

DETECTION DES FEMELLES DE SALMONIDES EN VITELLOGENESE

1) description de la méthode et mise en œuvre pratique

LE BAIL P.Y., MAISSE G., BRETON B.

Laboratoire de Physiologie des Poissons,
I.N.R.A. Campus de Beaulieu, 35042 RENNES CEDEX

RESUME

La détection des femelles de Salmonidés en vitellogénèse par séro-diagnostic est décrite. Le test utilisé repose sur la mise en évidence de la vitellogénine plasmatique caractéristique des femelles en gamétogénèse active.

Son utilisation pratique est simple, rapide et sans risque pour les poissons. Cette technique de terrain permet, entre autres, d'estimer le potentiel reproducteur des populations naturelles et de gérer en pisciculture les stocks de géniteurs.

SUMMARY

A serological method for determination of vitellogenic Salmonid females is described. The test uses the detection of plasmatic vitellogenine which is characteristic of female in active gametogenesis.

The use is easy, rapid and without damage for fishes. This field technic allows the determination of populations reproductive potential and the management of brood-stocks in fish farming.

INTRODUCTION

La préservation, voire l'augmentation de la production des stocks de Salmonidés présents dans nos rivières, implique la mise en place d'une politique de gestion qui tienne compte, pour l'unité que constitue un bassin versant, des différents facteurs susceptibles d'influencer les niveaux de peuplement. L'impact de ces facteurs est révélé grâce aux études de dynamique de population. Les aspects abordés jusqu'à présent concernent essentiellement la structure d'âge, la croissance et l'abondance des espèces en fonction du milieu. Les résultats obtenus proviennent d'inventaires piscicoles par pêche électrique au cours desquels mensurations, marquage et prélèvement d'écaillés ont été pratiqués.

Par contre, la méconnaissance du sex ratio des géniteurs rend plus difficile l'estimation du potentiel reproducteur (nombre d'œufs susceptibles d'être déposés dans le milieu). Les caractères sexuels secondaires affectant la morphologie n'apparaissent que tardivement et ne sont pas toujours suffisamment marqués, en particulier chez les animaux de première reproduction (LE BAIL, 1978). La détermination des sexes chez les Salmonidés maintenus vivants n'est donc possible que lors de la période de reproduction (LIBOSVARSKY, 1967; EUZENAT et FOURNEL, 1976). En dehors de cette période, le sexage nécessite le sacrifice ou l'autopsie des animaux (McFADDEN et al., 1962; TAUBE, 1976; BAGLI-NIERE et al., 1979; PROUZET et al., 1979).

Il fallait donc mettre au point une technique de terrain qui permette de détecter précocement les futures femelles reproductrices sans attenter au potentiel reproducteur de la rivière. Le présent article décrit le principe de cette méthode (LE BAIL et BRETON, 1981) et les conditions de son utilisation pratique.

BREF RAPPEL CONCERNANT LA VITELLOGENESE

Le jeune poisson peut rester impubère durant plusieurs années. Les femelles en devenant pubères (sous l'influence de mécanismes de régulation hormonale, l'appareil reproducteur devient fonctionnel) entament leur vitellogénèse. L'étude du contrôle endocrinien de la vitellogénèse (figure 1) a montré que les œstrogènes sécrétés par l'ovaire stimulent la synthèse par le foie d'une protéine, (la vitellogénine), qui, transportée par le sang jusqu'à l'ovaire, est à l'origine des constituants des ovocytes, réserves nutritives indispensables au développement de l'embryon.

Le test de « sexage » que nous allons décrire consiste à mettre en évidence l'absence ou la présence de vitellogénine sérique, caractéristique d'une femelle en vitellogénèse.

