Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio*)

Pierre Roubaud, Christian Gillet, Roland Billard

► To cite this version:

Pierre Roubaud, Christian Gillet, Roland Billard. Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio*). Canadian Journal of Zoology, 1984, 62 (5), pp.851-861. 10.1139/z84-125 . hal-02728586

HAL Id: hal-02728586

<https://hal.inrae.fr/hal-02728586>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike| 4.0 International License

Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio*)

P. ROUBAUD

Station centrale de physiologie animale, Groupe poissons, Institut national de la recherche agronomique,
F 78350 Jouy en Josas, et Université Paris VII, Equipe de biologie du développement, Paris, France

ET

CH. GILLET ET R. BILLARD

Station centrale de physiologie animale, Groupe poissons, Institut national de la recherche agronomique,
F 78350 Jouy en Josas, France

Reçu le 5 juillet 1983

ROUBAUD, P., CH. GILLET et R. BILLARD. 1984. Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio*). Can. J. Zool. **62**: 851–861.

Les effets du pH dans le milieu pendant la fécondation de l'oeuf de carpe sont étudiés en mesurant le pourcentage de survie embryonnaire avant éclosion. Ces effets, qui peuvent être différés au delà de l'épiboly, sont les mêmes pour des durées de traitement de 15 et 30 min à partir de l'insémination et ne sont modifiés ni par une adjonction au milieu de solution saline physiologique, ni par une exposition des ovules pendant 10 s avant l'insémination. Parmi les six espèces d'agent tampon utilisées, les phosphates manifestent une toxicité particulière qui traduit peut-être le rôle joué par le calcium lors de la fécondation. Une fécondation normale exige une osmolarité du milieu inférieure ou égale à 200 mosmol/kg. Au delà des limites 7,2 et 9,6 de l'intervalle de pH favorable, la tolérance de l'oeuf décroît moins vite dans un milieu faiblement tamponné que dans un milieu fortement tamponné. Dans un tel milieu, elle s'annule aux pH 6,2 ou 9,9.

ROUBAUD, P., CH. GILLET, and R. BILLARD. 1984. Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio*). Can. J. Zool. **62**: 851–861.

The effects of environmental pH during fertilization in carp eggs were studied by measuring the percentage of prehatching embryonic survival. These effects, which may be delayed beyond epiboly, were the same when the treatments lasted 15 and 30 min after insemination, and they were not modified either by the addition of a physiological salt solution to the medium or by exposure of the eggs for 10 s before insemination. Among the six types of buffer used, phosphate buffers were particularly toxic which may indicate the role played by calcium during fertilization. Normal fertilization requires that the osmolarity of the medium be lower than or equal to 200 mosmol/kg. Beyond the limits of favorable pH values (7.2 and 9.6), egg tolerance decreased less rapidly in a weakly buffered medium than in a strongly buffered one. In such a medium, there was no resistance at pH 6.2 or 9.9.

Introduction

La détermination des conditions optimales et des conditions limites de survie et de développement pour les stades gamétiques et embryonnaires précoces des poissons d'eau douce présente un intérêt à la fois fondamental et appliqué.

En pisciculture, le facteur déterminant de la réussite ou de l'échec se trouve, non dans la qualité moyenne du milieu offert aux animaux, mais dans l'amplitude et le moment des écarts extrêmes, souvent accidentels, qui leur sont imposés. Cette remarque vaut aussi pour les poissons vivant dans le milieu naturel et soumis aux écarts naturels des paramètres physico-chimiques et biologiques de l'environnement et à des pollutions artificielles de plus en plus diverses. De ce point de vue, pensons nous, et plus encore qu'en pisciculture, les phases gamétiques et le début du développement embryonnaire précoce sont les plus importants à connaître parce qu'ils apparaissent souvent comme plus sensibles que les autres phases du cycle vital (McKim 1977; Jaoul et Roubaud 1982; Gillet et Roubaud 1983; Billard et Roubaud 1984). C'est ainsi qu'ont été mis en évidence pour plusieurs espèces d'importants changements de la tolérance aux bas pH au cours de l'ontogénèse. La fragilité particulière des embryons et alevins de *Salmo salar* permet par exemple d'expliquer leur absence dans les rivières où les adultes sont encore présents (McKim 1977). Dans cette même espèce, la sensibilité aux bas pH (s) peut être classée suivant les stades du développement embryonnaire (Daye et Garside 1977, 1979): s (jeune alevin) $>$ s (embryon en segmentation) $>$ s (embryon oeillé). De même, pour l'oeuf de *Salmo trutta*: s

(embryon en segmentation) $>$ s (embryon oeillé) et s (jeune alevin) $>$ s (embryon oeillé) (Brown et Lynan 1981). Pour l'espèce *Jordanella floridae*: s (ovogénèse) $>$ s (alevin) $>$ s (embryon pré-éclos) (Craig et Baksi 1977). Cependant l'interprétation de Craig et Baksi (1977), estimant que la grande résistance aux pH acides s'étend sur la totalité du développement embryonnaire précoce, est critiquée par Lee et Gerking (1980) qui montrent, sur *Cyprinodon n. nevadensis*, que l'on doit distinguer dans l'embryogénèse précoce une période de sensibilité particulière au moment de l'activation. De même, l'embryon de *Perca fluviatilis* est particulièrement sensible aux eaux acides avant l'âge de 24 h (Johanson et Milbrink 1976). Les recherches effectuées en vue de réaliser, pour *Salmo irideus*, un dilueur d'insémination artificielle (DIA) ont montré que l'optimum de pH se situe au voisinage de pH 9. En dessous du pH 7, les pourcentages de fécondation sont plus faibles (Petit et al. 1973). De même, sur le brochet (*Esox lucius*), le DIA le plus favorable a un pH 9 (Marcel 1981). Ces résultats tendent à orienter la recherche des périodes critiques de sensibilité au facteur de pH vers la fécondation et les tout débuts du développement embryonnaire, stades pour lesquels les données manquent quant à l'acidorésistance.

Nous avons entrepris l'étude de l'acidotolérance et de alcalinotolérance de l'oeuf de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.), espèce d'intérêt économique de large distribution géographique et qui présente des avantages importants pour les études d'embryologie expérimentale (Jaoul et Roubaud 1982): nombre d'oeufs pondus, facilité de l'incubation, transparence

de la coque et possibilité d'obtenir simplement des oeufs pendant toute l'année.

Matériels et méthodes: modèle biologique

L'expérimentation a consisté à réaliser la fécondation dans des milieux simples à base de NaCl ou enrichis en divers ions minéraux et tamponnés dans une large gamme de pH (4,75–10,6). Après fécondation, les oeufs sont laissés pendant 30 min (15 min dans l'expérience 2B) dans ces mêmes milieux, c'est-à-dire approximativement jusqu'au moment de la fusion des pronucleus mâle et femelle. Les effets du traitement sont appréciés par la mesure des pourcentages de survie à divers stades du développement embryonnaire: stade du bourgeon caudal, stade oeillé, stade de pré-éclosion.

