

Embryologie

LOCALISATION, COMPOSITION ET UTILISATION DES
LIPIDES VITELLINS CHEZ
SCYLIORHINUS CANICULA (L.)

par

E. DELHAYE, H. LECHENAULT, F. WRISEZ, C. LERAY,
B. HAYE et J. MELLINGER ⁽¹⁾

Les lipides vitellins de la petite roussette, Scyliorhinus canicula (L.), ne sont pas tous localisés dans les plaquettes vitellines: 20 à 35% de leur masse se trouve sous la forme de gouttelettes lipidiques, dispersées entre les plaquettes. Par rapport à son poids sec, le vitellus contient 20,5% de lipides, dont 41,6% sont des phospholipides. Ceux-ci ne doivent pas être considérés uniquement comme des précurseurs membranaires, puisqu'ils disparaissent à raison de 71% durant le développement embryonnaire, alors que seulement 46% des lipides totaux sont consommés (respiration et pertes non fécales). Les lipides, et plus particulièrement les phospholipides, constituent la principale source d'énergie pour l'embryon. Les % molaires des acides gras sont conservés au cours du développement.

*Localization, composition and utilization of yolk lipids
in Scyliorhinus canicula (L.).*

By weight, 20-33% of the yolk lipids of the lesser spotted dogfish, Scyliorhinus canicula (L.), were found in lipid droplets, scattered among yolk platelets. With reference to its dry weight, yolk contained 20.5% lipids, including 41.6% phospholipids. These should not be considered only as precursors for membrane biogenesis, since 71% were consumed during development, while only 46% of the total lipids disappeared during the same time, being used for respiration and nonfecal excretion. Lipids, particularly phospholipids, were the main source of energy available to the embryo. The fatty acid profile was conserved throughout development.

Introduction

Les plaquettes vitellines des poissons Sélaciens ont été souvent observées sur des coupes histologiques et figurent dans les descriptions embryologiques classiques. Leur structure, observée à l'état frais par GRODZINSKI (1958) chez Mustelus canis, est celle d'organites délimités par une membrane et contenant un cristal lipoprotéique, baignant dans un liquide amorphe. Cet auteur décrit l'apparition de gouttelettes lipidiques

Auteur auquel on adressera les demandes de tirés à part.

obtenues par démixtion à la surface du cristal, mais ne signale pas la présence de globules lipidiques indépendants des plaquettes, alors qu'il en existe dans les oeufs de nombreuses espèces de poissons Téléostéens. LANGE (1985) a identifié dans les plaquette de *Scyliorhinus* sp. la structure cristalline pseudo-orthorhombique typique des Gnathostomes primitifs. Depuis les recherches de FUJII (1960), on savait que le vitellus des Sélaciens contenait de la lipovitelline, de la phosvitine et des phosvettes, protéines provenant du clivage de la vitellogénine comme chez les autres Vertébrés (BYRNE et coll., 1989). Les lipides représentent environ 20% du poids sec du vitellus chez les roussettes *Scyliorhinus stellaris* et *S. canicula* (MELLINGER et coll., 1989; MELLINGER et WRISEZ, 1989); au cours du développement, il en disparaît près de la moitié chez *S. canicula*, mais seulement 27% chez *S. stellaris*. DIEZ et DAVENPORT (1990a) ont trouvé 19% de lipides, 56% de protéines solubles dans la soude 1,0 M, et seulement 0,1% de glucides, dans le vitellus lyophilisé de *S. canicula*, après 90-100 jours de développement à 13°C. L'embryon est le siège d'une gluconéogenèse, expliquant sans doute la légère augmentation du taux des glucides observée dans le vitellus jusqu'à la fin de leurs expériences, dix semaines plus tard.

MELLINGER et coll. (1986), MELLINGER et WRISEZ (1989), LECHENAULT et coll. (1992) ont montré que le développement de *S. canicula* se divise en deux moitiés, son milieu étant marqué par la préclosion, caractéristique des Chondrichthyens ovipares, c'est-à-dire l'ouverture anticipée de la coque, bien avant l'éclosion. Durant la première moitié, la croissance embryonnaire est faible et le stock de vitellus n'est pas entamé d'une manière appréciable. Le vitellus pénètre dans l'intestin spirale à partir de la préclosion, et s'y trouve digéré. Une dilatation du canal vitellin, la vésicule vitelline interne, sert de lieu de stockage transitoire. Un bilan chimique du développement de cette espèce a été établi, en poids sec, en carbone, azote, etc. Nous présentons ici les résultats, déjà partiellement publiés (MELLINGER et coll., 1989; WRISEZ et coll., 1992), de nos analyses lipidiques réalisées sur ce matériel, données que nous complétons par la première description de la présence de gouttelettes lipidiques dans un oeuf de Sélacien.