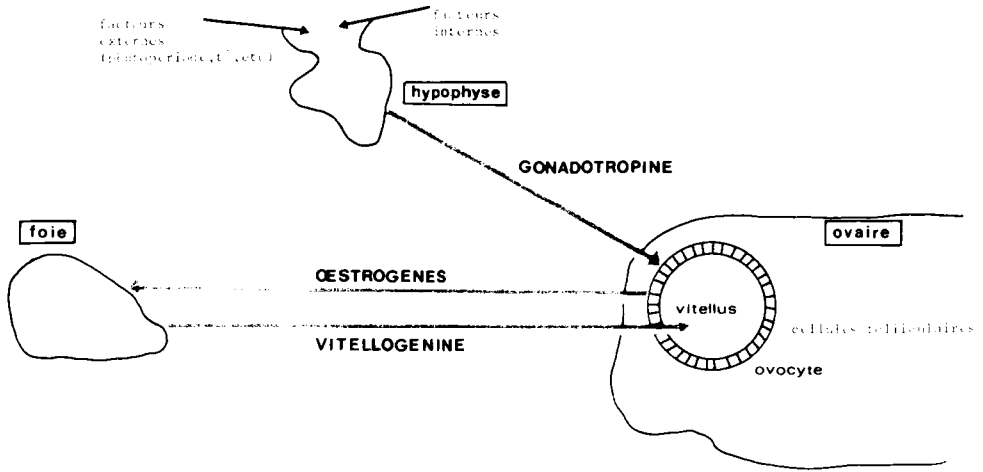
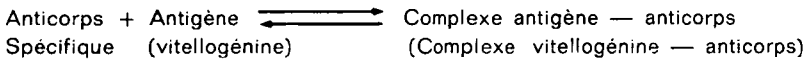


Figure 1 : SCHEMA DU CONTROLE ENDOCRINIEN DE LA VITELLOGENESE

PRINCIPE DU TEST DE SEXAGE

Le principe du test de sexage repose sur une réaction d'immunoagglutination schématisée ci-dessous :



L'anticorps dirigé spécifiquement contre la vitellogénine (l'anticorps reconnaît de manière très précise la vitellogénine contre laquelle il a été fabriqué), est fixé sur un support inerte, d'une taille relative très importante (ici des billes de latex) qui a pour but de visualiser le complexe vitellogénine — anticorps (figure 2b).

Bien que la réaction ait toujours lieu quel que soit le rapport des concentrations de la vitellogénine et de l'anticorps, sa visualisation n'est possible que pour une plage réduite des rapports de concentration appelée « zone d'équivalence ». En effet, cette visualisation correspond à une précipitation (ou agglutination) du complexe vitellogénine - anticorps (et des billes de latex) elle-même dépendante de la densité des ponts formés par les molécules de vitellogénine entre les anticorps (figure 2e).

Si l'un des deux réactifs est en excès (figure 2c et d), il y a saturation des sites de liaisons.

Ce phénomène est très important d'un point de vue pratique. En effet les taux de vitellogénine circulante vont augmenter considérablement entre le début de la vitellogénèse et la période de reproduction. Les différents types de réactions rencontrés au cours de la saison sont résumés dans la figure 3 et dans le tableau 1.

Quantité de vitellogénine dans le sang	Réponse du test			Interprétation	addition de serum positif	Réponse du test			Interprétation
	observations	precipitation	reponse			observations	precipitation	reponse	
En excès	○	NON	—	-	OUI	○	NON	—	♀ pubère
Optimale	⊙	OUI	+	♀ pubère	NON				
Indetectable	○	NON	—	-	OUI	⊙	OUI	+	♂ ou impubère

Tableau 1 : Principaux types de réponses du test de sexage en fonction du taux de vitellogénine sanguine et leur interprétation.

