

530337

BA-TH 1310

**Université Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER Cedex 5**

**CIRAD-EMVT
Campus International de Baillarguet
TA 30 / B
34398 MONTPELLIER Cedex 5**

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

Année 2004-2005

RAPPORT DE STAGE

**RECHERCHE D'UN MARQUEUR DE
RESISTANCE A LA SALINITE CHEZ LE
TILAPIA SAROTHERODON
MELANOTHERON**

Par

**CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet**

Christelle ERUDEL

Le 19 octobre 2005

**Laboratoire d'accueil : Hawaii Institute of Marine Biology
University of Hawaii-Manoa**

**BA
TH1310**

es de stage: Jean-François Baroiller, Helena D'COTTA et Testsuya HIRANO



CIRAD
000073231

RESUME

Face aux perspectives d'accroissement de la population mondiale, la pêche ne suffira pas à satisfaire la demande en produits halieutiques à moins de mettre en péril les stocks naturels. L'aquaculture s'impose donc comme une solution inévitable pour l'avenir. Malheureusement, la disponibilité en eau douce pour cette pratique est de plus en plus réduite. La valorisation des eaux marines et saumâtres représente donc un enjeu important. Le but de cette étude était de rechercher un marqueur de résistance à la salinité chez deux populations de *Sarotherodon melanotheron* habitant dans des environnements salins très différents, de manière à pouvoir prédire ensuite la capacité des individus/populations de cette espèce à supporter les concentrations en sels de certains milieux d'élevage et de comparer les résultats obtenus avec une autre espèce de tilapia : *Oreochromis mossambicus*. Suite à de nombreux problèmes, liés à leur transport aux USA, les échantillons prélevés sur les deux populations de *Sarotherodon melanotheron* n'ont pas pu être analysés. Seules les expériences de transfert ont pu être réalisées sur les deux espèces. Elles confirment bien la grande capacité d'adaptation des tilapias aux conditions de salinité du milieu et plus particulièrement des 2 populations de *Sarotherodon melanotheron*, qui, contrairement au tilapia *Oreochromis mossambicus* supportent un transfert direct en eau de mer (35 ‰). Seule l'activité de la Na^+/K^+ ATPase a été mesurée chez *Oreochromis mossambicus*, mettant bien en évidence la corrélation entre l'augmentation de l'activité de la pompe à sodium et les concentrations croissantes en sels du milieu, activité passant de 0,6 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure en eau douce à près de 2 en eau de mer. Cette étude nous apprend aussi que lors d'un transfert, qu'il soit prograde ou rétrograde, il faut attendre 48 h pour voir un changement significatif dans l'activité ATPasique, ce laps de temps étant nécessaire au recrutement de nouvelles cellules à chlorures ainsi qu'aux modifications structurales de ces cellules.

Mots clés

Tilapia- Salinité- Cellule à chlorure- ATPase- eau saumâtre- adaptation

Sommaire

Résumés et mots clés.....	2
Sommaire.....	3
Remerciements.....	4
Introduction	
1 Les tilapias, les cellules à chlorures et la Na^+/K^+ ATPase	7
1.1 Les tilapias.....	7
1.2 Les branchies.....	9
1.2.1 Les cellules à chlorures	9
1.2.2 Na^+/K^+ ATPase.....	10
1.2.3 Effet de la salinité sur les cellules à chlorures	10
1.3 Contrôle hormonal des cellules à chlorures	13
1.3.1 La prolactine.....	13
1.3.2 Le cortisol.....	13
1.3.3 L'axe GH-IGF-I	14
2 Matériel et méthodes.....	15
2.1 Expérience 1	15
2.1.1 Les animaux	15
2.1.2 Transferts et prélèvements de <i>Sarotherodon melanotheron</i>	16
2.2 Expérience 2	17
2.2.1 Animaux et transferts	17
2.2.2 Dosages radio-immunologiques	18
2.2.3 Mesure de l'activité Na^+/K^+ ATPasique.....	19
2.2.4 Analyse statistique.....	19
3 Résultats.....	20
3.1 Transferts.....	20
3.2 Analyses	20
3.2.1 Mesures d'osmolarité	20
3.2.2 Dosages radio-immunologiques	20
3.2.3 Activité Na^+/K^+ ATPasique.....	21
4 Discussion.....	23
4.1 Transferts.....	23
4.2 Activité Na^+/K^+ ATPasique	23

CONCLUSION

Bibliographie

REMERCIEMENTS

Je remercie Helena D'COTTA et Jean-François BAROILLER pour toute l'aide et le soutien qu'ils m'ont apportés aussi bien dans mon travail que dans l'obtention de mon visa.

Je remercie l'Institut de Biologie Marine d'Hawaï pour son accueil et plus particulièrement le Professeur Testsuya HIRANO pour toutes les techniques qu'il m'a enseignées, ainsi que Kai FOX pour son aide précieuse lors des prélèvements.

Un merci tout particulier à Samir MESSAD pour sa disponibilité et son aide dans le traitement statistique des données.

INTRODUCTION

On a longtemps considéré que la mer offrait des ressources inépuisables, mais il faut bien se rendre à l'évidence, capturer une tonne de poisson coûte de plus en plus cher. L'effort de pêche va s'intensifiant et selon la FAO (Food and Agriculture Organization) 60 % des stocks de poissons recensés sont soit surexploités, soit en diminution. Dans le même temps, la croissance mondiale est telle qu'on sait aujourd'hui que la pêche ne suffira pas à satisfaire la demande en produits halieutiques sans mettre en péril les stocks sauvages. L'aquaculture s'impose donc comme une solution inévitable pour l'avenir. Avec une production estimée à plus de 48 millions de tonnes en 2001, l'aquaculture représente plus du tiers de la production halieutique mondiale. Malheureusement, l'agriculture, l'industrie et les usages domestiques limitent la disponibilité de l'eau douce pour l'aquaculture. La valorisation des eaux marines à saumâtres représente donc un enjeu important. Certaines espèces de tilapia possèdent les potentialités pour vivre et se reproduire dans de tels milieux. Ces poissons présentent de nombreux avantages qui expliquent leur succès en aquaculture : frais de nourriture faibles ou encore reproduction aisée en élevage. Aujourd'hui, 92 % de la production est réalisée en eau douce (FAO, 1999a). Le problème est donc de trouver des espèces tolérantes aux eaux salées et possédant un taux de croissance élevé. Actuellement, de nombreuses études (longues et coûteuses) sont menées sur la physiologie des poissons afin de mettre en évidence les espèces, naturelles ou hybrides, répondant le mieux à ces critères.

Le problème des espèces vivantes, qu'elles habitent les eaux douces ou salées, est le maintien de la balance hydrominérale, qui est fondamental à la vie. Certaines espèces vivent dans des habitats où la salinité varie et peut être très différente de leur environnement interne. Dans ce cas, le problème pour ces organismes est de maintenir leur milieu interne constant face aux gradients électrique et chimique qui vont induire des flux de solutés ou d'eau vers l'organisme ou vers l'extérieur. L'organisme n'étant pas imperméable il est parfois nécessaire d'utiliser de l'énergie (transport actif) afin de faire bouger ces solutés contre leur gradient électrochimique pour maintenir l'homéostasie.

La plupart des poissons maintiennent la concentration de leur milieu interne à 30 % (environ) de l'eau de mer (Evans, 1979). En eau douce les poissons doivent faire face à l'entrée d'eau et à la perte d'ions à travers leur urine et la branchie, un tissu épithélial perméable, alors qu'en eau salée ils doivent faire face à une perte d'eau par osmose et à une entrée massive de sels (Fig.1).

Puisque le rein des téléostéens n'est pas capable de fabriquer une urine concentrée pour éliminer les sels en eau salée et puisqu'en eau douce les sels sont perdus, un autre organe doit être utilisé pour la régulation des solutés, cet organe est la branchie.

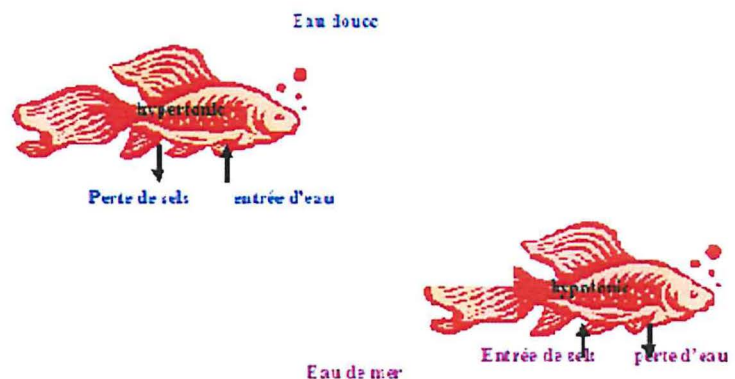


Figure 1: mouvement d'ions et d'eau en eau douce et en eau salée. (Source : ipfw.edu)

Les objectifs de cette étude sont :

D'essayer de trouver un marqueur de résistance à la salinité chez deux populations de *Sarotherodon melanotheron* de manière à savoir avec certitude et plus facilement si les poissons seront en mesure de supporter les concentrations en sels du milieu évitant ainsi les longues études et facilitant la recherche d'espèces capables d'être élevées en eau saumâtre ou salée. Pour cela, différentes analyses telles que la mesure d'osmolarité, les taux de GH et de prolactine hypophysaire ainsi que la mesure de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale doivent être conduites.

De mesurer les effets de la salinité environnementale sur l'osmolarité, les taux de GH et de prolactine ainsi que l'activité de la Na^+/K^+ ATPase chez *Oreochromis mossambicus*, un tilapia qui présente une forte résistance à la salinité afin de les comparer aux mesures relevées pour les deux populations de *Sarotherodon melanotheron*.