Production des gamètes

Les reproducteurs, carpes de variété miroir, sont élevés sous photopériode et thermopériode naturelles, dans une eau recyclée dont les propriétés thermiques et physicochimiques sont contrôlées. Les femelles âgées de 6 à 7 ans effectuent leur 3^e ou 4^e cycle reproducteur. L'hypophysation est pratiquée avec 3 mg/kg de poids vif d'extraits hypophysaires bruts de carpe (Stoller Fisheries, activité équivalente à 63 µg d'hormone gonadotrope selon le dosage réalisé par la technique de maturation ovocytaire *in vitro* de l'ovocyte de truite (Jalabert et al. 1974)), en novembre et décembre 1980 (expériences 2, 3A et 3B), en janvier, juillet et août 1981 (expériences 1A, 4 et 5), en mars 1982 (expériences 1B et 6) et en décembre 1982 pour l'expérience 7. Lorsque la température d'élevage est inférieure à 15°C, les femelles sont placées 15 jours avant l'hypophysation à la température de 20°C. Les ovules de chaque femelle sont récoltés séparément par pression abdominale et rapidement fécondés par un mélange de sperme provenant de trois mâles placés au préalable pendant quelques jours en eau à 20°C et recevant une injection de 1 mg/kg de poids corporel du même extrait hypophysaire que celui utilisé pour les femelles.

Insemination

Dans toutes les expériences (sauf l'expérience 4, série A1), les ovules, prélevés par lots d'environ 200 à l'aide d'une spatule sèche, sont dispersés simultanément avec 100 µL de sperme déposé à la microseringue (Eppendorf), dans une boîte de Petri contenant 20 mL de DIA équilibré à la température de 20°C. Dans l'expérience 4, série A1, les ovules sont dispersés dans le DIA 10 s exactement avant l'introduction de la goutte de sperme qui est alors dispersée par agitation pendant 15 s.

Dans les secondes qui suivent leur introduction dans le DIA (sauf aux pH les plus alcalins, ou lorsque l'osmolarité du DIA dépasse 300 mosmol), les oeufs se collent sur le fond de la boîte de Petri; on évite par agitation, qu'ils ne s'agglutinent, ce qui limiterait leur oxygénation au cours de l'incubation. A partir de la 15^e min dans l'expérience 2A et à partir de la 30^e min dans toutes les autres expériences, les oeufs sont rincés trois fois en 0,25 h avec de l'eau du robinet de température à 20°C.

Incubation

Les oeufs sont incubés à la température de 20°C. Dans les expériences 2 et 3, les oeufs sont placés sous une couche d'eau du robinet de 5 mm d'épaisseur renouvelée toutes les 12 h. Dans les expériences 1A, 1B, 4, 5, 6 et 7, l'incubation a lieu simplement à l'air humide.

Mesure des mortalités

L'effet des traitements est évalué par le pourcentage des oeufs vivants: le critère de reconnaissance d'un oeuf mort est l'opacité de son vitellus. Sauf dans l'expérience 3B, où les comptages sont effectués aux âges de 30 et 48 h, les pourcentages de survie sont mesurés dans l'intervalle 68–72 h, c'est-à-dire, pour un développement normal, peu avant le début de l'éclosion.

Protocoles expérimentaux, composition des milieux d'insémination artificielle

Pour la réalisation des dilueurs d'insémination, on a considéré le pH, l'osmolarité, le pouvoir tampon, la toxicité éventuelle des espèces

chimiques utilisées comme agent tampon de pH, et la concentration en ions minéraux fondamentaux (Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Ces différents paramètres ne sont pas indépendants, en particulier on ne peut obtenir un pouvoir tampon élevé sans augmenter l'osmolarité du dilueur. Les DIA ont été préparés à partir de solutions mères molaires de trois bases et trois acides. Les trois bases sont 4,3-aminopropylmorpholine (APM) (solution M), l'éthylène diamine (EDA) (solution E) et le Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) (solution T); les trois acides sont l'acide acétique (solution A), l'acide phosphorique (solution P) et la glycine (solution G).

Ces espèces chimiques admettent comme pK d'ionisation dans l'eau les valeurs respectives suivantes (Von Rauen 1964): APM, 10,2 et 6,2; EDA, 9,9 et 6,8; Tris, 8,2; l'acide acétique, 4,75; l'acide phosphorique, 7,2; la glycine, 9,6. Les solutions mères, traitées par l'acide chlorhydrique normal ou la soude normale pour ajuster leur pH à la valeur voulue, ont été diluées soit par l'eau bidistillée (expériences 1A et 3), soit par une eau du robinet (expériences 1B, 2, 4, 5, 6 et 7) analysée sommairement: pH 7,1, oxygène à saturation, 150 mg/L CO_3Ca et traces de NH_4^+ , NO_3^- et phosphates. Dans les expériences 1 et 3, un complément d'ions minéraux a été apporté par adjonction d'une solution saline, physiologiquement équilibrée (solution H), développant une osmolarité de 1 osmol/kg et contenant, pour 1 L de solution: NaCl, 28,3 g; KCl, 0,5 g; CaCl_2 , 1,1 g. Les pH ont été contrôlés avec un appareil Metrohm Merisau E 532 et les osmolarités mesurées par abaissement du point de congélation avec un appareil Vogel 6306.

Expérience 1. Influence de l'osmolarité du DIA sur la survie embryonnaire avant éclosion

Dans une première série de tests (expérience 1A), des solutions tamponnées développant des osmolarités de 5, 50, 149, 200, 247, 345 et 493 mosmol/kg au moment de l'emploi ont été obtenues en diluant à 1 L par de l'eau bidistillée respectivement 5, 50, 150, 200, 250, 350 et 500 mL de solution H.

Dans une deuxième série de tests (expérience 1B), des solutions tamponnées ont été préparées en diluant par l'eau du robinet la solution mère T portée au pH 8,2 par une solution molaire de HCl, jusqu'à l'obtention d'une osmolarité finale de 100 mosmol/kg. A cette solution, la quantité nécessaire de glycérol ou de NaCl ou de chlorure de choline a été ajoutée pour obtenir des osmolarités finales de 150, 200, 250, 300, 350 et 400 mosmol/kg.

Expérience 2 (tableau 1). Détermination de l'intervalle de pH favorable, (IpH-F), avec les ions phosphate, Tris et glycine, en présence de sels minéraux. Effets de la dilution du DIA. Comparaison de deux durées de traitement

Sept valeurs de pH ont été essayées: 6,2 et 7,2 avec l'ion phosphate, 7,2, 8,2 et 9,2 avec l'ion Tris et 8,6 et 10,6 avec l'ion glycine. Pour chacun de ces ions et chacune de ces valeurs de pH, des solutions diluées au 1:3 (solutions P_b, T_b et G_b) et des solutions diluées au 1:7,5 (solutions P_c, T_c et G_c) ont été préparées à partir de solutions concentrées d'osmolarité 150 mosmol/kg (solutions P_a, T_a et G_a). Ces solutions concentrées contiennent respectivement, pour 1 L, 37,5 mL de solution mère P ou 50 mL de solution mère, T ou G; elles ont été complétées par la quantité nécessaire de solution saline H pour arriver à l'osmolarité de 150 mosmol/kg.

Le protocole expérimental a comporté la comparaison des effets sur la survie à l'éclosion de deux durées de traitement à partir de l'insémination: 15 et 30 min.