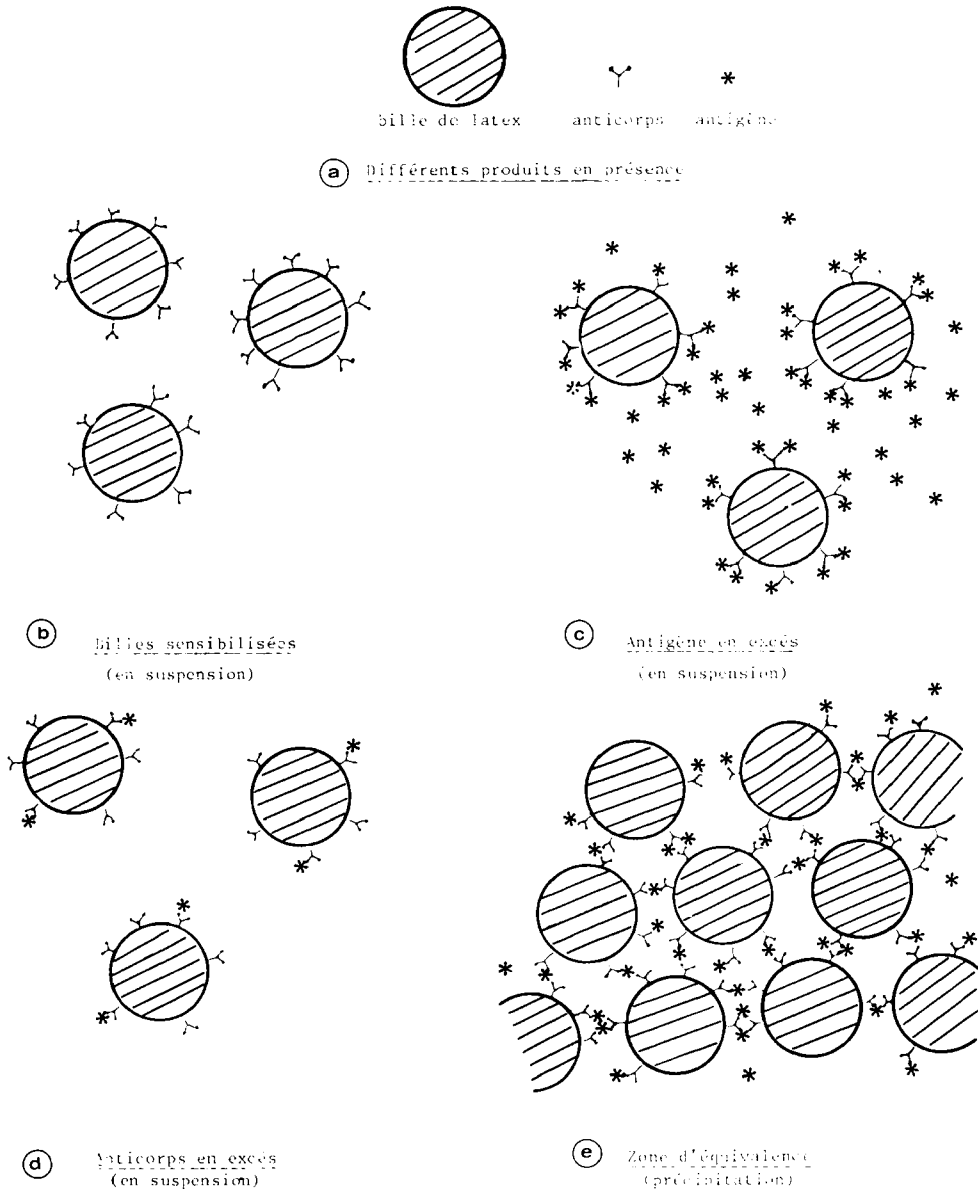


Figure 2 : SCHEMATISATION DE L'ETAT D'AGGLUTINATION

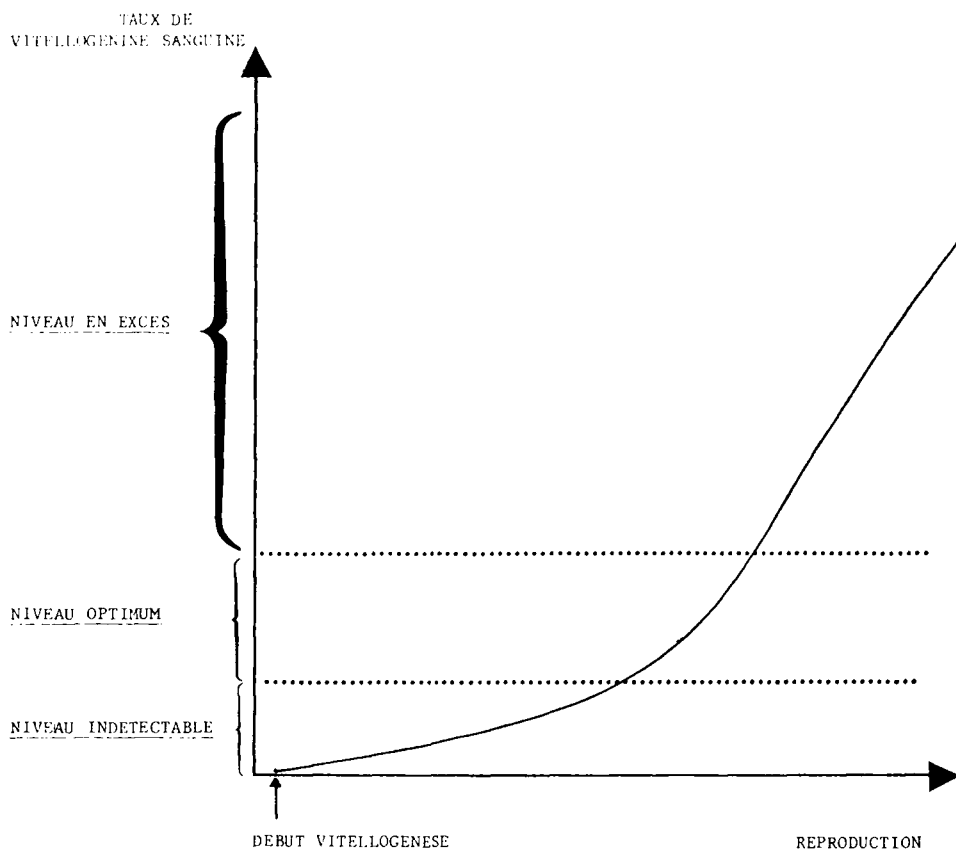


FIGURE N° 3 : SCHEMA DU TAUX DE VITELLOGENINE PLASMATIQUE AU COURS DU TEMPS CHEZ LES SALMONIDES.
(SCHEMA THEORIQUE OBTENU APRES SYNTHESE DES DONNEES DE LA LITTERATURE.)

PREPARATION DES REACTIFS

● Obtention des billes sensibilisées :

La démarche suivie pour obtenir des billes de latex sensibilisées avec l'anticorps anti-vitellogénine est résumée dans la figure 4. Le détail de ces différentes étapes est développé par ailleurs (LE BAIL et BRETON, 1981).

Il est important de signaler que la pureté de la vitellogénine doit être maximale afin d'éliminer tout risque de contamination par d'autres éléments plasmatiques communs aux deux sexes. En cas de contamination, les anticorps obtenus ne seraient pas spécifiques et le test perdrait toute signification.

L'adjonction d'héparine (300 U/ml) à la solution de billes de latex sensibilisées permet de pratiquer le test à partir de sang complet immédiatement après la saignée.

UTILISATION PRATIQUE