1 LES TILAPIAS, LES CELLULES A CHLORURES ET LA Na^+/K^+ ATPASE

1.1 LES TILAPIAS

La famille des Cichlidae est composée de plusieurs milliers d'espèces d'eaux douces et d'eaux saumâtres, réparties principalement en Afrique et en Amérique tropicale, avec quelques représentants en Asie ainsi qu'à Madagascar. Regan (1920) sera le premier à différencier plusieurs groupes chez les Cichlidae sur la base de caractères ostéologiques. Depuis ces travaux, la systématique et les relations phylogénétiques au sein de cette famille ont été souvent controversées.

La classification la plus récente, proposée par Trewavas (1982, 1983), basée à la fois sur les caractères morphométriques, méristiques et comportementaux est la moins controversée.

Selon Trewavas, les tilapias seraient composés des genres :

Sarotherodon, rassemblant les espèces pratiquant l'incubation buccale biparentale et paternelle (10 espèces) (Photo 1).

Oreochromis, comprenant uniquement les espèces incubatrices buccales maternelles (30 espèces).

Tilapia, rassemblant l'ensemble des espèces pratiquant la ponte et l'incubation sur substrat (30 espèces).



Photo 1: *Sarotherodon melanotheron*. (Source : www.dcg-online)

Les tilapias possèdent beaucoup de qualités expliquant leur succès en élevage. Ils présentent d'excellents taux de croissance, même avec une alimentation pauvre en protéines, peuvent s'adapter à des conditions environnementales très variées, sont peu sensibles aux maladies, ont des temps de générations courts et sont capables de se reproduire en captivité avec facilité (Lowe-McConnel, 1982).

Les différences de comportement reproducteur chez les tilapias ont été décrites tout d'abord par Baerends & Baerends Van Roon en 1950, puis en 1959 par Lowe-McConnel.

Les *tilapia (sensu stricto)* sont monogames pendant la durée de l'incubation, les couples s'apparient bien avant le frai. Lors de l'accouplement, les œufs sont déposés au fond d'un nid construit par le mâle. Le rôle des parents est similaire chez les deux sexes.

Les *Sarotherodon* et les *Oreochromis* pratiquent l'incubation buccale des œufs.

Dans le cas des *Oreochromis* (photo 2), après une parade sexuelle, la femelle dépose un lot d'ovules aussitôt fécondés par le mâle. La femelle reprend les œufs dans sa bouche et les y garde une dizaine de jours jusqu'à la résorption de la vésicule vitelline. A ce stade, les alevins s'échappent alors de la cavité buccale de la mère dans



Photo 2: *Oreochromis mossambicus*. (Source : www.dcg-online)

laquelle ils vont néanmoins se réfugier en cas de danger. Ils deviennent indépendants au bout

d'une semaine environ, à la taille de 11 mm, alors qu'ils mesuraient 4 à 5 mm à l'éclosion (Baroiller *et al.*, 1997). Les alevins sont phytoplanctonophages. Une femelle en bonne condition se reproduit toutes les 6 à 8 semaines à raison de 800 à 1000 œufs en moyenne par ponte.

Chez les espèces du genre *Sarotherodon*, c'est le mâle qui, après fécondation, se charge d'incuber les œufs dans sa cavité buccale en conditions normales. Un rôle des femelles peut cependant être observé lorsque le mâle est trop petit et ne peut pas incuber la totalité de la ponte (Legendre et Ecoutin, 1989).

Dans le genre *Sarotherodon*, c'est l'espèce *Sarotherodon melanotheron*, ayant pour origine l'Afrique de l'Ouest, qui est la plus adaptée aux milieux salés. En milieu naturel, elle est couramment rencontrée dans des salinités extrêmes pouvant dépasser 130 ‰ (J.J. Albaret, comm. personnelle); en milieu contrôlé, des salinités de 123 ‰ peuvent être atteinte par des transferts progressifs (Lemarié *et al.*, 2004). En revanche, cette espèce lagunaire souffre d'une faible croissance et d'une mauvaise conversion des aliments en eau salée (Legendre *et al.*, 1989).

Parmi le genre *Oreochromis*, *O. mossambicus* est l'une des espèces les plus euryhalines, elle peut survivre, grandir et se reproduire en milieu marin mais ses performances de croissance sont faibles.

1.2 LES BRANCHIES

Les branchies sont les organes les plus importants chez les poissons en terme d'osmorégulation, jouant un rôle aussi bien en eau douce qu'en eau salée. C'est en effet au niveau des branchies que se fait le transport des ions, et particulièrement des ions sodium et chlorure : ions qui sont activement sécrétés en eau salée et prélevés du milieu en eau douce.

Ces échanges d'ions sont médiés par différents transporteurs et canaux localisés dans la cellule à chlorure (CC).

1.2.1 Les cellules à chlorures

Les cellules à chlorures, encore appelées cellules riches en mitochondries ou ionocytes sont des cellules très spécialisées, caractérisées par de nombreuses mitochondries et un système tubulaire en continuité avec la membrane basolatérale (Fig.2).

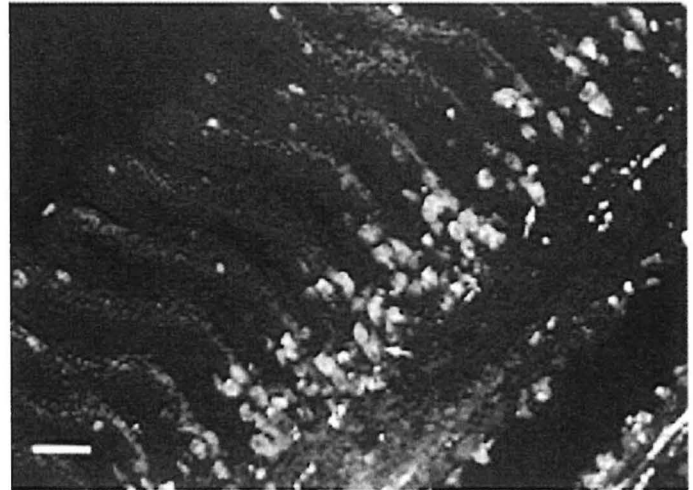


Figure 2: Coloration des mitochondries de cellules à chlorures localisées dans l'épithélium lamellaire et filamenteux. (Source : ajp-cell physiology)

Il semblerait qu'il existe deux catégories de cellules à chlorures (alpha et bêta), identifiées chez les saumons, le tilapia et le guppy principalement. Elles diffèrent de par leur densité électronique, leur position et leur morphologie. (Pisam et Rambourg, 1991 ; Perry, 1997).

Les cellules alpha sont caractérisées par une membrane apicale lisse et une coloration pâle par rapport à leur densité électronique. Son système tubulaire présente un diamètre régulier dans l'ensemble du cytoplasme (Pisam et Rambourg, 1991). Elles sont très immunoréactives à la Na^+/K^+ ATPase. On pense qu'elles sont les précurseurs des cellules à chlorures généralement rencontrées chez les poissons adaptés à l'eau salée (Perry, 1997).

Les cellules bêta sont localisées dans la portion interlamellaire des filaments, elles sont de plus petite taille, avec une coloration plus foncée, ont une membrane apicale invaginée et sont très peu immunoréactives aux anticorps Na^+/K^+ ATPasiques. On les retrouve seulement chez les poissons adaptés à l'eau douce.

1.2.2 Na⁺/K⁺ ATPase

Les transporteurs majeurs impliqués au niveau des branchies dans la sécrétion de sels en eau salée sont la Na⁺/K⁺ ATPase (aussi connue sous le nom de pompe à sodium) localisée dans la membrane basolatérale, elle considérée comme transporteur principal, son activité varie en fonction de la salinité du milieu (Fig.3) ; le Na⁺/K⁺, 2Cl⁻ co-transporteur (NKCC) et un canal à chlorure localisé en position apicale jouent aussi un grand rôle.

La Na⁺/K⁺ ATPase est composée de deux sous-unités (Fig 4) :

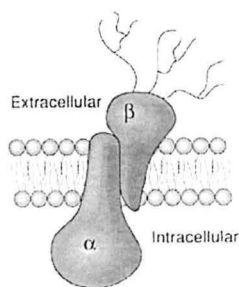


Figure 4: Schéma représentant la Na⁺/K⁺ ATPase. (Source ttuhsc.edu)

La sous-unité alpha (113

KD) est la sous unité

majeure. Elle lie l'ATP ainsi que les ions sodium et potassium et contient le site de phosphorylation.

La sous-unité bêta (35 KD) est absolument indispensable à l'activité du complexe protéique. Des doutes existent encore en ce qui concerne la structure de cette molécule, mais la séquence d'acides aminés laisse à penser qu'elle possède 8 à 10 domaines transmembranaires.

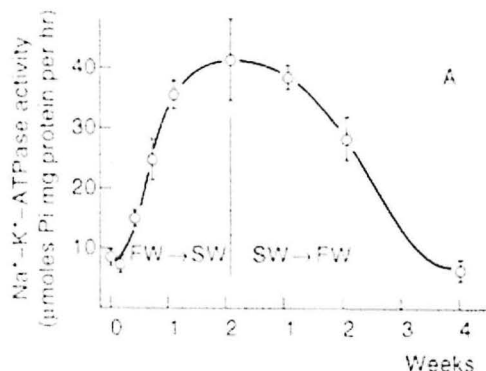


Figure 3: Activité Na⁺/K⁺ ATPasique chez l'anguille au cours de transferts (FW: eau douce; SW eau de mer). (Source : ipfw.edu)

1.2.3 Effet de la salinité sur les cellules à chlorures

En eau salée

Les cellules à chlorures grossissent et prolifèrent lors d'une acclimatation à des salinités croissantes chez beaucoup de poissons euryhalins (Pisam et Rambourg, 1991) (Fig.5). De nouvelles cellules à chlorures sont recrutées à partir de cellules basales de l'épithélium pendant que les cellules existantes s'élargissent.