Matériel et méthodes

Les oeufs de roussette nous sont envoyés par la Station Biologique de Roscoff. Ils sont incubés et disséqués selon MELLINGER et coll. (1986), MELLINGER et WRISEZ (1989). Les poids secs ont été obtenus, comme précédemment, par lyophilisation. Les lipides ont été extraits par la méthode de FOLCH et coll. (1957), dont le rendement en première extraction a été testé (> 95%), et qui s'est révélée plus commode et plus efficace que celle de BLIGH et DYER (1959). La quantité de phospholipides dans cet extrait a été évaluée par dosage du phosphore selon ROUSER et coll. (1970). Le cholestérol a été dosé dans les mêmes lipides totaux par une méthode colorimétrique inspirée de ZLATKIS et coll. (1953), modifiée (WRISEZ et coll., 1992). Les méthylesters des acides gras, obtenus selon MORRISON et SMITH (1964), ont été identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse dans une colonne capillaire.

On a pesé individuellement, avant et après la lyophilisation, le vitellus d'oeufs non développés, ou le vitellus inclus dans la vésicule vitelline externe (VVE) d'oeufs pris avant la préclosion, ou dans la vésicule vitelline interne (VVI) des nouveau-nés, tandis que les nouveau-nés étaient disséqués en plusieurs parties: VVI, foie, intestin spirale, et le reste du corps appelé "carcasse". Les extractions et dosages lipidiques ont été réalisés individuellement sur les oeufs, les VVE et les carcasses, tandis que les VVI, foies et intestins ont dû être regroupés en 4 ou 5 lots.

La recherche des lipids homophasiques a été faite par coloration à l'Oil Red O et contre-coloration au vert lumière (GABE, 1968), soit sur des frottis de vitellus frais, soit sur des coupes semifines de 2,5 µm d'épaisseur pratiquées à l'utramicrotome Reichert OmU2 dans des oeufs fixés durant 24 heures dans le formol-calcium de Baker (GABE, 1968), légèrement déshydratés par l'éthanol à 60% (6 heures), infiltrés (24 heures) puis inclus dans l'Historesin (Cambridge Instruments GmbH, Nußloch, Heidelberg). La spécificité de la coloration a été contrôlée par une extraction des lipides à l'acétone, sur coupes et avant inclusion.

Les plaquettes vitellines peuvent être facilement séparées du reste du vitellus, par simple sédimentation à partir d'un homogénat obtenu par secouage à la main. La dispersion était faite dans un liquide physiologique pour Sélaciens, additionné d'urée (21 g/l) et de glucose (0,9 g). En répétant l'opération, on obtient des plaquettes intactes, lavées de tout composant cytoplasmique, en particulier de gouttelettes lipidiques. L'extraction des lipides selon FOLCH et coll. (1957) à partir des surnageants implique une adaptation des volumes, de telle sorte qu'elle se fasse en milieu monophasique.

Résultats

Le tableau 1 présente les poids secs moyens du vitellus, des embryons au moment de la préclosion (n = 29), des nouveau-nés entiers et de leurs différentes parties, ainsi que les pourcentages de lipides totaux par rapport à ces poids secs, et les pourcentages de phospholipides et de cholestérol total exprimés par rapport aux poids de lipides totaux. Les calculs effectués à partir de ces données figurent dans les deux colonnes de droite, et dans la ligne du bas ("bilan des pertes").

Le reliquat du vitellus qui subsiste encore dans la VVI à l'éclosion représente 10% du poids initial et 10% des lipides. L'utilisation des lipides et des protéines n'est donc pas séquentielle. La VVI renferme 18,4% des lipides restants, auxquels il faut ajouter le contenu intestinal, qui correspond sans doute aux 9/10 à du vitellus, bien qu'on relève une abondance particulière du cholestérol à ce niveau (environ 13%, contre 4,8% dans l'oeuf), ainsi qu'un appauvrissement en phospholipides (25%). Nous ne pouvons pas l'expliquer.

Tandis que les phospholipides sont assez abondants dans les lipides de l'oeuf (41,6%) et à peine moins abondants dans ceux de la carcasse (38,5%), ils sont rares (en gros, 4%) dans le foie, qui stocke donc essentiellement des lipides neutres. Le foie, déjà pleinement développé (4,8-6,8% du poids corporel frais, comme chez l'adulte), présente une teinte claire, indiquant sa haute teneur en huile (environ 53% de lipides totaux). Au moment de l'éclosion, cet organe stocke près de la moitié des lipides restants (47,7%),

alors que 30,6% seulement d'entre eux se retrouvent dans la carcasse. C'est la principale destination des lipides du vitellus (25,8%).

