratés (d'après VOS et DE LA ROSA, 1980).

Fig.1.14. Diagramme représentant la structure de la paroi des cystes (d'après MORRIS et AFZELIUS, 1967, ANDERSON et *al.*, 1970, in CLEGG et CONTE, 1980).

Légende: **om:** membrane externe; **cl:** couche corticale; **al:** couche alvéolaire; **ocm:** membrane cuticulaire externe; **fl:** couche fibreuse; **icm:** membrane cuticulaire interne; **scs:** espace sous-cuticulaire.

Les nombres entre [ ] représentent l'épaisseur approximative en  $\mu\text{m}$ .

Fig.1.15. Pourcentage des femelles d'*Artemia* ovipares en fonction de la séquence de ponte (d'après BERTHÉLÉMY et OKAZAKI, 1987).

Fig.1.16. Pourcentage des femelles d'*Artemia* ovipares en fonction de l'âge où elles atteignent leur maturité sexuelle (d'après BERTHÉLÉMY et OKAZAKI, 1987).

Fig.1.17. Figure représentant les processus de synthèse du trehalose et du glycérol (d'après NARCISO, 1987).

Fig.1.18. Schéma des différents stades de développement de la gastrula sous forme de cyste à l'état de nauplius au stade I (d'après CLEGG et CONTE, 1980).

Légende: **G:** gastrula; **PED:** développement à l'état de pré-émergence; **hatching:** éclosion; **N-I:** nauplius au stade I.

Fig.1.19. Morphologie des premiers stades larvaires d'*Artemia* sp. (modifié, d'après ANDERSON, 1987, in NARCISO, 1987).

a-stade I  
b-stade II (métanauplius I)  
c-stade III (métanauplius II).

Légende: **1:** antennules; **2:** antennes; **3:** épine gnatobasale; **4:** mandibule; **5:** labrum; **6:** somites.

Fig.1.20. Représentations schématiques du mâle (a) et de la femelle (b) adultes d'*Artemia* sp.

Légende: **NE:** oeil du naupliaire, **LE:** oeil composé, **ANL:** antennules, **ANN:** antennes, **UT:** utérus, **T:** thoracopodes, **OV:** segments abdominaux, **F:** fourche caudale.

Fig.2.1. Photo d'un couple d'*Artemia* en position de pré-copulation (d'après SORGELOOS, 1980).

Légende: o: utérus; p: pénis.

Fig.2.2. Schéma représentant les différentes étapes expérimentales.

Fig.2.3. Exemples de différences morphologiques concernant la forme de l'ovisac (a), la forme des antennes (b), la forme de la fourche (c) chez différentes souches d'*Artemia* sp. (d'après DOMENECH, 1980)

Fig.2.4. Morphologie des premiers stades larvaires d'*Artemia* sp. (d'après NARCISO, 1987)

Légende: A-Stade I; B-stade II; C-stade III.

1: antennules; 2: antennes; 3: épine gnatobasale; 4: mandibule; 5: labrum; 6: somites.

Fig.2.5. Représentations schématiques d'une femelle (d'après DOMENECH, 1980) et d'un mâle d'*Artemia* montrant les différentes mesures effectuées.

Légende: A: longueur totale de la femelle; B: largeur maximale du sac ovigère; C: longueur totale du mâle; D: distance entre les yeux; E: distance entre les protubérances frontales; F: longueur de la pince.

Fig.3.1. Histogrammes des fréquences relatives des diamètres des cystes pour différentes populations:

a) *Artemia parthenogenetica* - Alcochete, Portugal.

b) *A. franciscana* - Castro Marim, Portugal.

c) *A. franciscana* - Great Salt Lake, Etats-Unis.

Fig.3.2. Superposition des histogrammes de fréquence relative des diamètres des cystes géniteurs et des cystes F2.

Fig.3.3. Graphe représentant la taille des nauplii fraîchement éclos en fonction du diamètre des cystes décapsulés.

Fig.3.4. Graphe représentant le nombre d'oeufs en fonction de la classe de taille des femelles d'*Artemia franciscana* (Great Salt Lake, Etats-Unis).

Classes de taille: 1: 6,6-7,9 mm;  
2: 8,1-8,9 mm;  
3: 9,2-9,8 mm;  
4: 10-11 mm;  
5: 11,1-11,9 mm;  
6: 12,1-12,7 mm.

Fig.3.5. Graphiques de corrélation des différentes mesures effectuées:

- a) longueur totale de la femelle/ longueur totale du mâle,
- b) largeur de la pince du mâle/ longueur totale de la femelle,
- c) largeur de l'utérus/ longueur de la pince du mâle,
- d) distance entre les yeux du mâle/ largeur de l'utérus.

## Liste des tableaux.

Tab.1.1. Systématique du genre *Artemia* (d'après BARIGOZZI, 1980).

Tab.1.2. Pourcentages d'oviparité observés chez les femelles d'*Artemia* ayant atteint leur maturité sous 7 conditions différentes de salinité (d'après BERTH et OKAZAKI, 1987).

Tab.2.1. Liste de quelques sources nutritives vivantes et inertes utilisées pour assurer la croissance d'*Artemia* sp. (d'après DOBBELEIR et al., 1980).

Tab.2.2. Composition du milieu de Walne (modifié).

Tab.2.3. Composition du milieu de Miquel (modifié).

Tab.2.4. Références sur les différentes espèces et populations étudiées.

Tab.3.1. Tableau récapitulatif des résultats du test t de Student effectué pour la comparaison de différents groupes.