Des modifications de l'ultrastructure se produisent aussi. On observe une prolifération de la membrane basolatérale, une arborescence du système tubulaire (Fujita et Yamamoto, 1954), ainsi qu'une extension des invaginations basolatérales augmentant ainsi la surface d'échange (Pisam et Rambourg, 1991).

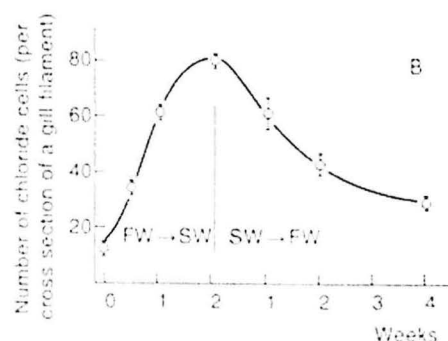


Figure 5: Nombre de cellules à chlorures chez l'anguille au cours de transferts (FW: eau douce; SW eau de mer). (Source : ipfw.edu)

La surface apicale de la cellule à chlorure s'invagine pour former une crypte. Les cellules à chlorures des poissons adaptés à l'eau de mer ont une surface apicale plus lisse et réduite (Brown, 1992). La présence d'une « cellule accessoire » adjacente à la cellule à chlorure a souvent été rapportée, et associée au transfert des poissons euryhalins en eau saumâtre ou salée (Pisam et Rambourg, 1991 ; Perry et Laurent, 1993). Cependant, pour un nombre limité d'auteurs, ces cellules représenteraient des cellules à chlorures en cours de différenciation plutôt qu'une catégorie de cellules distinctes (Wendelaar Bonga et Van der Meij, 1989).

Les cellules à chlorures sont très riches en Na^+/K^+ ATPase. Cette enzyme est fondamentale dans l'excrétion des ions chez les poissons adaptés à l'eau salée. Plus de 10^8 pompes à sodium sont présentes dans une seule cellule à chlorure (Karnaky, 1986).

Plusieurs modèles ont été proposés pour les mouvements d'ions à travers les branchies. Le plus largement accepté pour les mouvements ioniques en eau salée est celui de Silva *et al.* (1977). Ils suggèrent que les pompes à sodium localisées dans la membrane basolatérale créent un gradient ionique et électrique favorable à un échangeur Na^+/Cl^- qui va faire pénétrer les ions chlorures dans la cellule grâce à un co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. Les ions Cl^- vont ensuite quitter la cellule par la surface apicale grâce à un canal chlorure type CFTR (Marshall *et al.* 1995). Les ions Na^+ sont transportés passivement de manière paracellulaire entre la cellule à chlorure et la cellule accessoire, dans le sens inverse du gradient électrique (Fig. 6).

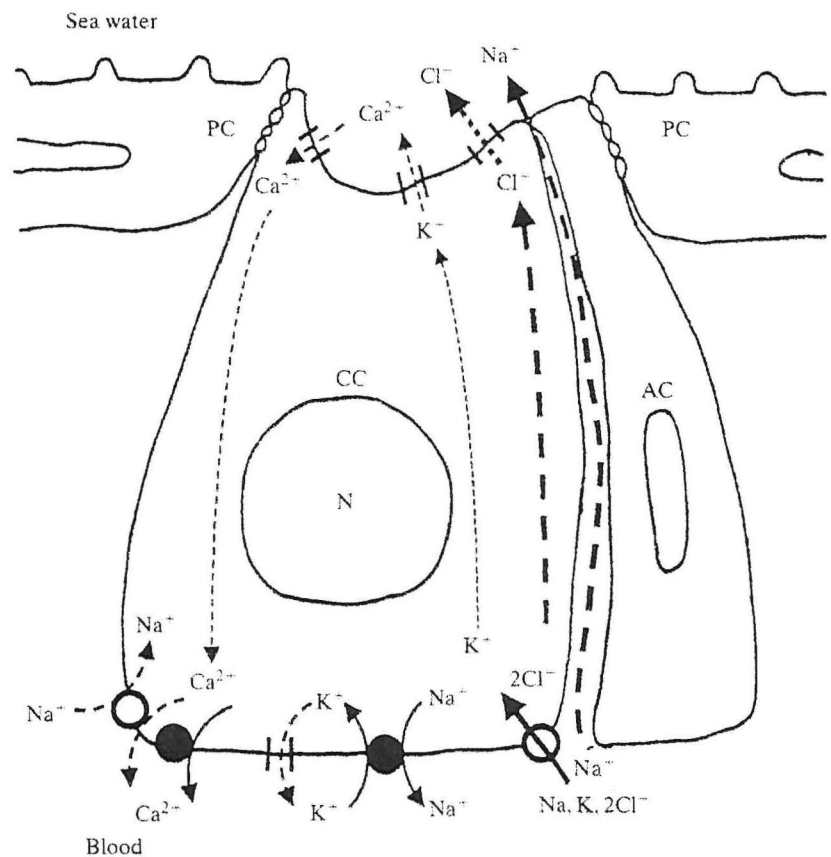


Figure 6: Cellules à chlorures chez les téléostéens marins. (Source : ipfw.edu)

En eau douce

Les cellules à chlorures des poissons adaptés à l'eau douce sont plus petites, ont un système tubulaire moins développé et présentent des modifications en ce qui concerne leur surface apicale. Ces cellules semblent être des précurseurs aux cellules pleinement développées des poissons adaptés à l'eau salée.

En eau douce, les branchies sont connues pour leur rôle dans l'absorption d'ions, la régulation du métabolisme acide-base et l'excrétion des ions ammoniac et ammonium en plus de leur rôle dans les échanges respiratoires.

Les sites et les mécanismes impliqués dans l'absorption des ions en eau douce ne sont pas connus avec certitude. Aussi bien les cellules à chlorures que les cellules pavements peuvent être impliquées sans le prélèvement des ions sodium et chlorure. Les ions Cl^- sont échangés contre des ions HCO_3^- au niveau de la surface apicale et vont ensuite quitter la cellule au niveau basolatéral en remontant le gradient électrochimique.

Il se pourrait que le sodium pénètre l'épithélium branchial grâce à un échange avec les ions H^+ ou à travers un canal sodium couplé à une H^+ -ATPase, pour ensuite quitter la cellule par la membrane basolatérale grâce à la Na^+/K^+ ATPase (Fig. 7).

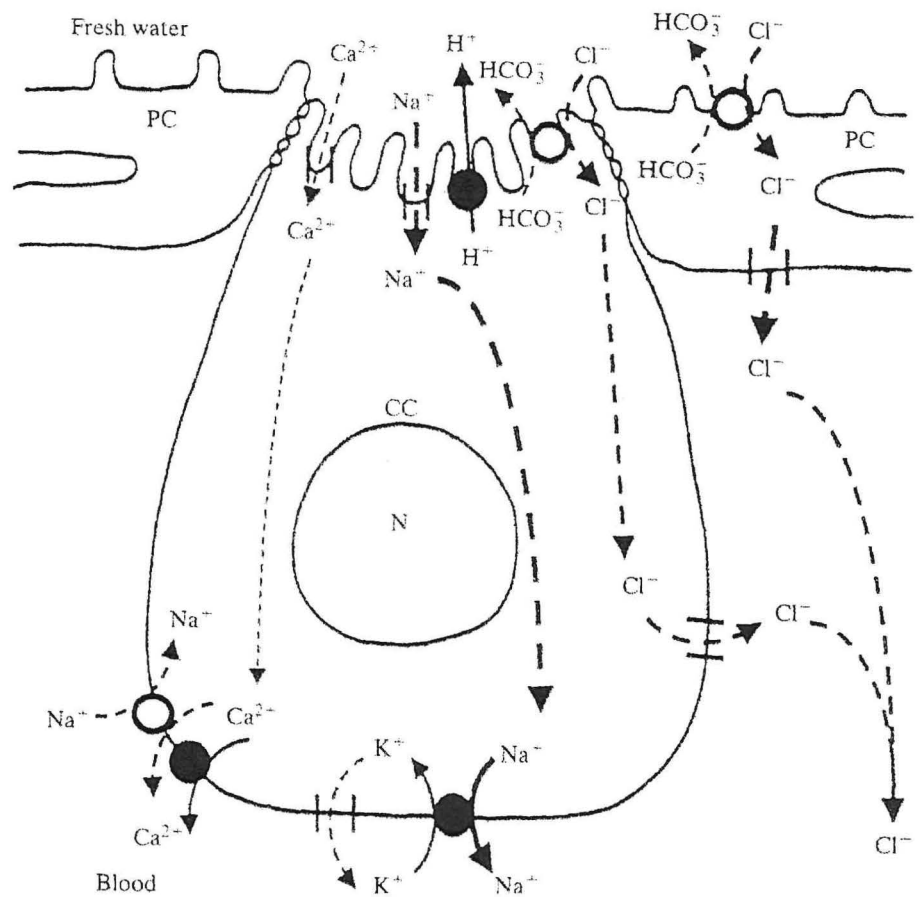


Figure 7: Cellule à chlorure d'un poisson d'eau douce. (Source : ipfw.edu)

1.3 CONTROLE HORMONAL DES CELLULES A CHLORURES

Un large panel d'agents circulants et locaux modulent le transport d'ions à travers l'épithélium branchial des poissons, soit en affectant directement le transport, soit en modifiant la taille et la distribution des cellules dans l'épithélium.