Expérience 3 (tableau 2). Action des DIA concentrés non minéralisés. Evolution de la survie au cours de l'embryogénèse

Les ions phosphate, Tris et glycine, ont été testés pour les mêmes valeurs du pH que dans l'expérience 2. En outre, dans l'expérience 3B, l'ion acétate a permis d'essayer des pH plus bas: pH 5 et 6. Les concentrations en espèce tampon étaient comparables à celles de l'expérience 2 (série A), mais, en l'absence d'apport minéral, les osmolarités étaient plus faibles et de valeurs inégales. Les pourcentages de survie ont été mesurés à l'éclosion dans l'expérience 3A, et aux stades de "bourgeon caudal" (âge 30 h) et "oeillé" (âge 48 h), dans l'expérience 3B.

TABLEAU 1. Composition des milieux d'insémination artificielle (expérience 2)

Nature de l'espèce tampon, et désignation de la solution mère et de la série de dilution	pH au moment de l'emploi	pH en fin de traitement	Concentration en espèce chimique tampon ([C]) (mosmol/kg)	Concentration en solution saline (H) (mL/L)	Osmolarité (mosmol/kg)
P _a	6,20	6,30	37,5	75	155
P _b	6,20	6,39	12,5	25	54
P _c	6,20	6,46	5,0	10	21
P _a	7,20	7,18	37,5	56	151
P _b	7,20	7,18	12,5	18,6	53
P _c	7,20	7,16	5,0	57,7	20
T _a	7,20	7,17	50,0	55	150
T _b	7,20	7,02	16,6	18,3	50
T _c	7,20	6,90	6,66	7,3	22
T _a	8,20	8,05	50	75	150
T _b	8,20	7,88	16,6	25	50
T _c	8,20	7,60	6,66	10	22
T _a	9,20	8,78	50	95	154
T _b	9,20	8,49	16,6	31,6	54
T _c	9,20	8,15	6,66	12,6	21
G _a	8,60	7,69	50	95	155
G _b	8,60	7,18	16,6	31,6	52
G _c	8,60	7,17	6,66	12,6	21
G _a	10,60	9,1	50	55	151
G _b	10,60	8,82	16,6	18,3	53
G _c	10,60	8,27	6,66	7,3	20

TABLEAU 2. Composition des milieux d'insémination artificielle (expérience 3)

Nature de l'espèce tampon et désignation de la solution mère	pH au moment de l'emploi	Concentration en espèce chimique tampon ([C]) (mosmol/kg)	Osmolarité (mosmol/kg)
P	6,2	45	95
P	7,2	45	110
T	7,2	50	86
T	8,2	50	67
T	9,2	50	61
G	8,6	50	61
G	9,6	50	74
G	10,6	50	94
A	5,0	50	80
A	6,0	50	95

Expérience 4 (tableau 3). Exposition simultanée des ovules et du sperme ou exposition des ovules 10 s avant l'insémination; détermination de l'IpH-F à deux concentrations du DIA avec apport minéral limite

Neuf valeurs de pH ont été testées, utilisant les ions acétate aux pH 4,75 et 5,75, phosphate aux pH 6,2, 7,2 et 8,2, Tris aux pH 7,2, 8,2 et 9,2 et glycine aux pH 8,6, 9,6 et 10,6.

Dans une première série d'essais (série A), les concentrations choisies en espèce tampon étaient égales (pour l'acide phosphorique) ou supérieures (pour le Tris et la glycine) à celles utilisées dans l'expérience 2, série A. Cependant, un apport moins important de solution saline H conduisait à une osmolarité plus faible. Avec l'acide acétique, une concentration très élevée en espèce tampon (100 mM) était employée pour obtenir, au pH 5,75 relativement éloigné du pK d'ionisation, un pouvoir tampon encore important.

Dans une deuxième série d'essais (série B), les effets d'une dilution au 1:5 des DIA utilisés dans la série A ont été étudiés.

Enfin, avec les DIA concentrés de la série A, les effets sur la survie à l'éclosion d'une exposition des ovules de 10 s préalablement à l'insémination dans le DIA (série A1) ont été comparés à ceux produits par une introduction simultanée de gamètes mâle et femelle (série A2).

Expérience 5 (tableau 3). Détermination de l'IpH-F sur les ovules séparés de deux femelles. Essais de l'EDA comme tampon

Outre les cinq valeurs de pH testées avec les mêmes DIA que dans l'expérience précédente, l'utilisation de l'EDA a permis d'étudier les valeurs 5,8, 6,8 et 7,8 du côté acide et 8,9, 9,9 et 10,9 du côté alcalin. Pour ces trois premières valeurs mettant en jeu la deuxième charge d'ionisation de l'EDA, les concentrations ([C]) étaient 50 mM, ce qui permettait une comparaison avec les concentrations utilisées pour le Tris et la glycine dans l'expérience 2 (série A). Pour les trois valeurs alcalines d'utilisation de l'EDA, mettant en jeu seulement sa première charge d'ionisation, les concentrations ([C] = 75 mM) étaient celles choisies pour le Tris et la glycine dans l'expérience 5. Par un apport salin comparable à celui utilisé dans l'expérience 2 (série A), l'osmolarité était ajustée au voisinage de 150 mosmol/kg.

Le protocole expérimental a permis la comparaison de la résistance des ovules produits séparément par deux femelles après fécondation avec le même mélange des spermatozoïdes produits par trois mâles.

Expérience 6 (tableau 4). Etude de la tolérance de l'oeuf aux bornes de l'IpH-F

A côté des DIA contenant des ions glycine, Tris et EDA, des DIA à l'APM ont été testés. Six valeurs de pH ont été ainsi essayées, chacune d'entre elles correspondant au pK d'ionisation d'une espèce tampon, c'est-à-dire au pH assurant un pouvoir tampon maximum de l'agent utilisé: 9,9 et 6,8 pour l'EDA, 10,2 et 6,2 pour l'APM, 8,2 pour le Tris et 9,6 pour la glycine. De façon à obtenir un pouvoir tampon maximum sans dépasser la valeur limite de 200 mosmol/kg pour l'osmolarité, les solutions ont été calculées de façon à développer sans adjonction saline minérale, une osmolarité de 150 mosmol/kg. Les concentrations en espèce tampon étaient donc 100 mM/kg pour les DIA ne mettant en jeu qu'une seule charge d'ionisation (APM au

TABLEAU 3. Composition des milieux d'insémination artificielle (expériences 4 et 5)

Nature de l'espèce tampon, et désignation de la solution mère et de la série de dilution	pH au moment de l'emploi	pH en fin de traitement		Concentration en espèce chimique tampon ([C]) (mosmol/kg)	Concentration en solution saline (H) (mL/L)	Osmolarité (mosmol/kg)
		Expérience ^a 4	Expérience ^a 5A			
P _a	6,2	6,12	6,10	37,5	50	136
P _b	6,2	6,15		7,5	10	
P _a	7,2	7,03	7,09	37,5	25	116
P _b	7,2	7,06		7,5	5	
P _a	8,2	8,06	8,10	37,5	25	134
P _b	8,2	8,00		7,5	5	
T _a	7,2	7,00	7,11	75	1	143
T _b	7,2	7,06		15	0,2	
T _a	8,2	8,01	7,98	75	5	118
T _b	8,2	7,76		15	1	
T _a	9,2	9,05	8,90	75	50	132
T _b	9,2	8,73		15	10	
G _a	8,6	8,42	8,41	75	50	125
G _b	8,6	8,19		15	10	
G _a	9,6	9,48	9,53	75	5	123
G _b	9,6	9,13		15	1	
G _a	10,6	10,20		75	1	122
G _b	10,6	9,90		15	0,2	
A _a	4,75	4,44	4,44	100	5	166
A _b	4,75	4,27		20	1	
E5,8				50	5	148
E6,8				50	25	158
E7,8				50	50	155
E8,9				75	5	155
E9,9				75	25	156
E10,9				75	50	147