Légende: groupe 1: cystes obtenus en F2 provenant des croisements successifs effectués à partir des "petits" cystes géniteurs;  
groupe 2: cystes obtenus en F2 provenant des croisements successifs effectués à partir des "grands" cystes géniteurs;  
groupe 3: cystes géniteurs.

Tab.3.2. Résultat du test de l'analyse de la variance (ANOVA 1) effectué pour connaître l'effet du facteur ponte.

Tab.3.3. Statistiques descriptives concernant les mesures des diamètres des cystes (a) et des cystes décapsulés (b) pour divers échantillons.

Légende: GSL: Great Salt Lake,  
CM: Castro Marim,  
Al: Alcochete,  
Tt: Tientsin,  
CYS: Chai Yaneng, Shandong.

Tab.3.4. Résultat du test de l'analyse de la variance (ANOVA 1) effectué pour étudier la variabilité interpopulationnelle.

Tab.3.5. Tableau récapitulatif donnant les résultats du test de Scheffé effectué à la fois pour les cystes et les cystes décapsulés.

**Tab.3.6.** Tableau donnant l'épaisseur du chorion calculée pour divers échantillons.

**Tab.3.7.** Tableau récapitulatif présentant le diamètre moyen des cystes et des cystes décapsulés, l'épaisseur du chorion et la longueur totale des nauplii fraîchement éclos pour différentes populations.

**Annexe 1.** Données des fréquences absolue et relative du diamètre des cystes pour différentes populations:

- a) *A. parthenogenetica* - Alcochete, Portugal;  
 b) *A. franciscana* - Castro Marim, Portugal;  
 c) *A. franciscana* - Great Salt Lake, Etats-Unis.

**a**

Diamètre (µm)	Fréq. absolue	Fréq. rel. (%)
210	9	1,8
220	100	20
230	195	39
240	96	19,2
250	48	9,6
270	28	5,6
280	21	4,2
290	3	0,6

**b**

Diamètre (µm)	Fréq. absolue	Fréq. rel. (%)
210	4	0,8
220	38	7,6
230	98	19,6
240	181	36,2
250	143	28,6
270	31	6,2
280	5	1

**c**

Diamètre (µm)	Fréq. absolue	Fréq. rel. (%)
200	4	0,8
210	5	1
220	40	8
230	102	20,4
240	136	27,2
250	126	25,2
270	70	14
280	15	3
290	1	0,2
300	1	0,2

**Annexe 2.** Tableau récapitulatif (moyenne, variance, déviation standard, coefficient de variation et fréquence) des mesures du diamètre des cystes obtenus par ponte.

Numéro de ponte	moyenne	dev. std.	variance	coef.var.	fréquence
1	226,1	5,02	25,16	2,22	18
2	228,4	3,75	14,04	1,64	19
3	237,5	5,5	30,26	2,32	20
4	233	4,7	22,11	2,02	20
5	216,2	6,6	43,55	3,05	32
6	206,1	6,56	43,08	3,18	23
7	231,7	11,69	136,67	5,05	6
8	202,4	5,83	34,03	2,88	66
9	203,9	6,08	36,93	2,98	18
10	194,2	5,15	26,52	2,65	12
11	220,2	3,66	13,43	1,66	53
12	221	5,68	32,22	2,57	10
13	198,3	4,61	21,26	2,33	30
14	211,1	4,31	18,62	2,04	26
15	211,6	6,88	47,31	3,25	31
16	228,3	7,53	56,67	3,3	6

Annexe 3. Tableaux des suivis journaliers des couples.

a) Suivi journalier des couples géniteurs provenant des "petits" cystes géniteurs.

Couple	Mai 92													
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	RP	/	/	/		83 N	/	/	/	2 N	/	/	†F	
2						RP	/	/	/	145 N	/	/	/	/
3											RP	/	/	RP
4													RP	/
5													RP	RP
6													RP	/
7														
8														
9														
10														
11												RP	RP	RP

b) Suivi journalier des couples géniteurs provenant des "grands" cystes géniteurs.

Couple	Mai 92													
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	RP	/	/	/	95 N	/	/	/	†F					
2	RP	/	/	/	/	/	/	/	†F					
3	RP	/	/	/	63 N	/	/	/	†F	†M				
4						RP	RP	RP	/	RP	RP	RP	RP-31 N	RP
5							RP	RP	/	RP	RP	RP	RP-5 N	/
6							RP	/	/	/	34 N	35 N	/	/
7								RP	/	/	RP	RP-60 N	/	/
8									RP	/	RP	RP-83 N	/	/
9											RP	/	RP	/
10										RP	/	/	/	/

a)

20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
/	/	/	/		/	/	/	/		
/	RP-61 N	RP	RP		† F					
/	RP-36 N	73 N	/		/	RP-29 N	/	/		
RP	31 N	RP-11 N	3 N+OE		/	16 N	/	/		
/	/	RP	RP		/	/	/	/		
RP	/	/	OE		N	/	/	/		
RP	RP	RP	46 N		/	RP-72 N	RP	RP		
		RP	/		RP	RP-N	/	/		
			RP		RP	RP-131 N	/	RP		
RP-34N	RP-25N	/	RP		RP-39N	8 N	/	† M		

b)

20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
RP	RP	RP	RP		RP	/	/	/		
/	/	RP	/		RP	/	RP-9 N	/		
/	/	/	/		/	/	/	/		
/	RP	RP-19 N	RP		/	/	/	/		
/	120 N	/	/		/	RP	/	/		
/	/	43 N	1 N		/	/	/	/		
/	/	2 N	1 N		/	/	/	/		