La préparation des réactifs ne peut être effectuée que dans un laboratoire spécialisé. En revanche, l'utilisation du test de « sexage » reste de pratique très simple.

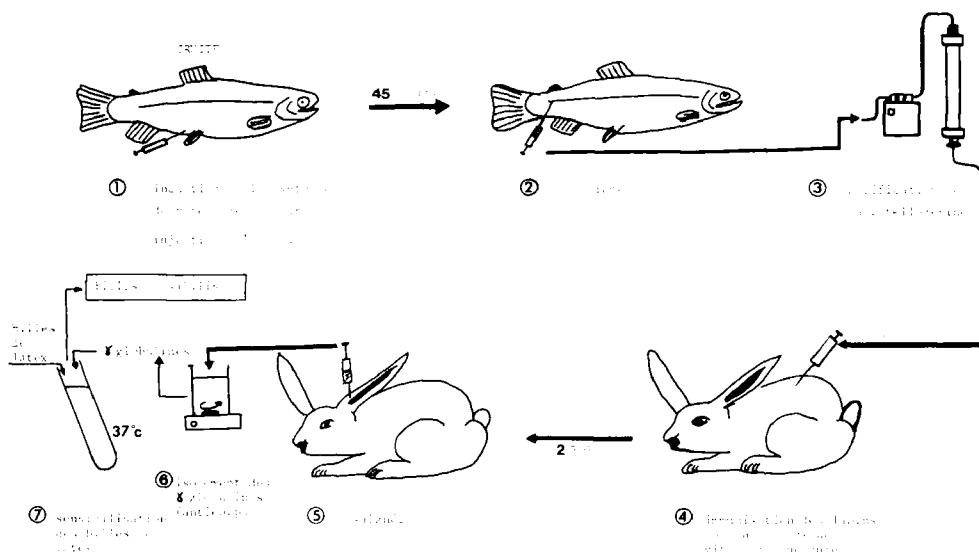


FIGURE 1. — DÉTERMINATION DE LA VITELLOGÉNINE
DANS LE SANG DE TRUITE.

● **Conservation des réactifs :**

On aura recours à la congélation (à -20 °C) quand les temps de conservation seront supérieurs à une quinzaine de jours. Une fois décongelées, les billes sensibilisées (le réactif le plus fragile) peuvent être gardées à 4 °C durant une semaine. Lors de leur utilisation sur le terrain il convient d'éviter toute élévation de température supérieure à 20 °C.

● **Spécificité du test :**

L'anticorps obtenu à partir de la vitellogénine de Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) s'est révélé être actif contre la vitellogénine d'autres Salmonidés, ce qui permet de les sexer (tableau 2). Son activité décroît contre la vitellogénine de Brochet (*Esox lucius*) qui est un salmoniforme, et pour d'autres familles, il conviendra de mettre au point un test plus spécifique à partir d'espèces correspondantes.