TABLEAU 4. Composition des milieux d'insémination artificielle (expérience 6)

Nature de l'espèce tampon et désignation de la solution mère	pH au moment de l'emploi	Concentration en espèce chimique tampon ([C]) (mosmol/kg)	Osmolarité (mosmol/kg)
M-NaOH	10,4		
M	10,2	100	150
G-M	10		
E	9,9	100	150
G-M	10		
G	9,6	100	150
T	8,2	100	150
E-HCl	7,0		
E	6,8	60	150
M-E	6,8		
M-E	6,5		
M	6,2	60	150

pH 10,2, EDA au pH 9,9, glycine au pH 9,5 et Tris au pH 8,2) et 60 mM/kg pour les DIA utilisant une deuxième charge ionique (EDA au pH 6,8 et APM au pH 6,2).

A côté de ces solutions utilisant les agents tampon au maximum de leur pouvoir tampon, des solutions de pH intermédiaires ont été préparées, soit en mélangeant deux à deux les solutions définies plus haut, soit en ajustant le pH par des solutions molaires d'HCl ou de NaOH: il s'agit des DIA (notés M-E, tableau 4) préparés avec l'APM et l'EDA aux pH 6,5 et 6,6, du DIA noté E-HCl préparé avec l'EDA et

TABLEAU 5. Composition des milieux d'insémination artificielle (expérience 7)

Nature de l'espèce tampon, et désignation de la solution mère et de la série de dilution	pH au moment de l'emploi	Concentration en espèce chimique tampon ([C]) (mosmol/kg)
A _a	5,0	100
A _b	5,0	33
M _a	6,0	60
M _b	6,0	20
E _a	6,6	20
E _b	6,6	20
E _a	6,9	60
E _b	6,9	20
T _a	8,2	100
T _b	8,2	33

l'acide chlorhydrique, des DIA notés G-M préparés aux pH 9,8 et 10,2 avec la glycine et l'APM, et du DIA noté M-NaOH préparé au pH 10,4 à partir d'APM et de soude.

Expérience 7 (tableau 5). Acidotolérance dans un large volume de DIA à deux niveaux de pouvoir tampon à la limite de l'IpH-F

Comme dans l'expérience 6 des DIA, d'osmolarité 150 mosmol/kg, ont été préparés en plaçant les espèces tampon à des pH voisins de leur pK d'ionisation soit le pH 5 pour l'acide acétique, le pH 6 pour l'APM, les pH 6,6 et 6,9 pour l'EDA et le pH 8,2 pour le Tris. Dans une première série de tests (série A) les concentrations en

FIG. 1. Influence de l'osmolarité du DIA sur la survie embryonnaire avant éclosion (expérience 1). (A) DIA composé de solution minérale non tamponnée (solution H). (B) DIA tamponné au pH 8,2 par du Tris-HCl (100 mosmol/kg) et complété par du NaCl (---), par du chlorure de chlore (— — —), ou par du glycérol (—).

espèce tampon s'élevaient à 100 mM/kg pour le Tris et l'acide acétique, et à 60 mM/kg pour l'EDA et l'APM. A partir des DIA de la série A, les dilueurs de la série B ont été préparés par dilution au 1:3 par de l'eau du robinet.

A la différence des expériences précédentes, les oeufs ont été placés dans un large volume de DIA (200 mL par lot), ce qui a permis de supprimer la dérive de pH au cours d'expérience.

Résultats

Expérience 1 (fig. 1)

Avec une solution saline physiologique de pH non stabilisé (expérience 1A, fig. 1A), comme avec des solutions tamponnées de pH 8,2 (tampon Tris-HCl), et contenant soit du NaCl, soit du glycérol, soit du chlorure de choline (expérience 1B, fig. 1B), un effet négatif sur la survie embryonnaire n'apparaît qu'au dessus d'une osmolarité de 200 mosmol/kg.

Expérience 2 (fig. 2)

Dans un DIA concentré en agent chimique tampon et enrichi en sels minéraux (tableau 1, série 2, fig. 2A), la courbe de survie embryonnaire au moment de l'éclosion présente un maximum en plateau dans la gamme de pH 7,2 et 9,2, gamme qui appartient à ce que nous appelons, l'intervalle de pH favorable (IpH-F). Au delà de cet intervalle, soit pour les pH 6,2 et 10,6, la survie est nulle ou presque nulle. Au pH 7,2, le Tris donne des pourcentages de survie supérieurs à ceux fournis par le tampon phosphate.

Ces résultats restent inchangés, que l'exposition des oeufs à partir de l'insémination dure 30 (fig. 2A) ou 15 min (fig. 2B).

L'influence de la dilution des tampons se manifeste par une atténuation des effets aux pH extrêmes: pH 6,2 et 10,6, ainsi qu'au pH 7,2 avec le tampon phosphate. Le tableau 1 montre que, pendant les 30 min de séjour dans les boîtes de Petri durant la fécondation, le pH du DIA varie. Cette variation est

d'autant plus importante que le DIA est plus dilué et que le pH est au début de l'expérience plus éloigné du pH voisin de 7,2. Les pH semblent alors évoluer vers un pH limite voisin de pH 6,5-6,6.

Expérience 3 (fig. 3)

Dans des DIA concentrés en agent chimique (45 et 50 mM/kg), mais préparés avec de l'eau bidistillée sans apport minéral (fig. 3), les résultats de l'expérience 2 sont pour l'essentiel retrouvés. Dans l'expérience 3B (fig. 3B), la borne supérieure de l'IpH-F est portée du côté alcalin jusqu'au pH 9,6. Au pH 7,2 et pour des comptages effectués au stade oeillé (âge de 48 h), la survie est nulle avec le tampon phosphate et n'est que de 41% avec le tampon Tris. Avec le tampon acétate, cependant, la survie qui est nulle au pH 5, est proche du maximum au pH 6,2.

Entre le stade du bourgeon caudal (âge 30 h) et le stade oeillé (âge 48 h), le pourcentage de survie subit une chute importante au pH 7,2 avec le Tris et le phosphate et au pH 10,6 avec la glycine.