1.3.1 La prolactine

L'importance de la prolactine (PRL) dans l'osmorégulation chez le poisson a été démontrée pour la première fois en 1950 lors d'études sur le fondule barré (*Fundulus diaphanus*), un poisson euryhalin. Six ans plus tard, Burden découvre que ces poissons ne sont pas capables de survivre en eau douce après une hypophysectomie, suggérant qu'un facteur de la glande pituitaire est impliqué dans l'adaptation de cette espèce à l'eau douce.

Par la suite, Pickford et Phillips (1959) trouvent qu'un traitement à la prolactine permettait aux poissons de survivre à un transfert en eau douce, même s'ils ont subi une hypophysectomie.

Il est maintenant admis que la prolactine est l'hormone de l'adaptation à l'eau douce chez la plupart des téléostéens euryhalins.

Chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*), deux formes de prolactine ont été identifiées : une qui contient 177 amino acides (tPRL₁₇₇) et une qui en contient 188 (tPRL₁₈₈) (Specker *et al.*, 1985).

L'homologie entre ces deux formes est de seulement 69 %, chaque forme étant codée par des gènes différents. Les deux formes de prolactine sont localisées dans les cellules du rostral pars distalis (RPD) mais sont régulées différemment durant leur développement, par des changements dans la nutrition ou encore la salinité (Borski *et al.*, 1992). Des études menées chez plusieurs téléostéens, incluant le tilapia ont montré qu'il existe une relation inverse entre la salinité et l'activité des cellules à prolactine *in vivo* ainsi qu'entre l'osmolalité du milieu et la sécrétion de PRL *in vitro*. La prolactine a des effets marqués sur la morphologie, la distribution et le nombre de cellules à chlorures, qu'elle réduit. Elle exerce aussi une inhibition sur l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique. Il ne faut pas oublier l'effet de cette hormone sur la perméabilité branchiale : des études ont montré que la prolactine décroît la perméabilité des branchies et accroît la sécrétion de mucus, ce qui va contribuer à la régulation de la balance hydrominérale en faisant obstacle au passage des molécules dans les cellules des branchies (Bentley, 1998).

1.3.2 Le cortisol

Le cortisol (Fig.8) est le plus actif et le plus abondant des corticostéroïdes dans le sang des poissons. Sa structure est fortement conservée chez tous les vertébrés chez lesquels il se retrouve. La sécrétion de cortisol est sous la dépendance de l'axe hypothalamo-hypophyso-interrenal. Dans l'étape finale, la sécrétion de l'ACTH (adenocorticotropique hormone) stimule le

tissu interrenal qui sécrète le cortisol. Les cibles premières sont les branchies, les intestins et le foie, reflétant bien les deux principales fonctions identifiées jusqu'alors pour cette hormone : l'osmorégulation et l'entretien du métabolisme énergétique (Wondelaar Bonga, 1997).

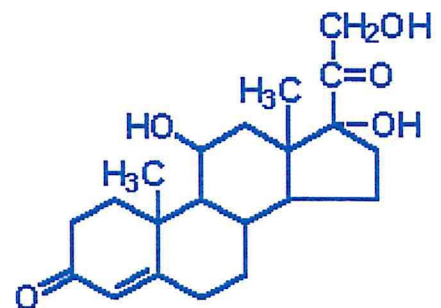


Figure 8: Formule du cortisol.
(Source : fit-zone.com)

Le taux de cortisol augmente avec la salinité, ce qui entraîne une augmentation de la densité et de la taille des cellules à chlorure, accroît le nombre de mitochondries, l'activité ATPasique ainsi que la perméabilité de la vessie.

1.3.3 L'axe GH-IGF-I

L'hormone de croissance GH (growth hormone) appartient à la même famille de peptide que la prolactine. Ces deux hormones partagent des similarités dans la séquence d'acides aminés. Elles proviennent certainement de la duplication d'un même gène ancestral. De nombreuses études ont établi que la GH peut être considérée comme une hormone jouant un rôle primordial dans l'adaptation des poissons à l'eau salée (Yada & Hirano, 1992). De nombreuses actions de la GH sont médiées grâce à l'IGF-I (Insuline like growth factor I).

L'IGF-I est un polypeptide de 70 acides aminés produit principalement dans le foie mais aussi dans plusieurs autres tissus.

Longtemps on a cru que l'action de la GH et de l'IGF-I dans l'osmorégulation était associée à la migration et au cycle de croissance des saumons, mais des études récentes ont montré que les effets de ces deux hormones sur l'acclimatation à la salinité sont largement répandus chez les téléostéens (Kajimura *et al.*, 2002). L'étude de leurs mécanismes d'actions indique que les branchies sont une cible importante (McCormick, 1995).

L'administration de GH et d'IGF-I entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm et/ou une augmentation de l'activité Na^+/K^+ ATPasique. Il y a une forte interaction entre la GH et le cortisol dans la régulation de la sécrétion des sels. Leur action apparaît être synergique. Par exemple, une injection de GH et de cortisol a des effets plus importants que chacune des hormones injectées séparément (McCormick, 2002). De plus, Sedelin *et al.* (1999) ont démontré que ces hormones injectées simultanément avaient aussi un effet additif sur l'expression de la Na^+/K^+ ATPase ainsi que sur le nombre de cellules à chlorures.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 EXPERIENCE 1

2.1.1 Les animaux



Au cours de cette expérience, qui s'est déroulée au CIRAD à Montpellier, deux populations de *Sarotherodon melanotheron* originaires du Sénégal (Fig.9) ont été utilisées :

La population du Saloum a été collectée à Foundiougne (Fig.10) en 2004 sur l'estuaire du Saloum où la salinité varie entre 48 et 94 ‰. Ces poissons ont été ramenés en

France, élevés et reproduits en eau douce dans des

aquariums de la serre du GAMET (Groupe Aquaculture Méditerranéenne et Tropicale) à Montpellier.

Figure 9: Localisation du Sénégal. (Source : cueep-tg.univ-lille1.fr)

La population de Saint Louis a été collectée en 2003 à Ross-Bethio (région de Saint Louis (Fig.10) sur le fleuve Sénégal où la salinité est d'environ 2 ‰ avant d'être transportée en France, où les poissons ont été stockés dans des aquariums d'eau douce. Les descendants des individus de ces deux populations ont été utilisés

pour nos études.

Ces populations ont été choisies

car elles présentent un grand intérêt. Appartenant à la même espèce, elles ont subi des pressions de sélections et une évolution différente au cours de siècles les amenant à vivre dans des milieux très différents alors qu'elles avaient à la base les mêmes capacités d'adaptation.

Pendant toute la durée de l'expérience, les poissons ont été nourris deux fois par jour avec des granulés Biomar.

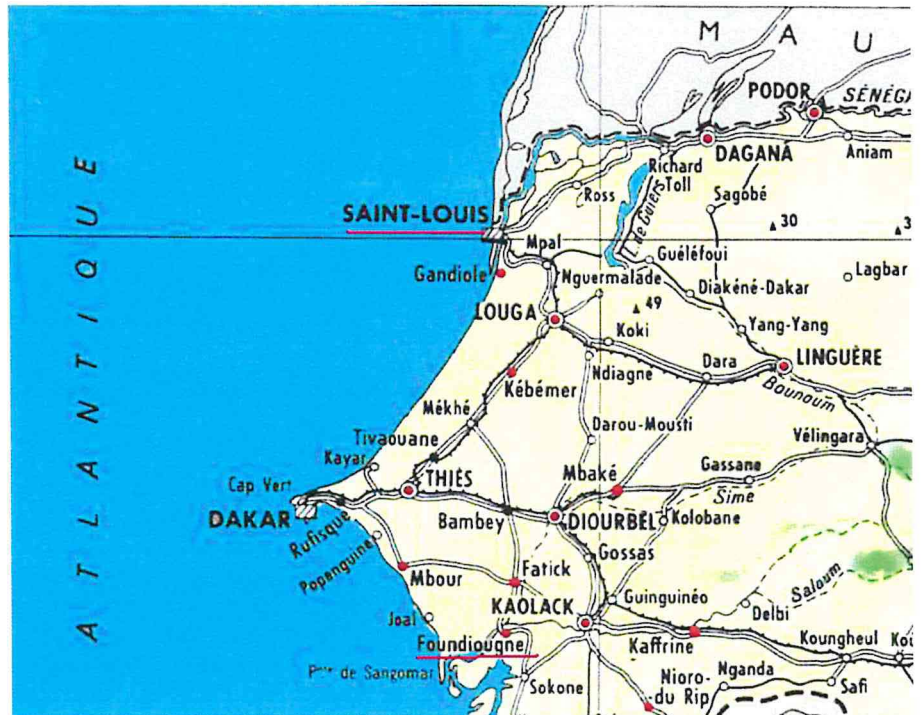


Figure 10: Localisation des deux populations de *Sarotherodon melanotheron*. (Source : urantia.com)

2.1.2 Transferts et prélèvements de *Sarotherodon melanotheron*

Les poissons, âgés de deux mois et pesant entre 0,5 et 2 grammes ont été prélevés à la serre du GAMET avant d'être transportés au laboratoire d'Aquaculture du CIRAD (Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement) à Baillarguet et mis en lots dans des aquariums de 30 litres contenant de l'eau douce. Avant tout transfert, ces poissons vont être acclimatés pendant 48 heures à leur nouvel environnement.

Transfert direct sans stress

Deux transferts directs sans stress ont été effectués : a) de 0 ‰ à 35 ‰ et b) de 0 ‰ à 70 ‰. Ces transferts ont été réalisés à l'aide d'un tuyau qui aspire progressivement l'eau douce de manière à stresser le moins possible les poissons. L'eau douce a ensuite été remplacée par de l'eau salée préparée à partir de sel de mer artificiel (Instant Ocean®) et d'eau à 27°C préalablement déchlorée par bullage.