Le développement se solde par la perte de 0,25 g de matière sèche, soit 20,8% par rapport au poids moyen du vitellus des oeufs non développés, ce qui représente un minimum pour un ovipare. Une consommation préférentielle des phospholipides est évidente: 71% d'entre eux disparaissent, contre 46% en moyenne pour les lipides. Le cholestérol ne subit pas le même sort (42% de pertes, différence non significative).

Le tableau 2 montre le "profil" en acides gras des lipides totaux du vitellus d'un oeuf non développé, comparé à celui d'un nouveau-né. Les acides palmitique (16:0), oléique (18:1n-9) et docosohexaénoïque (22:6n-3) prédominent. Les acides gras hautement insaturés (AGHI) de la série n-3, essentiels pour les Téléostéens marins d'élevage, sont bien représentés, en particulier l'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3). L'acide 16:1 est en réalité celui de la série n-7, l'acide palmitoléique, placé ici avec les acides n-9 pour simplifier le tableau. Les deux "profils" sont très voisins, en dépit des pertes décrites ci-dessus.

La figure 1 montre que le vitellus de la roussette contient à la fois des plaquettes, de forme ovale, et des gouttelettes lipidiques, de plus petite taille. Les difficultés de fixation et de coupe ne permettent pas d'en décrire toute la distribution dans l'oeuf, mais les deux types d'inclusions coexistent dans la périphérie de l'oeuf, seule zone examinée. Sans contre-coloration, les plaquettes apparaissent en rose très pâle, alors que les gouttelettes sont brillamment colorées en rouge sombre. Pourtant, un premier essai de fractionnement cellulaire, suivi d'une extraction séparée des lipides de chacune des deux fractions purifiées (plaquettes, surnageant contenant les gouttelettes), nous a donné les résultats suivants: pour quatre oeufs, la proportion des lipides totaux localisés dans les plaquettes était respectivement de 65,4%, 65,5%, 76,7% et 82,3%. Les gouttelettes demeurent dispersées dans le surnageant lorsqu'on utilise la centrifugation à haute vitesse (27 000 g durant 30 minutes), formant un "nuage" mais jamais de phase huileuse. On trouve des phospholipides dans le surnageant, mais on ignore s'ils font partie des gouttelettes.

Discussion et conclusions

Le système digestif de l'embryon de roussette est clos, en particulier à l'extrémité antérieure du rectum (MELLINGER et coll., 1986, 1987). La digestibilité du vitellus est donc totale jusqu'à l'éclosion. D'après la perte moyenne d'azote calculée précédemment sur la base d'un échantillon plus réduit d'oeufs et de nouveau-nés, l'embryon excréterait au maximum 0,66 mmol d'urée (MELLINGER et coll. 1986). On ignore s'il excrète l'azote sous d'autres formes. L'azote représente 13% de la matière sèche du vitellus et 13,8% de celle du nouveau-né sans sa VVI.

La perte de 0,25 g de matière sèche que nous avons estimée à partir d'un échantillon plus large correspond essentiellement à de la matière organique, compte tenu de la faible teneur de l'oeuf (vitellus) en cendres (RANZI, 1932). D'après les valeurs précédentes, la perte correspondante en azote s'élève à $(1,2 \times 0,13) - (0,83 \times 0,138) - (0,12 \times 0,13)$ pour tenir compte de la présence de la VVI, soit 0,0258 g, ce qui correspond à 0,9214 mmol d'urée (0,05528 g).

Quelles sont les contributions respectives des protéines et des lipides vitellins à la nutrition de l'embryon ? Le tableau 1 permet de calculer le poids de lipides contenus dans un oeuf de 1,2 g, soit 0,246 g. Etant donné que 46% des lipides disparaissent, cela aboutit à une perte de 0,113 g de lipides. Nous pouvons attribuer le reste, soit 0,137, g aux protéines et à l'urée. En soustrayant la masse d'urée excrétée, il reste 0,0817 g de protéines. Compte tenu des enthalpies spécifiques indiquées par GNAIGER et BITTERLICH (1984) pour les lipides (-39,5 kJ/g) et les protéines (-23,9 kJ/g) de composition moyenne, on peut estimer que les lipides peuvent fournir 4,46 kJ, les protéines seulement 1,95 kJ. Près de 70% de l'énergie dépensée au cours du développement provient donc des lipides.