Expérience 4 (fig. 4)

Une exposition préalable des ovules pendant 10 s avant l'insémination (courbe a_1) n'a pas d'effets différents sur la survie à l'éclosion de ceux produits par une exposition simultanée des ovules et du sperme (courbe a_2). Avec des DIA de concentration saline et osmolarité plus faibles que dans l'expérience 2, les effets déjà constatés d'une dilution des DIA sont retrouvés. Avec les tampons à l'acide acétique, les pourcentages de survie à l'éclosion restent nuls aux pH 4,75 et 5,75, même lorsque les concentrations en espèces tampon sont relativement réduites: $[C] = 20 \text{ mM/kg}$. Avec le tampon phosphate concentré, $[C] = 37,5 \text{ mM/kg}$, les pourcentages de survie à l'éclosion sont nuls aux pH 6,2, 7,2 et 8,2 (courbe a) alors qu'une dilution au 1:5

FIG. 2. Survie embryonnaire au moment de l'éclosion en fonction du pH, de la dilution d'un DIA enrichi en sels minéraux et de la durée du traitement (expérience 2). (A et B) Séjour de 30 et 15 min dans le DIA à partir de l'insémination. ●, DIA à l'acide phosphorique; ■, DIA au Tris; ○, DIA à la glycine; —, DIA concentré (série A d'osmolarité 150 mosmol/kg environ); ---, DIA dilué au 1/3 (série B d'osmolarité 50 mosmol/kg environ); ····, DIA dilué au 1/7,5 (série C d'osmolarité 20 mosmol/kg environ).

FIG. 3. Action de DIA concentrés, non minéralisés. Evolution de la survie au début de l'embryogénèse (expérience 3). (A) Résultats de l'expérience 3A. (B) Résultats de l'expérience 3B. □, DIA à l'acide acétique; ●, DIA à l'acide phosphorique; ■, DIA au Tris; ○, DIA à la glycine; —, % de survie à l'éclosion (expérience 3A); ---, % de survie au stade "bourgeon caudal" (âge 30 h, expérience 3B); —, % de survie au stade "oeillé" (âge 48 h, expérience 3B).

atténue les effets au pH 6,2 et les supprime aux pH 7,2 et 8,2. La même influence de la dilution apparaît au pH 9,6 avec le tampon glycine qui, à la concentration $[C] = 75 \text{ mM/kg}$, donne des pourcentages de survie à l'éclosion de 40% (courbes

a_1 et a_2) et à la concentration $[C] = 15 \text{ mM/kg}$, donne un pourcentage de 79%.

Une dérive de pH (tableau 2) au cours du traitement est observée; elle est comparable à celle observée dans l'expé-

FIG. 4. Détermination de l'IpH-F à deux concentrations de DIA. Exposition des ovules avant insémination et exposition simultanée des gamètes au moment de l'insémination (expérience 4, tableau 3). —, DIA concentré; ---, DIA dilué au 1/5; a_1 , exposition des ovules 10 s avant l'introduction du sperme; a_2 , introduction simultanée des ovules et du sperme; □, DIA à l'acide acétique; ●, DIA à l'acide phosphorique; ■, DIA au Tris; ○, DIA à la glycine.

FIG. 5. Détermination de l'IpH-F sur les ovules séparés de deux femelles essais de l'éthylènediamine (EDA) comme agent tampon (expérience 5, tableau 3). —, résultats obtenus avec les ovules de la femelle A; ---, résultats obtenus avec les ovules de la femelle B; □, DIA à l'acide acétique; ●, DIA à l'acide phosphorique; ■, DIA au Tris; ○, DIA à la glycine, △, DIA à l'EDA.

rience 1 (tableau 1), le point d'équilibre étant le pH 6,1, sauf avec l'acide acétique où il semble inférieur à 4.

Expérience 5 (fig. 5)

L'expérience 5 (tableau 3) permet de comparer ces deux femelles différentes, les effets de DIA concentrés et de tester les effets de l'EDA. Les deux femelles présentent des tolérances comparables avec les ions glycine, Tris, phosphate et acétate, mais différentes vis à vis de l'EDA. D'autre part, avec cet ion, l'IpH-F paraît s'étendre du côté acide jusqu'au pH 6,8 et il existe encore des survivants à l'éclosion avec le pH 5,8, tandis qu'un pH de 5,75 est léthal pour tous les oeufs avec l'acide acétique. Les effets de l'ion phosphate sont plus importants aux pH 6,2 et 8,2 qu'au pH 7,2. La borne supérieure de l'IpH-F est située entre le pH 9,6 (tampon à la glycine) et le pH 9,9 (tampon à l'EDA).

Expérience 6 (fig. 6, tableau 4)

Du côté des pH alcalins, la chute des pourcentages de survie des embryons pré-éclos est complète en 0,3 unité de pH, entre les valeurs 9,6 et 9,9. Du côté des pH acides, cette chute de la survie embryonnaire est plus progressive; elle a déjà commencé au pH 7, où l'on ne trouve plus que 59% de survivants (contre 89% au pH 8,2 avec le Tris) et elle n'est pas achevée au pH 6,5 où il reste encore 5% de survivants avec un DIA à l'APM-EDA.

Expérience 7 (fig. 7, tableau 5)

Avec des DIA concentrés et présentant un fort pouvoir tampon, la chute de tolérance est brutale au voisinage de la neutralité puisqu'au pH 6,9, on ne retrouve plus que 35% de survivants à l'éclosion. Cependant, une dilution du DIA au 1:3 atténue cet effet, puisqu'il reste encore 64% de survivants au pH 6,9 et 53% au pH 6, mais la dilution ne semble pas capable de déplacer sensiblement la borne inférieure de l'IpH-F.

FIG. 6. Résistance de l'oeuf aux bornes de l'IpH-F (expérience 6, tableau 4) essai de l'aminopropylmorpholine (APM) comme agent tampon. ▽, DIA à l'APM; ○, DIA à l'APM et à l'EDA; △, DIA à l'EDA; ■, DIA au Tris; ●, DIA à la glycine; ○, DIA à la glycine et à l'APM.

Discussion

Dans toutes nos expériences sur les effets de pH, et particulièrement avec des DIA concentrés, il n'est pas possible de distinguer complètement l'action propre du pH de celle qui résulte d'une toxicité spécifique des molécules et ions utilisés comme agent tampon. En effet, l'action du pH sur les proces-

FIG. 7. Acidorésistance et effet de dilution à la limite de l'IpH-F. —, DIA concentré; ---, DIA dilué au 1/3; □, DIA à l'acide acétique; ▽, DIA à l'APM; △, DIA à l'EDA.

sus complexes qui se succèdent au cours de la fécondation dépend directement de la capacité des agents tampon à diffuser au contact des gamètes et à pénétrer les barrières biologiques que constituent la membrane du spermatozoïde, la coque de l'oeuf, l'espace périvitellin en formation, la membrane plasmique périvitelline et le cytoplasme de l'oeuf en remaniements accélérés.

Durée du traitement

Les expériences 2A et 2B qui comparent les effets d'un séjour de 15 et 30 min dans le DIA indiquent que l'essentiel des effets de pH est déjà obtenu dans les 15 premières minutes du développement. Mais ceci n'indique nullement que l'oeuf soit devenu tolérant après cette période car nous avons observé par ailleurs que la sensibilité à des chocs acides se maintient pendant plusieurs heures après l'insémination.