Transfert direct de 0 ‰ à 35 ‰ avec stress

Lors du transfert, qui se déroule comme précédemment, les poissons sont pêchés à l'aide d'un filet et soulevés au dessus de la surface de l'eau de manière à les stresser.

Transfert et cinétique de prélèvement

Saint Louis

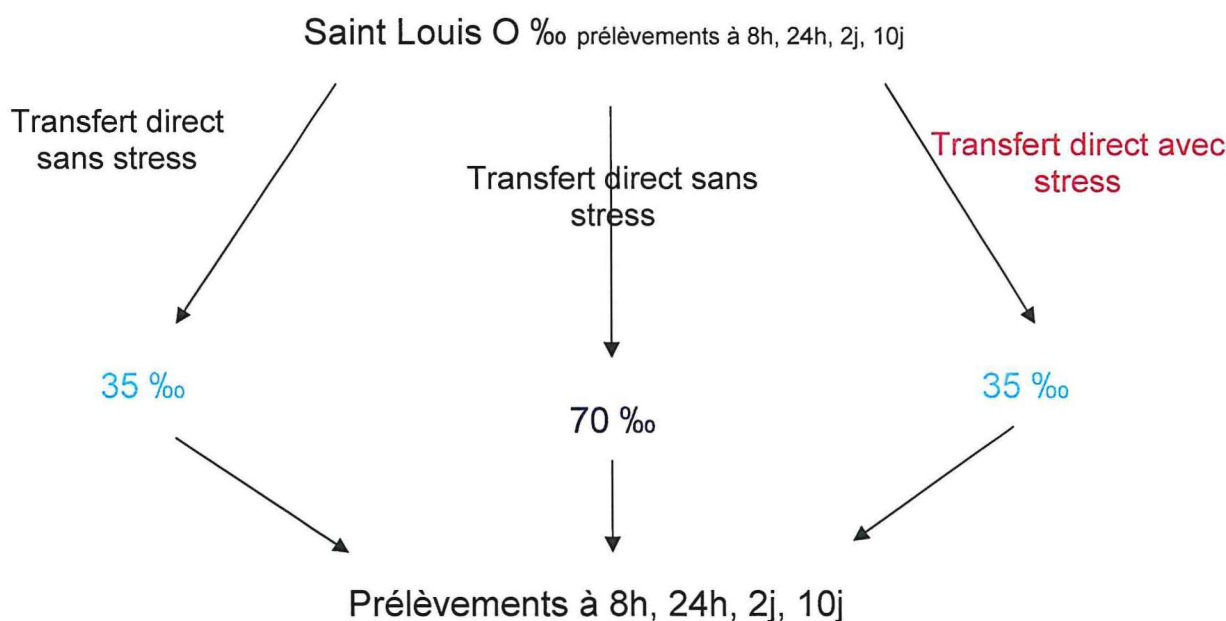


Figure 11: Transfert et cinétique de prélèvement pour la population de St Louis.

Dix poissons des lots témoins (0 ‰) ayant subi ou non un stress ont été sacrifiés à 8h, 24h, 2j et 10j. Deux autres lots de 50 individus chacun ont été transférés directement, avec ou sans stress dans de l'eau salée à 35 ‰ avant d'être sacrifiés à raison de 10 individus, 8h, 24h, 2j et 10j après leur transfert (Fig.11).

Saloum

Trois lots, un lot témoin (0 ‰), un lot ayant subi un transfert direct sans stress à 35 ‰ et un lot ayant été transféré à 70 ‰ comprenant chacun 40 individus ont été échantillonnés comme précédemment (Fig.12).

Saloum 0 ‰ prélèvements à 8h, 24h, 2j, 10j

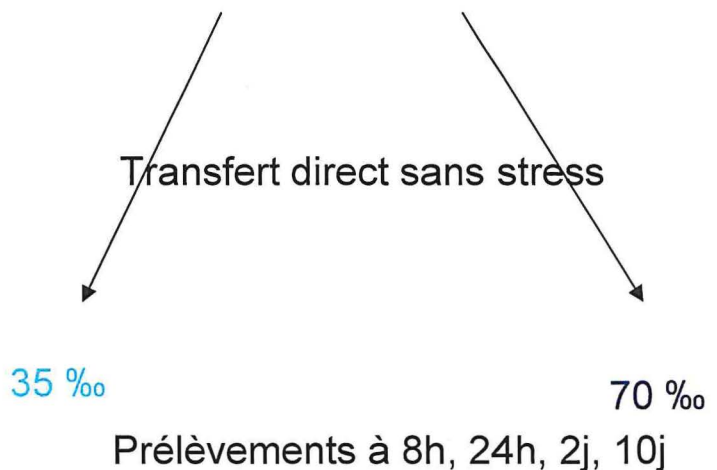


Figure 12: Transfert et cinétique de prélèvement pour la population du Saloum.

Prélèvements

Après décapitation, les branchies des poissons ont été prélevées à l'heure adéquate, quatre ont été placées dans du Bouin et 5 dans de l'azote liquide avant d'être stockées à -80°C. Une fois les branchies prélevées, les têtes des poissons sont elles aussi placées soit dans du Bouin, soit congelées. Tous les échantillons sont stockés au CIRAD de Baillarguet en vue d'être envoyés à l'institut de biologie marine d'Hawaï afin d'y être analysés.

2.2 EXPERIENCE 2

2.2.1 Animaux et transferts

Des tilapias (*Oreochromis mossambicus*) ont été élevés pendant une semaine dans des aquariums de 120 litres contenant de l'eau douce à 25°C sous une photopériode normale à l'institut de biologie marine d'Hawaï.

Des mâles et des femelles pesant entre 2 et 5 grammes ont ensuite été transférés dans des aquariums de 40 litres contenant soit de l'eau douce, soit de l'eau à 22 ‰. Les poissons ont été sacrifiés 8h, 24h, 48h et 7 jours après leur transfert (Fig.13).

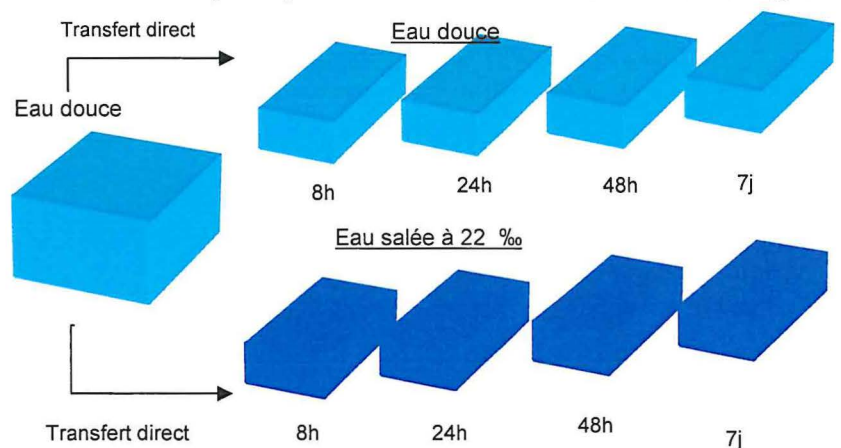


Figure 13: Transfert direct et cinétique de prélèvement pour *Oreochromis mossambicus*.

Le sang des différents individus a été collecté en utilisant une micro méthode : grâce à un capillaire affiné et façonné en forme d'aiguille à l'aide d'une flamme, on aspire le sang du poisson qu'on a préalablement fileté sur un coté en perçant l'artère se situant juste en dessous de la colonne vertébrale à l'aide du capillaire. Immédiatement après la collecte, le plasma a été séparé par centrifugation à 3000 rpm pendant 3 minutes et les échantillons ont été stockés à température ambiante en attendant d'être analysés en France.

Les animaux ont ensuite été rapidement décapités et les filaments branchiaux ont été prélevés pour mesurer l'activité Na^+/K^+ ATPasique. Ces échantillons ont été placés dans du SEI buffer (150 mM Sucre, 10 mM EDTA, 50 mM Imidazole, pH= 7,3), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

L'hypophyse des poissons a aussi été prélevée, placée dans de l'eau distillée et gardée à -80°C jusqu'à ce que les taux de prolactine et de GH puissent être mesurés par dosage radio-immunologique.

Un autre groupe de poissons a été acclimaté graduellement à 35 ‰ (eau de mer) sur deux semaines et maintenus à cette salinité pendant une semaine. Les animaux ont ensuite été transférés dans des aquariums de 40 litres contenant soit de l'eau de mer (35 ‰), soit de l'eau douce (Fig 14).

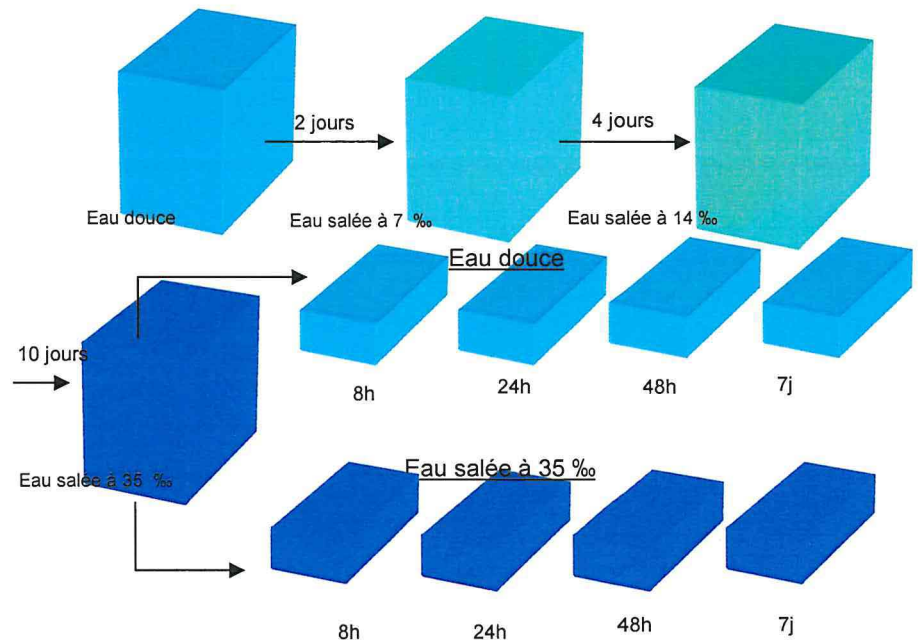


Figure 14: Acclimatation progressive, transfert et cinétique de prélèvement d'*Oreochromis mossambicus*.