● **Période d'utilisation :**

Les renseignements concernant la période durant laquelle les femelles sont en vitellogénèse sont très fragmentaires. Elle est susceptible de varier en fonction de plusieurs facteurs :

- espèce : le tableau 2 en donne un exemple,
- souche,
- nombre de reproductions antérieures,
- facteurs externes variables d'une année à l'autre (température, nutrition),
- etc...

Il faut de plus noter que toutes les femelles pubères d'une même cohorte n'entrent pas en vitellogénèse au même moment et qu'une certaine latence (1 à 2 mois) peut exister durant laquelle le test de « sexage » ne détecte pas toutes les femelles qui se reproduiront dans l'année.

● **Prise de sang :**

La prise de sang est effectuée grâce à des seringues à insuline préalablement rincées à l'éparine 100 U/ml). La taille des aiguilles varie avec la taille de l'animal.

exemple :	taille des animaux	aiguille	
		longueur	diamètre
	10 à 30 cm	25 mm	0,50 mm
	> 30 cm	38 mm	0,80 mm

Il existe différentes techniques de prise de sang. Nous recommandons ici celle effectuée au niveau du pédoncule caudal à cause de sa simplicité et de sa rapidité. L'animal est préalablement anesthésié (phénoxy-éthanol 3 ml/10 l) (BELL, 1967).

Tableau 2 : Période à laquelle la vitellogénine circulante était présente chez toutes les femelles reproductrices de différentes espèces. La détection est faite à partir d'un anticorps anti-vitellogénine de Truite arc-en-ciel.

	ESPECE	ORIGINE	Présence de vitellogénine chez toutes les femelles reproductrices	
			données sur un cycle	données fragmentaires
Truite fario	<i>Salmo trutta</i>	pisciculture	Mai — reproduction	Août — reproduction
Truite de mer	<i>Salmo trutta</i>	sauvage — remontée en eau douce		début Juin
Truite arc-en-ciel	<i>Salmo gairdneri</i>	pisciculture		durant toute l'ouverture de la pêche sportive (Mars - Juin)
Saumon atlantique	<i>Salmo salar</i>	pêche à la ligne en rivière		mi-Juillet
Saumon atlantique	<i>Salmo salar</i>	élevé en mer		
Saumon coho	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	élevé en mer puis en eau douce	début Septembre — reproduction	