Dispersion des spermatozoïdes

L'expérience 4, de son côté, montre qu'une exposition des ovules pendant 10 s avant l'insémination, ne suffit pas pour modifier sensiblement leur fécondabilité. Si cette observation permet d'exclure un effet *a priori* possible de légers retards expérimentaux dans l'introduction du sperme sur les ovules, elle n'autorise pas à faire du spermatozoïde libre la cible privilégiée de l'action du pH. Des expériences en cours semblent d'ailleurs nous montrer, avec des DIA concentrés, qu'une exposition des spermatozoïdes pendant quelques dizaines de secondes avant insémination, ne modifie pas sensiblement les profils de tolérance aux effets de pH.

La détermination de l'IpH-F et celle de l'intervalle limite de tolérance (IpH-L) au pH supposent que les effets de l'osmolarité et de la composition minérale des DIA ne puisse interférer avec les effets spécifiques du pH.

Pression osmotique

Les résultats de l'expérience 1 montrent que la concentration

osmotique du DIA ne devient un facteur déterminant pour la survie embryonnaire à l'éclosion, qu'au dessus de la valeur 200 mosmol/kg; ceci démontre que nos expériences sont restées dans le domaine acceptable quant à ce paramètre.

Composition minérale

Les résultats des expériences 3, 4, 6 et 7 montrent aussi que les différentes compositions minérales utilisées pour la fabrication des DIA n'ont pas interféré avec le facteur pH.

Effets spécifiques des agents tampon

La courbe de survie obtenue dans l'expérience 6 donne une idée assez précise de l'effet spécifique du pH sur la fécondation. L'IpH-F s'étend d'un pH légèrement supérieur à la neutralité jusqu'au pH 9,6. Au delà de ces valeurs, la tolérance de l'oeuf de carpe chute brutalement du côté alcalin et plus progressivement du côté acide, déterminant pour l'IpH-L les valeurs pH 6,2–9,9. Ce résultat n'est selon nous contredit qu'en apparence par des observations partielles de plusieurs expériences.

Dans l'expérience 3, on obtient au pH 6 un pourcentage de survie important (77%) avec l'acide acétique comme tampon (fig. 3A). Mais on peut interpréter ce résultat en remarquant qu'à un pH aussi éloigné du pK d'ionisation de l'acide acétique ($pK = 4,75$), le pouvoir tampon de cet agent est négligeable.

Avec l'éthylène diamine, l'expérience 5 donne, au pH 6,8, des pourcentages de survie plus importants que ceux obtenus dans l'expérience 6, bien qu'inégaux suivant la femelle utilisée. Il est possible que la concentration en tampon légèrement différente ($[C] = 50$ mM dans l'expérience 5 et $[C] = 60$ mM dans l'expérience 6; tableau 4) explique ces variations apparentes de la borne acide de l'IpH-F. Il peut exister aussi des différences liées aux caractéristiques des géniteurs. Enfin, une évolution différente du pH du DIA en cours d'expérience peut aussi être invoquée. Par ailleurs, les pourcentages non nuls de survie obtenus au pH 5,75 dans l'expérience 5 peuvent s'expliquer par la faiblesse du pouvoir tampon de l'EDA à ce pH puisque le pK d'ionisation le plus proche est de pH 6,8.

Du côté alcalin, les pourcentages de survie non nuls obtenus au pH 10,6 dans l'expérience 3B, s'expliquent par le caractère différé de l'effet du pH sur la mortalité. Les comptages ont été effectués à 30 et 48 h, c'est-à-dire nettement avant l'éclosion (72 h).

Le pH 9,6 n'est pas toujours inclus dans l'IpH-F (expériences 3A et 4, tampon glycine). Ceci peut s'expliquer si le pH 9,6 représente la borne extrême de l'IpH-F. Par contre, la valeur basse du pourcentage de survie obtenu au pH 8,9 pour la femelle A dans l'expérience 5 ne se retrouve pas pour l'autre femelle (B), ce qui semble indiquer une variabilité interfemelle dans la qualité des ovules et leur tolérance aux pH alcalins lors de la fécondation.

Les résultats obtenus avec l'APM sont cohérents avec ceux fournis par les autres tampons.

Toxicité des ions phosphate

Les DIA contenant de l'acide phosphorique sont toxiques. Au pH 8,2, le pouvoir tampon de l'acide phosphorique est relativement faible (puisque le pK vaut 7,2) et partout, cependant, les pourcentages de survie sont nuls (sauf dans l'expérience 4B dans laquelle la concentration ($[C] = 7,5$ mM) est probablement trop faible pour que l'agent tampon ait un effet notable).

Au pH 6,2, par contre, l'acide phosphorique ne paraît pas

faire exception car le maintien des pourcentages de survie non nuls (bien que faibles) dans les expériences 4 et 5 peut s'expliquer par un pouvoir tampon beaucoup plus faible que celui de l'APM au même pK.

Au pH 7,2 enfin, les pourcentages de survie sont toujours plus faibles avec l'acide phosphorique qu'avec le Tris (expériences 2A, 2B, 3A, 3B, 4, 5A et 5B); cette différence pourrait être due en partie aux différences de pouvoir tampon entre ces deux agents à ce pH (l'acide phosphorique étant à son pK d'ionisation, le Tris à une unité de pH de ce pK). Cependant, l'effet du pouvoir tampon ne peut être invoqué dans l'expérience 5 pour la comparaison de l'acide phosphorique avec l'EDA. Ce dernier agent tampon est utilisé à son pK d'ionisation qui est plus bas que celui de l'acide phosphorique. Or, avec des concentrations de 50 mM, l'EDA au pH 6,8 donne des pourcentages de survie plus élevés que l'acide phosphorique à la concentration de 37,5 mM et au pH 7,2. Il existe donc une toxicité particulière de l'acide phosphorique, décelable au pH 7,2 et très forte au pH 8,2.

La mise en évidence de cette toxicité pourrait remettre en question certains résultats obtenus à l'aide de milieux tamponnés au phosphate quant à la physiologie de l'activation (Cykowska et Winnicki 1972; Winnicki et Cykowska 1973) ou quant à la définition des pH favorables à l'insémination artificielle (Petit et al. 1973; Billard 1977). Nous émettons l'hypothèse que la toxicité des phosphates pourrait être liée au rôle de ces ions dans la précipitation du calcium. En effet, le pouvoir précipitant du tampon à l'acide phosphorique est d'autant plus important que le pH est plus élevé puisqu'il dépend de la concentration en ions PO_4^{3-} . D'autre part, Gilkey (1981) démontre le rôle déterminant du calcium dans le déclenchement de tous les processus de la fécondation: le pH du milieu agirait dès lors en modifiant le seuil de concentration calcique nécessaire à l'activation. Brown et Lynan (1981) ont montré que la concentration en ions calcium dans le milieu exerce, entre 0 et 10 mg/L, une action déterminante sur la survie embryonnaire et cette action est d'autant plus importante que le pH est plus bas. Dans nos expériences, d'ailleurs, celles qui mettent en oeuvre des DIA préparés à l'eau déionisée (expériences 3A, 3B) fournissent, même avec le Tris, des pourcentages de survie particulièrement faibles. Cependant, au moment de l'introduction des ovules et du sperme, une certaine quantité de calcium est apportée dans le milieu. On peut penser que le pH du milieu agit alors en influençant l'évolution des équilibres entre le calcium cytoplasmique de l'oeuf, le calcium retenu dans l'espace périvitellin en formation et dans la *zona radiata* et le calcium du milieu.