L'oxydation préférentielle des phospholipides (PL) pose un problème. Leur densité en énergie est inférieure à celle des lipides neutres (LN), mais il est possible qu'ils se prêtent mieux à la formation de structures cristallines, très compactes, dans les plaquettes. On peut supposer que le rapport LN/PL est beaucoup plus élevé dans les gouttelettes que dans les plaquettes, mais les analyses restent à faire. Il est également possible que l'oxydation des PL serve à couvrir une partie des besoins en phosphates. La phosvitine constitue une source importante de phosphates, mais nous ne savons pas si elle suffit à alimenter les biosynthèses de nucléotides et d'acides nucléiques.

La conservation du profil des acides gras, également constatée par DIEZ et DAVENPORT (1990b), est probablement liée au fait que cette composition est assez constante pour les oeufs des poissons marins, à l'exception d'une quantité plus élevée d'acide arachidonique (20:4n-6) chez la roussette. Ces auteurs ont trouvé peu de différences entre les PL et les LN, et entre les embryons et les VVE qu'ils ont analysés séparément sans procéder à une dissection des embryons.

L'abondance des gouttelettes lipidiques, contenant une part non négligeable des lipides vitellins, fait de cet oeuf un matériel favorable pour l'étude des mécanismes cellulaires de la vitellogenèse. L'intérêt des chercheurs pour la vitellogénine et ses dérivés a quelque peu fait oublier la présence de ce compartiment dans l'oeuf de nombreux poissons. Sa biogenèse et sa signification fonctionnelle demeurent obscures. Chez les Téléostéens, à l'exception de certaines espèces d'eau douce, ces gouttelettes d'huile n'assurent pas la flottabilité de l'oeuf.

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à M. Alain BEAUDON et à Mme Yvette VIROT pour leur aide dans l'illustration de cet article.

*Laboratoires de Biologie Animale et de Biochimie, Faculté des Sciences,
Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 347, 51062 Reims Cedex,
France*

et (C. LERAY)

*Laboratoire d'Etude des Régulations Physiologiques,
Centre National de la Recherche Scientifique,
BP 37 CR, 67037 Strasbourg Cedex, France*

RÉFÉRENCES

- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. (1959).- A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917.*
- BYRNE, B.M., GRÜBER, M. & AB, G. (1989).- The evolution of egg yolk proteins. Prog. Biophys. molec. Biol., 53, 33-69.*
- DIEZ, J.M. & DAVENPORT, J. (1990a).- Energy exchange between the yolk and embryo of dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) eggs held under normoxic, hypoxic and transient anoxic conditions. Lipids, 25, 724-728.*
- DIEZ, J.M. & DAVENPORT, J. (1990b).- Embryonic fatty acid composition as a function of yolk fatty acid composition in eggs of the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). Lipids, 25, 724-728.*
- FOLCH, J., LEES, M., & SLOAN-STANLEY, G.H. (1957).- A simple method for purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509.*
- FUJI, T. (1960).- Comparative biochemical studies on the egg-yolk proteins of various animal species. Acta Embryol. Morph. Exp., 3, 260-285.*
- GABE, M. (1968).- Techniques histologiques. Masson, Paris, 1113 p.*
- GNAIGER, E. & BITTERLICH, G. (1984).- Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CNH analysis: a stoichiometric concept. Oecologia, 62, 289-298.*