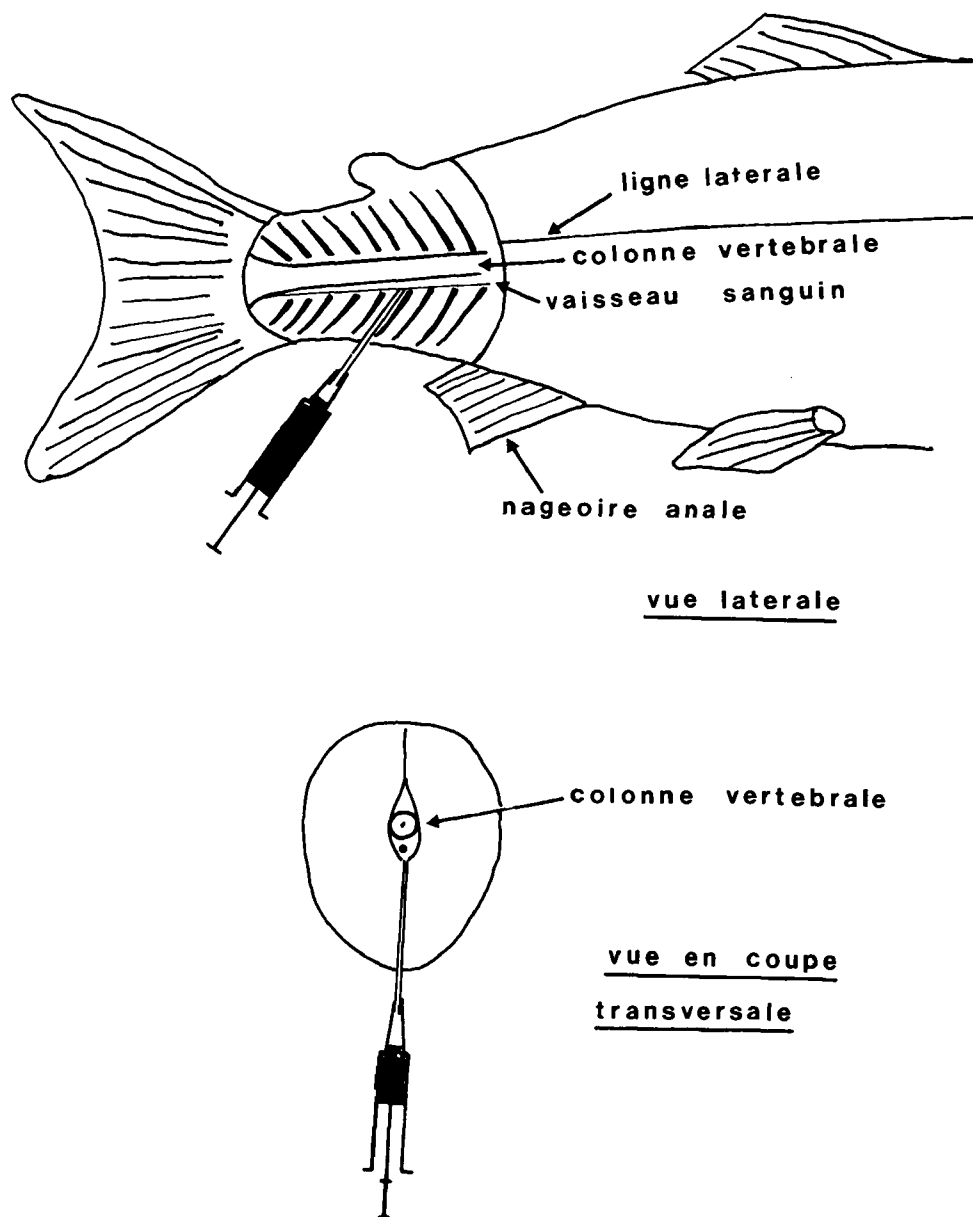


Figure 5 : SCHEMA MONTRANT LA POSITION DE L'AIGUILLE
LORS DE LA PRISE DE SANG

L'aiguille est introduite en arriere de la nageoire anale, dans le plan de symetrie de l'animal et en faisant un angle d'environ 60° avec la ligne laterale au contact de la colonne vertebrale (figure 5), et perfore ainsi les vaisseaux sanguins dorsaux. Aspirer une cinquantaine de microlitres, ce qui correspond au debut de l'apparition du sang dans la seringue. Les seringues sont reutilisables apres plusieurs rinçages à l'eau distillée.

Le volume sanguin d'un poisson represente en moyenne 3 à 4% du poids total. Pour un poisson de 100 g, les 50 μ l du prelevement necessaire au sexage representent environ 1% du volume total du sang (4 ml).

Tableau 3 : Poids et effectifs d'un lot de Truite fario 1⁺ ayant subi un prélèvement de 200 microlitres de sang.

	T = 0 JOUR		T = 30 JOURS	
	poids moyen en grammes	nombre	poids moyen en grammes	nombre
Lot témoin	77 ± 20	100	100,5 ± 44	94
Lot prélevé (200 µl)		100	98,6 ± 33	91

Aucune différence significative avec le lot témoin n'a pu être mise en évidence.

Le tableau n° 3 montre que la prise de sang d'environ 6 % du volume sanguin total n'affecte pas de manière significative la survie et la croissance des animaux prélevés. Le volume sanguin nécessaire au test de « sexage » est au moins quatre fois inférieur et ne présente donc pas de danger pour l'animal.

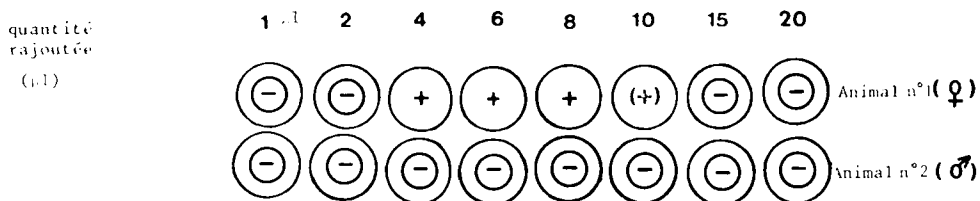
● **Détermination du volume sanguin à tester :**

La quantité de vitellogénine circulante est susceptible de varier en fonction de différents facteurs. Il est donc important, avant de sexer une série de poissons (une même cohorte), de déterminer les volumes de sang optimum à tester.