Les poissons ont été tués à des intervalles de temps différents. Les échantillons ont été prélevés comme précédemment.

2.2.2 Dosages radio-immunologiques

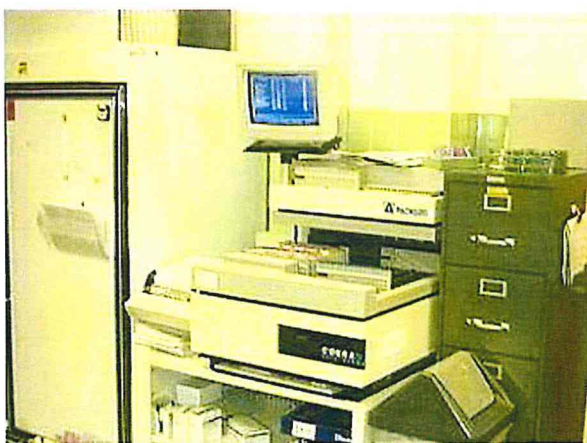


Figure 15: Compteur de radioactivité utilisé lors des RIA. (Source : pemed.com)

Specker *et al* ont montré en 1985 que la réponse des deux prolactines : PRL_{188} et PRL_{177} étaient les mêmes, seuls les taux de PRL_{188} vont donc être mesurés.

Les taux de GH et de PRL_{188} vont être déterminés par dosage radio-immunologique (RIA) à partir de la procédure établie par Ayson *et al.* (1993) (Fig.15).

2.2.3 Mesure de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique

L'activité Na⁺/K⁺ ATPasique a été mesurée en utilisant la procédure décrite par Mc Cormick en 1993.

Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur manuel dans du SEI buffer dans lequel on a ajouté 1 % de deoxycholate et centrifugés à 5000 g pendant 30 secondes. Le surnageant a ensuite été récupéré et incubé avec du tampon contenant du NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide réduit). L'oxydation du NADH a été mesurée à 340 nm pendant dix minutes à température ambiante en présence ou absence de 0,5 mM de ouabaïne, un inhibiteur spécifique de la Na⁺/K⁺ATPase .

La teneur en protéines a ensuite été mesurée grâce à un kit (Coomassie blue protein assay kit ; Biorad, 500-0002), utilisant l'albumine bovine comme standard.

2.2.4 Analyse statistique

La comparaison de l'activité ATPasique des branchies du groupe contrôle et du groupe ayant subi les transferts s'est faite en utilisant le t-test.

Les effets de la salinité et du temps après transfert ont été analysés grâce à un test de comparaison multiple avec correction de Dunnett.

Dans les deux cas, l'homogénéité des variances a été vérifiée grâce au test de Bartlett.

3 RESULTATS

3.1 TRANSFERTS

Expérience 1 : *Sarotherodon melanotheron*

Les deux populations de *S. melanotheron*, Saloum et Saint Louis survivent à un transfert direct de l'eau douce à l'eau de mer (35 ‰) et ce, même si on les stresse. En revanche, le passage de l'eau douce à l'eau salée à 70 ‰ (deux fois la concentration de l'eau de mer) a été fatal aux poissons des deux populations. Au bout d'une heure, les 50 individus que comptait la population de Saint Louis sont morts et au bout de trois heures, on ne compte plus aucun survivant parmi la population de Saloum

Expérience 2 : *Oreochromis mossambicus*

Oreochromis mossambicus tolère bien le passage de l'eau douce à l'eau salée à 22 ‰. En revanche, lors d'un transfert direct à l'eau de mer (35 ‰), la totalité des individus sont morts en moins de 24 heures. Cependant, en augmentant la salinité de 7 grammes par litre tous les deux jours, on peut facilement amener ces poissons à survivre en eau de mer sans mortalité.

3.2 ANALYSES

Les échantillons prélevés à Montpellier sur les populations de *S. melanotheron* étant arrivés décongelés à Hawaï (délai non respecté par le transporteur Fedex), aucune analyse n'a donc pu être conduite sur ces poissons.

3.2.1 Mesures d'osmolarité

Les échantillons de plasma censés être analysés de retour à Montpellier ont été saisis par la douane américaine, nous n'avons donc aucun résultat en ce qui concerne ce paramètre.

3.2.2 Dosages radio-immunologiques

Deux dosages radio-immunologiques (RIA) ont été conduits sur les homogénats hypophysaires des *Oreochromis mossambicus*, malheureusement, suite à une erreur dans les dilutions et à un problème technique de la machine, les résultats obtenus n'ont pas pu être analysés.

3.2.3 Activité Na⁺/K⁺ ATPasique

Transfert eau douce-eau salée à 22 ‰

L'activité Na⁺/K⁺ ATPasique des branchies de huit individus de chaque groupe d'*O. mossambicus* a été mesurée. Le premier groupe a été sacrifié avant tout transfert, puis après 8h, 24h, 48h et 7j passés soit dans l'eau douce, soit dans de l'eau à 22 ‰. La figure 16 ci-dessous montre les résultats obtenus.

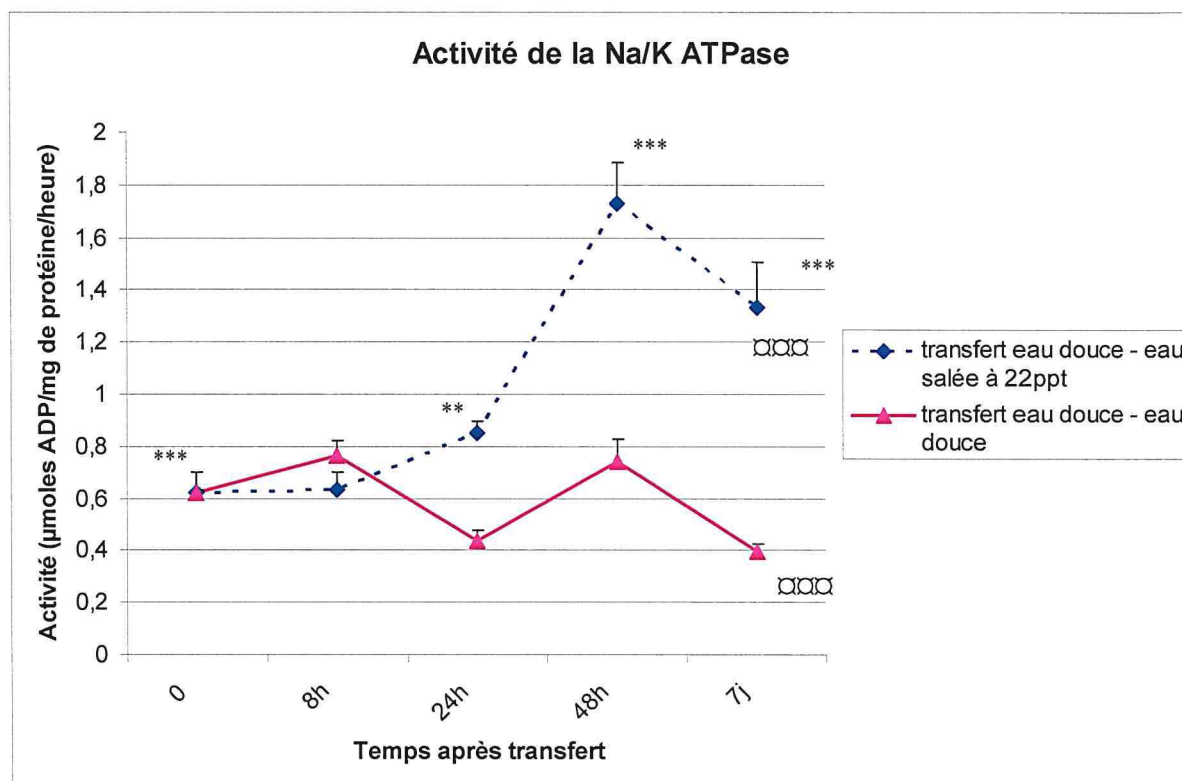


Figure 16: Activité Na⁺/K⁺ ATPasique lors d'un transfert direct à 22 ‰ chez *Oreochromis mossambicus* (n=8). Données exprimées sous la forme de moyenne ± S.E.M. ***, ** Différence significative dans l'activité de la pompe en fonction du temps après transfert à 0.1 et 5 % respectivement. □□□ Différence significative entre les deux groupes à p<0.001.

L'activité Na⁺/K⁺ ATPasique des poissons transférés de l'eau douce à d'autres aquariums contenant de l'eau douce (lot témoin) varie peu du début à la fin de l'expérience et est en moyenne de 0,64 µmole ADP/mg de protéine/heure.

En revanche, en ce qui concerne les poissons transférés directement de l'eau douce à l'eau salée à 22 ‰, on observe une augmentation significative de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase au bout de 24 heures, passant de 0,6 µmole ADP/mg de protéine/heure à 0 et 8 h à plus de 0.8 au bout de 24 h pour ensuite atteindre un maximum de 1.7 à 48 heures après transfert avant de diminuer et de retomber à 1,3 µmole ADP/mg de protéine/heure 7 jours après le transfert.