Les grosses molécules mucoprotéiniques qui sont maintenues dans l'espace périvitellin par la barrière de la coque sont peut-être capables de retenir le calcium; cette hypothèse converge avec celle qui attribue au liquide périvitellin une fonction dans la réassociation post-mitotique des blastomères (Roubaud et Pairault 1980). Elle est cohérente avec l'observation de A. A. Neyfack (communication personnelle) selon laquelle l'oeuf privé de sa coque ne se développe pas dans l'eau douce, mais se développe un certain temps dans une solution physiologique contenant du calcium.

Nécessité des pH alcalins, effets de la dilution du DIA

L'alcalinité marquée de l'intervalle de pH favorable et la dépendance de cet intervalle par rapport au pouvoir tampon du milieu caractérisent les besoins de la carpe commune au moment de la fécondation.

Recherches écologiques

La plupart des connaissances sur les effets de pH au cours du développement embryonnaire des poissons concerne des eaux acidifiées par l'acide sulfurique. C'est, en effet, cet acide qui est le facteur principal des pollutions acidifiantes du milieu aquatique (Anonyme 1980). Cet agent étant un acide fort, les tests de résistance qui s'y rapportent utilisent, en large volume, un milieu non tamponné, et évitent les évolutions de pH en cours d'expérience soit en utilisant de larges volumes, soit en renouvelant le milieu d'incubation. Ce type d'expérimentation est aussi utilisé lorsque l'agent acidifiant choisi est l'acide chlorhydrique (Kiyashko et Volodin 1978) qui, comme SO_4H_2 , n'exerce aucun effet tampon. Presque toutes les recherches utilisant ce modèle expérimental, que nous qualifierons "d'écologique" (Beamich et Harvey 1972; Menendez 1976; Craig et Baksi 1977; Trojnar 1977a, 1977b; Daye et Garside 1977, 1979; Carrick 1979; Gjedrem 1980a, 1980b; Lee et Gerking 1980; Peterson et al. 1980; Brown 1981), déterminent l'acidorésistance des oeufs au cours de l'embryogénèse mais seulement après la fécondation (à l'exception cependant de Craig et Baksi (1977) et Carrick (1979)). Cependant, dans ce cas, le milieu d'accompagnement des gamètes (liquide séminal, liquide ovarien ou coelomique) ayant un pH élevé (Baynes et al. 1981; Plouidy et Billard 1982), il est pratiquement impossible de réguler le pH au cours des premiers instants de l'insémination sans avoir recours à des agents tampons (Baynes et al. 1981). L'utilisation d'un très large volume utile, ou le renouvellement rapide du milieu, entre, en effet, en contradiction avec la nécessité de maintenir une concentration suffisante en spermatozoïdes autour des ovules.

Recherches physiologiques

Les études qui se sont données pour objet d'améliorer les techniques de l'insémination artificielle aboutissent à un autre modèle expérimental, que nous qualifierons de "physiologique," puisque l'objectif est de déterminer la composition d'un dilueur d'insémination artificielle (DIA) stable et de maintenir le pH optimum pendant la fécondation (Petit et al. 1973; Billard 1977; Marcel 1981). Dans ce modèle physiologique, c'est aux pH nettement alcalins que l'on aboutit, à des concentrations élevées en espèce tampon: pH 9,2 et concentration en espèce tampon de 70 mM pour le DIA 532 de truite (Billard 1977). Les acides utilisés (grâce à leur concentration) traversent rapidement la barrière de la coque de l'ovule ou de l'oeuf, et peut-être aussi celle de la membrane plasmique. Au contraire, dans le modèle expérimental "écologique", la *zona radiata* et l'espace périvitellin qui se forme pendant la fécondation opposent une résistance aux variations externes du pH. Par exemple, pour le saumon atlantique, il faut environ 8 h pour que le pH du liquide périvitellin s'équilibre avec un milieu non tamponné de pH 5,5, et, avec un milieu de pH 4, le pH du liquide périvitellin se maintient encore à la valeur de 4,25 24 h après la baisse du pH externe (Peterson et al. 1980). Il est cependant probable que les vitesses d'équilibration du pH périvitellin dépendent, en même temps, de la composition ionique de l'eau, de sa vitesse d'écoulement autour de l'oeuf.

De toutes façons, dans les conditions naturelles, le pouvoir fécondant du spermatozoïde ne se maintient, suivant les espèces, que quelques dizaines de secondes à quelques minutes après émission dans l'eau (Billard 1977; Baynes et al. 1981; P. Roubaud, Ch. Gillet et R. Billard, travail en cours). Par conséquent, les pH effectifs du milieu local dans lequel se déroule la fécondation, ainsi que les toutes premières minutes

du développement, sont largement déterminés par les pH et pouvoirs tampon des liquides séminaux ou périovulaires, en même temps que par la vitesse de leur dispersion dans le milieu.

Avec des espèces comme la carpe, qui pond sur un substrat végétal dans des eaux calmes et de faible profondeur (Soin 1977), et qui libère des volumes importants d'ovules enrobés dans un liquide ovarien visqueux et nettement alcalins (Plouidy 1982), le pH réel qui préside à la fécondation est peut-être relativement indépendant du milieu, des lors que celui-ci n'est pas tamponné. Cependant, comme l'indiquent nos expériences, et en particulier l'expérience 7 (fig. 7), la dilution de l'agent tampon dans le DIA se traduit plus par une diminution de la pente de la courbe d'acidorésistance que par l'abaissement du pH limite de l'intervalle favorable. Autrement dit, les pH situés en dessous de ce pH limite, qui correspond à peu près à la neutralité, exercent toujours un effet défavorable sur la survie, et c'est seulement l'ampleur de cet effet qui paraît déterminé par le pouvoir tampon du milieu. Cet effet négatif de l'acidité du milieu dès le seuil de neutralité, est sans doute plus important dans les conditions naturelles, que ne le laissent paraître nos résultats. En effet, nous avons vérifié par ailleurs que l'embryon reste particulièrement sensible à l'effet de pH pendant quelques dizaines de minutes après les 15 ou 30 min qu'ont duré les expositions dans nos expériences. En outre, nous n'avons, dans celle-ci, comptabilisé que les mortalités avant éclosion. Or l'expérience 3 démontre que des mauvaises conditions de pH au moment de la fécondation exercent des effets retardés sur la survie embryonnaire. Cette observation vient soutenir une idée, de portée plus générale, de l'existence dans le cycle vital des organismes de relations différées (Jaoul et Roubaud 1982); on sait par exemple, que des chocs thermiques survenant au tout début du développement embryonnaire, peuvent n'affecter les pourcentages de survie qu'à la fin du développement précoce, et même ne se manifester qu'au delà de l'éclosion (Gervai et al. 1980). Il a aussi été montré (Gilkey 1981) que les premières secondes qui suivent la pénétration du spermatozoïde sont décisives, non pas pour la suite immédiate du développement embryonnaire, mais pour des stades plus avancés: à partir de la gastrulation et au delà. Il est donc possible que les effets de bas pH ou des pH alcalins dans le milieu de fécondation puissent se traduire par des mortalités au delà de l'éclosion. Nos expériences démontrent l'importance du pouvoir tampon du milieu pour l'évaluation des effets de pH au moment de la fécondation. Ces effets dépendent de la vitesse de mise en équilibre des gamètes et de l'oeuf avec le milieu. Il ne semble donc pas possible de déterminer les limites écologiques de pH, sans une étude détaillée des conditions comportementales et hydrodynamiques qui président à cette mise en équilibre au moment de la fraie.