Pour cela, on prélève le sang de 5 ou 6 animaux (la probabilité de trouver une femelle est très grande). Pour chaque animal, on effectue une succession de tests avec des quantités croissantes de sang (1, 2, 4, 6, 8, 10... microlitres). On détermine ainsi le volume optimal à tester pour obtenir une réponse rapide et sans ambiguïté (figure 6). Ce volume (X) sera ensuite utilisé pour tous les animaux du même lot.

● **Mesure des faibles volumes :**

Les très faibles volumes nécessaires au test (20 microlitres de billes sensibilisées, X microlitres de sang, ou Y microlitres de sérum positif) sont mesurés à l'aide de micropipettes réglables vendues dans le commerce. Pour éviter tous risques de contamination, il est nécessaire de changer les cônes des micropipettes entre chaque animal. Ces cônes sont réutilisables après lavage à l'eau distillée.



Dans le cas présent on choisira 6 µl comme volume optimal.

FIGURE 6 : PROTOCOLE DE DETERMINATION DU VOLUME SANGUIN A TESTER.

- + réaction positive
- (+) réaction faible
- réaction négative

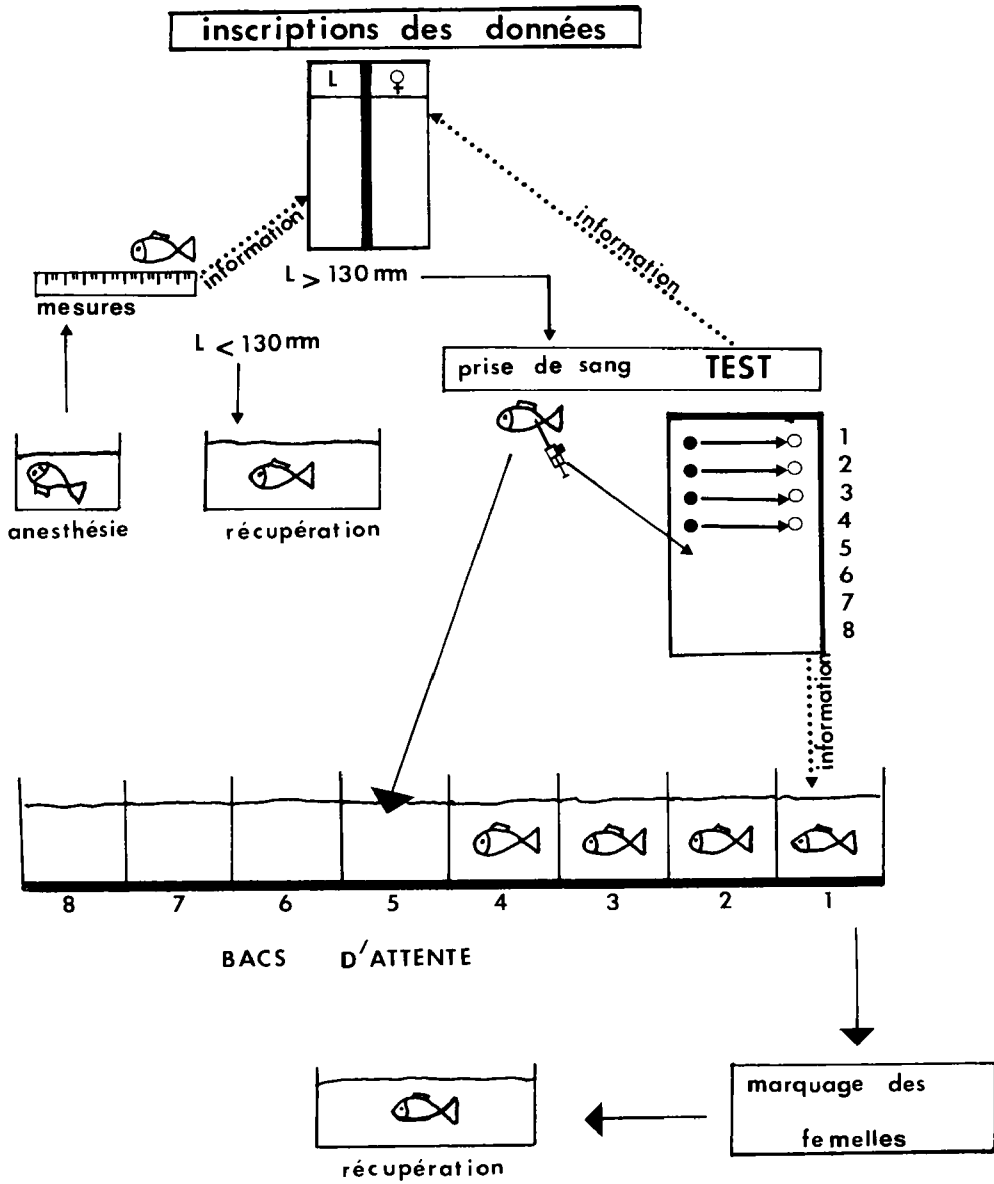


Figure 7 : SCHEMA DE L'ORGANISATION DES OPERATIONS DE "SEXAGE" SUR LE TERRAIN.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La détection des femelles de Salmonidés en vitellogénèse, à l'aide d'un test de séroagglutination mettant en évidence la présence caractéristique de vitellogénine, est d'un emploi facile sur le terrain. Cette technique donne des réponses rapides et ne présente pas de gros dangers de mortalités pour le poisson. Elle s'intègre dans un ensemble de manipulations (mesure, pesée, prélèvement d'écaillés, marquage...) qui, si elles ne sont pas effectuées avec un maximum de précautions peuvent affaiblir dangereusement l'animal. La mauvaise utilisation des anesthésiques est la plupart du temps responsable des mortalités.

Ce test ne permet pas de différencier les mâles pubères des animaux impubères. Cette restriction est cependant minime à côté de la possibilité de connaître le potentiel reproducteur du stock par la caractérisation des femelles. Pour obtenir des résultats fiables, il est indispensable d'éviter les contaminations d'un sang par un autre.