Transfert eau de mer-eau douce

Au cours de cette expérience, l'activité de la Na^+/K^+ ATPase a été mesurée avec la même cinétique que précédemment. Les poissons, préalablement adaptés à l'eau de mer ont ensuite été transférés soit dans de l'eau de mer, soit dans de l'eau douce et sacrifiés à 8h, 24h, 48h et 7j (Fig.17).

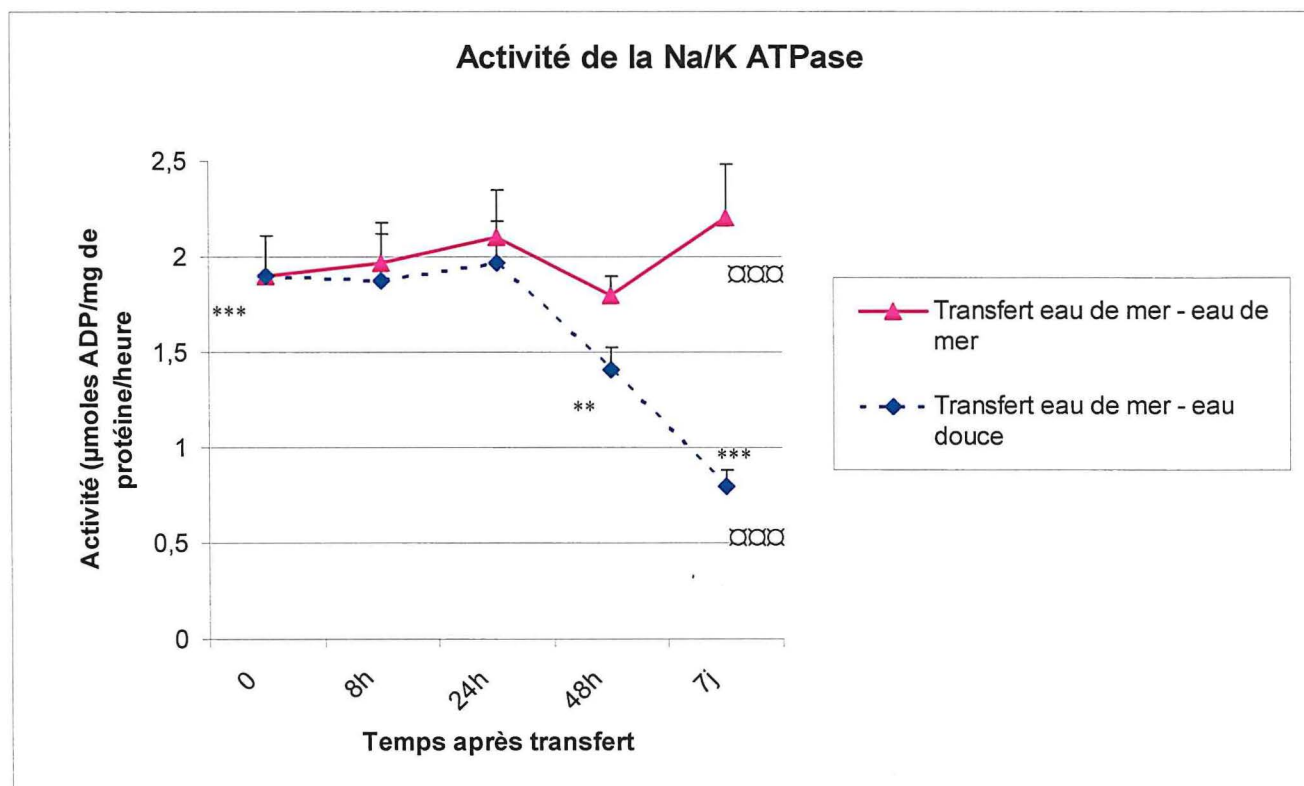


Figure 17: Activité ATPasique après acclimation à 35 ‰ et transfert en eau douce chez *Oreochromis mossambicus* ($n=8$). Données exprimées sous la forme de moyenne \pm S.E.M. ***, ** Différence significative dans l'activité de la pompe en fonction du temps après transfert à 0.1 et 5 % respectivement. □□□ Différence significative entre les deux groupes à $p<0.001$.

L'activité de la pompe à sodium du groupe témoin en eau salée (transfert eau salée – eau salée) est en moyenne de 1,99 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure.

Pour ce qui est des groupes transférés de l'eau salée à l'eau douce, on observe une diminution de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase au bout de 48 h. En effet, l'activité, initialement de 1,9 à 2 $\mu\text{moles ADP/mg}$ de protéine/heure en eau salée, tombe à 1,4 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure après 2 jours passés en eau douce et continue de diminuer jusqu'à atteindre 0,8 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure 7 jours après le transfert, soit une activité divisée par 2,5 par rapport à l'activité de départ relevée en eau de mer.

4 DISCUSSION

4.1 TRANSFERTS

Oreochromis mossambicus et *Sarotherodon melanotheron* comptent parmi les espèces les plus euryhalines. Chervinski et Hering rapportent en 1973 que les *O. mossambicus* survivent, grandissent et se reproduisent en eau de mer. *S. melanotheron* lui, prospère dans les lagunes côtières d'Afrique de l'Ouest où les variations de salinité peuvent être considérables, passant de 0 ‰ après de fortes pluies à 35 ‰, et même dans certaines régions extrêmes à plus de 110 ‰ lors de sécheresses pendant lesquelles l'évaporation est importante (Pauley, 1976).

Bien que supportant tous deux de vivre dans des eaux contenant plus de 110g de sel par litre lors d'un transfert progressif, on observe pourtant des différences entre *O. mossambicus* et *S. melanotheron* lors de transferts directs. En effet, nos deux populations de *S. melanotheron* tolèrent très bien un passage direct de l'eau douce à l'eau de mer (35 ‰) alors que ce transfert s'avère fatal aux *O. mossambicus*. Ceci peut être expliqué par une mise en place plus rapide des mécanismes d'osmorégulation chez *S. melanotheron*. La nature a dû, au cours des siècles, sélectionner les individus les plus adaptés à survivre aux changements de salinité brutaux qui s'opèrent dans l'habitat naturel de ces poissons.

Aucune des deux espèces n'a pu survivre à un transfert direct à 70 ‰ (deux fois la concentration de l'eau de mer). Le changement est trop brutal et trop important pour que les mécanismes de régulation soient mis en place à temps afin de permettre la survie des poissons. Des changements de cette ampleur et aussi brutaux sont de toutes manières peu probables en conditions naturelles.

Des différences ont aussi été relevées entre les deux populations de *S. melanotheron*. Lors du passage direct eau douce - eau salée à 70 ‰, les individus de la population originaire de Saint Louis sont morts deux heures avant ceux de la population venant du Saloum. Bien qu'étant de la même espèce, ces deux populations n'ont pas semblé t'il pas conservé les mêmes capacités d'adaptation à la salinité. Là encore, les différences peuvent être expliquées par la sélection qui s'est opérée en relation avec les contraintes s'exerçant dans le milieu de vie naturel des individus.

4.2 ACTIVITE Na^+/K^+ ATPASIQUE

La pompe à sodium joue un rôle central dans l'excrétion des ions monovalents en eau salée, son activité sert d'indicateur fiable en ce qui concerne l'adaptabilité à l'eau salée chez de nombreuses espèces de poissons (Mc Cormick, 1995). L'augmentation de l'activité Na^+/K^+ ATPasique et la capacité des poissons à tolérer un environnement hyper osmotique sont corrélées, non seulement chez les saumons (Bœuf, 1993) mais aussi chez le tilapia (Kültz *et al.*, 1992).

L'activité enzymatique obtenue au cours de cette étude, 0,64 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure pour les poissons transférés en eau douce et 1,9 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure pour les poissons élevés en eau de mer, est légèrement inférieure aux valeurs relevées lors d'études précédentes où l'activité de la pompe à sodium est environ égale à 1 $\mu\text{mole ADP/mg}$ de protéine/heure pour les poissons élevés en eau douce et de l'ordre de 2 à 3 $\mu\text{moles ADP/mg}$ de protéine/heure pour les poissons en eau salée). Ceci peut s'expliquer par le fait que les échantillons utilisés lors d'une analyse précédente avaient été

homogénéisés et décongelés une première fois. L'activité se mettant à décroître immédiatement après homogénéisation des tissus dans le SEID, il est normal que les valeurs relevées soient légèrement inférieures aux valeurs attendues.

L'activité enzymatique obtenue dans cette étude augmente de manière remarquable avec la salinité (l'activité de la pompe à sodium chez les poissons en eau de mer est significativement supérieure à celle relevée pour les poissons transférés en eau douce), ce qui est en accord avec les études précédentes (Dange, 1985). Ceci peut être expliqué par le fait qu'en eau salée les poissons vont devoir faire face à une augmentation de la concentration plasmatique en ions sodium, ions qui pénètrent la cellule par diffusion ; l'activité de la Na^+/K^+ ATPase va donc être revue à la hausse pour éliminer le Na^+ et maintenir constant le milieu intérieur.

Lors du passage de l'eau douce à l'eau salée à 22 ‰, il faut attendre 24 à 48 heures pour voir un changement dans l'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale. Il en est de même lors du transfert de l'eau de mer vers l'eau douce. Ce laps de temps est nécessaire au recrutement de nouvelles cellules à chlorures, à la croissance des cellules à chlorures existantes ainsi qu'aux modifications dans l'ultrastructure des cellules (Kültz et Jürss, 1993 ; McCormick, 2002).