Remerciements

Nous remercions le Dr. A. A. Neyfack qui nous a communiqué d'intéressantes observations personnelles, ainsi que les personnes suivantes pour leurs collaborations scientifiques et matérielle: pisciculture, D. Marie, P. Le Brenn et M. Levilain; comptage et mesures, C. Ledez et P. Reinaud; bibliographie, B. Chevassus, M. H. Magri, J. Marcel et D. Marie; traduction, N. Zuzine et A. Daifuku; dosage biologique de la c-GTH, B. Jalabert. Ce travail a bénéficié du soutien du Secrétariat d'Etat à l'Environnement (contrat 83.40.170) et du Centre National de la Recherches Scientifiques (R.C.P. L8 06 56).

- ANONYME. 1980. Ecological impact of acid precipitation. Proceedings of the International Conference on the Ecological Impact of Acid Precipitation. SNSF Project, Åas, Norway.
- BAYNES, S. M., A. P. SCOTT, et A. P. DAWSON. 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *J. Fish Biol.* **19**: 259–267.
- BEAMISH, R. J., et H. H. HARVEY. 1972. Acidification of the La Cloche Mountain Lakes, Ontario, and resulting fish mortalities. *J. Fish. Res. Board Can.* **29**: 1131–1143.
- BILLARD, R. 1977. Utilisation d'un système Tris–Glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination de Truite. *Bull. Fr. Piscic.* **264**: 102–112.
- BILLARD, R., et P. ROUBAUD. 1984. The effects of metals and cyanide ions on gamete survival and fertilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* In press.
- BROWN, D. J. A. 1981. The effects of various cations on the survival of brown trout, *Salmo trutta*, at low pHs. *J. Fish Biol.* **18**: 31–40.
- BROWN, D. J. A., et S. LYNAN. 1981. The effects of sodium and calcium concentrations on the hatching of eggs and the survival of yolk sac fry of brown trout, *Salmo trutta* L., at low pH. *J. Fish Biol.* **19**: 205–211.
- CARRICK, T. R. 1979. The effect of acid water on the hatching of salmonid eggs. *J. Fish Biol.* **14**: 165–172.
- CRAIG, G. R., et W. J. BAKSI. 1977. The effects of depressed pH on flagfish reproduction growth and survival. *Water Res.* **11**: 621–626.
- CYKOWSKA, C., et A. WINNICKI. 1972. Embryonic development of the baltic sea trout, *Salmo trutta* L., in a buffer solution. *Acta Ichthyol. Piscatoria*, **11**: 3–13.
- DAYE, P. G., et E. T. GARSIDE. 1977. Lower lethal levels of pH for embryos and alevins of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Can. J. Zool.* **55**: 1504–1508.
- . 1979. Structural alterations in embryos and alevins of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by continuous or short-term exposure to acidic levels of pH. *Can. J. Zool.* **57**: 1713–1718.
- GERVAI, J., S. PETER, A. NAGY, L. HORVATH, et V. CSANYI. 1980. Induced triploidy in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Biol.* **17**: 667–671.
- GILLET, C., et P. ROUBAUD. 1983. Influence sur la survie jusqu'à l'éclosion des embryons de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) après traitement, pendant la fécondation et le développement précoce, par le carbendazime, un fongicide antimitotique de synthèse. *Water Res.* **17**: 1343–1348.
- GILKEY, C. 1981. Mechanisms of fertilisation in fishes. *Am. Zool.* **21**: 359–375.
- GJEDREM, T. 1980a. Genetic variation in acid tolerance in brown trout. Proceedings of the International Conference on the Ecological Impact of Acid Precipitation. SNSF Project. Åas, Norway. p. 308.
- . 1980b. Growth and survival of fingerlings in acidic water. Proceedings of the International Conference on the Ecological Impact of Acid Precipitation. SNSF Project, Åas, Norway. p. 309.
- JALABERT, B., B. BRETON, et R. BILLARD. 1974. Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test de maturation *in vitro* des ovocytes de truite. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* **14**: 217–228.
- JAUL, A., et P. ROUBAUD. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409–3419.
- JOHANSSON, N., et G. MILBRINK. 1976. Some effects of acidified water on the early development of roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis* L.). *Water Resour. Bull.* **12**: 39–48.
- KIYASHKO, V. I., et V. M. VOLODIN. 1978. The influence of the embryonic development of the ruffe, *Acerina cernua*, of the active response of environment. *J. Ichthyol. (Engl. Transl.)*, **18**: 693–695.
- LEE, R. M., et S. D. GERKING. 1980. Sensitivity of fish eggs to acid stress. *Water Res.* **14**: 1679–1681.
- MARCEL, J. 1981. Contrôle de la reproduction et gestion des gamètes de quelques espèces de poissons téléostéens. Diplôme, École

- Pratique des Haute Études.
- McKIM, M. C. 1977. Evaluation of tests with early stages of fish for predicting long term toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 1148–1154.
- MENENDEZ, R. 1976. Chronic effects of reduced pH on brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 118–123.
- PETIT, J., B. JALABERT, B. CHEVASSUS, et R. BILLARD. 1973. L'insémination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri* Richardson). I. Effets du taux de dilution, du pH et de la pression osmotique du dilueur sur la fécondation. *Ann. Hydrobiol.* **4**: 201–210.
- PETERSON, R. H., P. E. DAYE, et J. L. METCALFE. 1980. Inhibition of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Hatching at low pH. *Can. Fish. Aquat. Sci.* **37**: 770–774.
- PLOUIDY, M. G. 1982. Composition chimique des liquides d'accompagnement des gamètes de carpe. Diplôme, Fin d'études Institute Supérieur Agricole de Beauvais.
- PLOUIDY, M. G., et R. BILLARD. 1982. The chemical composition of the companion fluids of the gametes in the common carp (*Cyprinus carpio*). Dans *Reproductive physiology of fish. Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, 2–6 August 1982, Wageningen, The Netherlands. Éditeurs: C. J. J. Richter et H. J. Th. Goos. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- ROUBAUD, P., et C. PAIRAULT. 1980. Membrane differentiation in the pregastrula of the teleost, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei: Cyprinidae). A scanning electron microscopy study. *Reprod. Nutr. Dev.* **20**: 1515–1526.
- SOIN, S. G. 1977. Some features of the development of the carp (*Cyprinus carpio*) under hatchery conditions. *J. Ichthyol. (Engl. Transl.)*, **17**: 759–769.
- TROJNAR, J. R. 1977a. Egg and larval survival of white suckers (*Catostomus commersoni*) at low pH. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 262–266.
- 1977b. Egg hatchability and tolerance of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fry at low pH. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 574–579.
- VON RAUEN, H. M. 1964. *Biochemisches Taschenbuch*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 37–110.
- WINNICKI, A., et C. CYKOWSKA. 1973. New data on the mechanism of water uptake in salmon eggs. *Acta Ichthyol. Piscatoria*, **3**: 3–9.