La rapidité d'exécution dépend de la capacité d'organisation des opérateurs. A titre indicatif, une organisation voisine de celle proposée dans la figure 7 nous a permis à deux personnes de tester 40 Truites par heure (moyenne sur 20 H) en pisciculture en tenant compte de la pêche dans les bassins. Lors d'inventaires piscicoles par pêche électrique, nous conseillons d'affecter au moins deux opérateurs pour le « sexage » et le marquage.

Cette technique permet une meilleure connaissance des peuplements de géniteurs de Salmonidés dans le milieu naturel. Elle peut être pratiquée lors d'inventaires par pêche électrique, au niveau d'une station de contrôle des migrations (Saumon atlantique, Truite de mer) et sur des animaux capturés par pêche à la ligne sans ouvrir le poisson.

En pisciculture elle peut permettre une meilleure gestion du cheptel de géniteurs.

Le coût, actuellement difficile à estimer, est de l'ordre de celui d'un certain nombre de marquages (Carlin, Floy-tag).

**

Travaux effectués dans le cadre de la Convention de Recherches « Qualité de la Vie n° 65/1327, et le C.N.E.X.O. n° 77/1619 ».

BIBLIOGRAPHIE

- BAGLINIERE J.L., CHAMPIGNEULLE A., NIHOARN A., 1979. La fraie du Saumon atlantique (*S. salar*) et de la Truite commune (*S. trutta*) sur le bassin du Scorff. Cybium 3^e série, (7), 75-96.
- BELL G.R., 1967. A guide to the properties characteristics and uses of some general anaesthetics for fish. Bull Fish Res. Bd. Can., 148. 5 p.
- EUZENAT G., FOURNEL F., 1976. Recherches sur la Truite commune (*S. trutta*) dans une rivière de Bretagne, le Scorff. Thèse 3^e Cycle Biol. anim. Fac. Sci. Univ. RENNES, 213 p.
- LE BAIL P.Y., 1978. Le sexage chez les Salmonidés — Techniques. D.A.A. Halieutique, E.N.S.A. RENNES, 34 p.
- LE BAIL P.Y., BRETON B., 1981. Rapid determination of the sex of pubescent salmonid fish by a technique of immunoagglutination. Aquaculture, 22, 367-375.
- LIBOSVARSKY J., 1967. The spawning run of brown trout, *S. trutta*, and its analysis. Zool. Listy. 16, (1), 73-86.
- McFADDEN J.T., COOPER E.L., and ANDERSEN J.K., 1962. Sex ratio in wild populations of brown trout. Trans. Am. Fish. Soc., 91, 94-95.
- PROUZET P., HARACHE Y., JALABERT B., 1979. Rapport des sexes et fécondité des Saumons (*S. salar*) capturés sur une rivière de Bretagne Nord (France). I.C.E.S. CM 1979/M, 30, 9 p.
- TAUBE C.M., 1976. Sexual maturity and fecundity in brown trout of the Platte river, Michigan. Trans. Am. Fish. Soc., 4, 529-533.