Les hormones qui peuvent être impliquées dans les changements branchiaux permettant l'adaptation des tilapias à des eaux salées sont primordialement la GH, le cortisol et l'IGF-I. En effet, des études précédentes ont montré que les saumons traités par des implants de GH pendant 7 à 14 jours présentent une forte activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale (McCormick, 1996). Dans cette même étude une combinaison des traitements GH et cortisol a induit une augmentation de l'activité de la pompe à sodium. Le même phénomène a été démontré chez le tilapia *O. mossambicus* après un traitement *in vitro* par le cortisol. L'augmentation de l'activité ATPasique est, dans le cas du tilapia, associée à une augmentation de la taille des cellules à chlorures ainsi qu'au nombre de ces cellules (McCormick, 1990). Dans notre travail l'augmentation d'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale est probablement due à une élévation du nombre de cellules à chlorure branchiales. Ces modifications dans les cellules à chlorures ne sont pas instantanées et nécessitent au minimum 24 à 48 heures pour se mettre en place. Il reste à déterminer si ces changements sont dus ou non à des augmentations des taux de cortisol. En effet un traitement au cortisol administré à des *O. mossambicus* en eau douce a augmenté le nombre de cellules à chlorures ainsi que la densité des pompes Na^+/K^+ ATPase dans les branchies lors d'études précédentes (Dang *et al.*, 2000).

CONCLUSION

En conclusion, cette étude confirme la grande capacité d'adaptation des tilapias aux conditions de salinité du milieu et plus particulièrement des deux populations de *S. melanotheron* originaires du Sénégal, qui, contrairement au tilapia *O. mossambicus* supportent un transfert direct de l'eau douce à l'eau de mer.

En eau salée, quelques transporteurs au niveau des branchies sont impliqués dans la sécrétion active de sels (qui pénètrent par diffusion) permettant au poisson de garder un milieu interne constant. Parmi eux, la Na^+/K^+ ATPase branchiale est considérée comme le transporteur majeur en eau salée. L'activité ATPasique des *O. mossambicus* a été mesurée. La encore cette étude confirme la corrélation entre l'activité de la Na^+/K^+ ATPase et la concentration en sels du milieu. Plus le milieu est riche en sels, plus l'activité de la pompe va être importante, jusqu'à atteindre 2 $\mu\text{moles/mg}$ de protéine/heure en eau de mer alors qu'elle n'était que de 0,6 en eau douce.

Les changements dans l'activité de la pompe lors d'un transfert ne sont pas immédiats. Il faut attendre 48 heures pour que l'accroissement de l'activité soit visible lors d'un passage à l'eau de mer et le même temps pour noter une diminution de cette activité lors d'un passage eau de mer – eau douce. Ce laps de temps est nécessaire au recrutement, au grossissement des cellules à chlorures à chlorures ainsi qu'aux modifications structurales que vont subir ces cellules.

Cette étude s'est heurtée à de nombreux problèmes aussi bien en ce qui concerne les échantillons des deux populations de *S. melanotheron* qui sont arrivés décongelés sur leur lieu d'analyse, que les échantillons des *O. mossambicus*, qui n'ont pas pu être analysés dans leur totalité. Nous proposons donc de reconduire l'expérience afin de vérifier si un marqueur de tolérance à la salinité peut être validé et ainsi faciliter les recherches d'espèces d'intérêt aquacole capables d'être élevées en milieu saumâtre, voire salé.

BIBLIOGRAPHIE

- Ayson F., Kaneko T., Tagawa M., Hasegawa S., Grau E., Nishioka R., King D., Bern H., Hirano T., 1993. Effects of acclimatation to hypertonic environment on plasma and pituitary levels of two prolactins and growth hormone in two species of tilapia, *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology* 89, 138-148.
- Baerends G.P., Baerends Van Roon, 1950. An introduction to the study of ethiology of cichlid fishes. *Behaviour*. (supp) 1, 1-243.
- Baroiller, J.F., Desprez, D., Carteret, Y., Tacon, P., Hoareau, M.C., M elard, C., and Jalabert, B., 1997. Influence of environmental and social factors on the reproductive efficiency in three tilapia species, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* and the red tilapia (Red Florida strain). In K. Fitzsimmons (eds.), *Proceedings of the fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 9-12 November 1997, Orlando, Florida. U.S.A., pp. 238-252.
- Bentley P.J., 1998. *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Boeuf G., 1993. Salmonid smolting : a preadaptation to oceanic environment. In *Fish Ecophysiology*, Ed By Rankin J.C., Jensen F.B., Chapman & Hall, London. 105-135.
- Borski R.J., Hansen M.V., Nishioka R.S., Grau E.G., 1992. Differential processing of the two prolactins of the tilapia (*O. mossambicus*) in relation to environmental salinity. *Journal of Experimental Zoology* 264, 46-54.
- Brown P., 1992. Gill chloride cell surface area is greater in FW-adapted adult sea trout than those adapted to SW. *J. Fish Biol.* 40, 481-484.
- Burden C.E., 1956. The failure of hypophysectomized *Fundulus heteroclitus* to survive fresh water. *Biol. Bull.* 110, 8-28.
- Dange A.D., 1985. Branchial Na^+/K^+ ATPase activity during osmotic adjustments in two FW euryhaline teleosts, tilapia (*Sarotherodon mossambicus*) and orange chromid (*Etroplus maculatus*) *Mar. Biol.* 102B : 293-301.
- Evans, D.H., 1979. Fish. In Maloyi, G.M.O (Eds.), *Comparative Physiology of Osmoregulation in Animals*, Vol. 1. Academic Press, London, PP. 305-390.
- FAO (1999a) *Aquaculture Production Statistics*, FAO fisheries circular 815, Rev 11- 203.
- Fujita M., Yamamoto T., 1984. Selective demonstration by tannic acid of a special cytoplasmic tubular system in the chloride cells of the teleost gills. *Archivum Histologicum Japonicum* 47 (1), 113-118.
- Karnaky K.J., 1986. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. *Amer. Zool.* 26, 209-224.
- Legendre, M., Ecoutin, J.M., 1989. Suitability of brackish water tilapia species from the Ivory Coast for lagoon aquaculture. 1 – Reproduction. *Aquat. Living Resour.* 2, 71-79.

- Legendre, M., Hem, S., Cissé, A., 1989. Suitability of brackish water tilapia species from the Ivory Coast for lagoon aquaculture. 2 – Growth and rearing methods. *Aquat. Living Resour.* 2, 81-89.
- Lemarié, G., Baroiller, J.F., Clota, F., Lazard, J., and Dosdat, A. 2004. A simple test to estimate the salinity tolerance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. *Aquaculture*, 240: 575-587.
- Lowe-McConnel R.H., 1959. Breeding behaviour patterns and ecological differences between *Tilapia* species and their significance for evolution within the genus *tilapia*. *Proc. Zool. Soc. London* 132.
- Lowe-McConnel R.H., 1982. Tilapias in fish communities. In *The Biology and Culture of tilapias*. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manita 83-113.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Midelfart, A., Hamilton, F.W. 1995. Low conductance anion channel activated by cAMP in teleost Cl⁻ secretion cells. *Am. J. Physiol.*, 268: R963-R969.
- Mc Cormick S., 1993. Methods for non lethal gill biopsy and measurement of Na⁺/K⁺ ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 50, 656-658.
- Mc Cormick S., 1995. Hormonal control of gill Na⁺/K⁺ ATPase and chloride cell function. In *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*, Ed by Wood C.M., Shuttleworth T.J., Academic Press, New york 285-315.
- Mc Cormick S., 2002. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zoologist* 41, 781-794.
- Perry S. F., Laurent L. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function, In: *Fish Ecophysiology*, (pp. 231-264), Eds. J.C. Rankin and F. B. Jansen, Chapman & Hall, London..
- Perry S.F., 1997. The chloride cell structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- Pickford G.E., Phillips J.G., 1959. Prolactin, a factor in prooting survival of hypophysectomized Killifish in freshwater. *Science* 130, 454-455.
- Pisam, M., Rambourg, P. 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *International Review of Cytology*, 130: 191-232.
- Regan C.T., 1920. The classification of the fishes of the family Cichlidae. I. The Tanganyikan genera. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 9(5), 33-53.
- Seidelin M., Madsen M.M., Byrialsen A., Kristiansen K., 1999. Effects of insuline-like growth factor-I and cortisol on Na⁺/K⁺ ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 331-342.
- Silva P., Solomon R., Spokes K., Epstein F., 1977. Ouabain inhibitor of gill Na⁺/K⁺ ATPase activity relationship to active chloride transport. *J. Exp. Zool.* 199, 419-426.
- Specker J., King D., Nishioka R., Shirahata K., Yamaguchi K. Bern H., 1995. Isolation and partial characterization of a pair of prolactins released in vitro by the pituitary of a cichlid fish, *O. mossambicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 82, 7490-7494.

- Specker J.L., Kishida M., Huang L., King D.S., Nagahama Y., Veda H., Anderson T.R., 1993. Immunocytochemical and immunogold localization of two Prolactin isoforms in the same pituitary cells and in the same granules in the tilapia (*O. mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology* 89, 28-38.
- Trewavas E., 1982. Generic groupings of tilapiini used in aquaculture. *Aquaculture* 27: 79-81.
- Trewavas E., 1983. Tilapiine fishes of genera *Sarotherodon melanotheron*, *Oreochromis* and *Darakilia*. British Museum (Natural History). London 583.
- Wendelaar Bonga S.E., L.C.A. Van der Meij. 1981. Effects of ambient osmolarity and calcium on prolactin cell activity and osmotic water permeability of the gills of the teleost *Sarotherodon mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol*, 43: 432-442.
- Wendelaar Bonga S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 51-625.
- Yada, T. and Hirano, T. (1991) Influence of seawater adaptation on prolactin and growth hormone release from organ-cultured pituitary of rainbow trout. *Zool. Sci.* 9:143-148.