- GRODZINSKI, Z. (1958).- The yolk of the dogfish. *Acta Biol. Cracov.*, 1, 55-68.
- LANGE, R.H. (1985).- The vertebrate yolk-platelet crystal: comparative analysis of an *in vivo* crystalline aggregate. *Intern. Rev. Cytol.*, 97, 133-181.
- LECHENAULT, H., DESSELLE, J.C., WRISEZ, F. & MELLINGER, J. (1992).- Yolk utilization in *Scyliorhinus canicula*, an oviparous dogfish. *Environ. Biol. Fishes*, soumis pour publication.
- MELLINGER, J., WRISEZ, F. & ALLUCHON-GERARD, M.J. (1986).- Developmental biology of an oviparous shark, *Scyliorhinus canicula*. In: "Indo-Pacific Fish Biology", *Proc. 2nd Int. Conf. on Indo-Pacific Fishes*, ed. by T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi, K. Matsuura, pp. 310-332. Ichthyological Society of Japan, Tokyo.
- MELLINGER, J., WRISEZ, F. & DESSELLE, J.C. (1987).- Transitory closures of esophagus and rectum during elasmobranch development: models for human congenital anomalies ? *Archs. Biol.*, 98, 209-230.
- MELLINGER, J. & WRISEZ, F. (1989).- Biologie et physiologie comparées du développement de deux Sélaciens ovipares, les roussettes *Scyliorhinus canicula* et *Scyliorhinus stellaris*. Evolution de la matière sèche, de l'eau et des ions (Cl^- , Na^+ , K^+) dans le vitellus de *S. canicula* au cours du développement. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 114, 51-62.
- MELLINGER, J., WRISEZ, F., LERAY, C. & HAYE, B. (1989).- A comparison of egg and newborn lipids in the oviparous dogfishes, *Scyliorhinus canicula* and *S. stellaris* (Chondrichthyes). Preliminary data. *Biol. Struct. Morphogenesis*, 2, 44.
- MORRISON, W.R. & SMITH, L.M. (1964).- Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron-fluoride-methanol.
- ROUSER, G., FLEISCHER, S. & YAMAMOTO, A. (1970).- Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5, 494-496.
- WRISEZ, F., LECHENAULT, H. & MELLINGER, J. (1990).- Fate of yolk lipid in an oviparous elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula*. (L.) In: *Development and aquaculture of marine larvae. Programme et résumés des communications présentées au congrès de Bergen, Norvège, 12 au 15 août 1990*, p. 026.- Sarsia, sous presse.
- ZLATKIS, A., ZAK, B. & BOYLE, A.J. (1953).- A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J. Lab. Clin. Med.*, 41, 486-492.

Tableau 1
Résultats des pesées, extractions et dosages
spectrophotométriques

Matériel	Poids sec	LT	PL	Chol.	% LT par rapport:	
					à l'oeuf	au nv.-né
(en % des lipides totaux)						
Oeuf, VVE (n = 51)	1,2 g	20,54 % ± 0,35	41,6 % ± 0,7	4,8 % ± 0,17	(100)	-
Embryon préclos	30-35 mg	11,2 %	39,9 %	6,5 %	-	-
Nouveau-né	0,95 g	14 %	-	-	(54,2)	(100)
- carcasse (n = 43)	0,688 g	5,94 % ± 0,15	38,5 % ± 1,05	7,8 % ± 0,5	16,6	30,6
- foie	0,12 g	53 %	4 %	3 %	25,8	47,7
- VVI	0,12 g	valeurs comparables à celles de l'oeuf			10	18,4
- intestin	0,022 g	20 %	25 %	13 %	1,8	3,3
Bilan des pertes: 0,25 g (respiration + excrétion)		46 %	71 %	42 %		

Moyenne statistique ± écart type de la moyenne (n = effectif) sont indiqués, pour des mesures individuelles.

Tableau 2
Composition en acides gras (en mol %) du vitellus et du nouveau-né

<i>Acides gras</i>	<i>Vitellus</i>	<i>Nouveau-né</i>
<i>12:0</i>	<i>1,54</i>	<i>1,66</i>
<i>14:0</i>	<i>2,12</i>	<i>2,36</i>
<i>16:0</i>	<i>24,04</i>	<i>23,23</i>
<i>18:0</i>	<i>5,18</i>	<i>4,86</i>
<i>Saturés</i>	<i>32,88</i>	<i>32,11</i>
<i>16:1</i>	<i>7,45</i>	<i>6,22</i>
<i>18:1</i>	<i>17,41</i>	<i>19,11</i>
<i>20:1</i>	<i>2,40</i>	<i>2,30</i>
<i>20:3</i>	<i>0,40</i>	<i>0,43</i>
<i>n - 9</i>	<i>27,66</i>	<i>28,06</i>
<i>18:2</i>	<i>0,60</i>	<i>0,80</i>
<i>20:4</i>	<i>5,12</i>	<i>4,83</i>
<i>22:4</i>	<i>1,00</i>	<i>0,81</i>
<i>22:5</i>	<i>0,98</i>	<i>1,05</i>
<i>n - 6</i>	<i>7,70</i>	<i>7,49</i>
<i>18:3</i>	<i>0,23</i>	<i>0,38</i>
<i>18:4</i>	<i>0,30</i>	<i>0,47</i>
<i>20:4</i>	<i>0,30</i>	<i>0,41</i>
<i>20:5</i>	<i>5,47</i>	<i>5,46</i>
<i>22:5</i>	<i>2,29</i>	<i>1,99</i>
<i>22:6</i>	<i>23,17</i>	<i>23,63</i>
<i>n - 3</i>	<i>31,76</i>	<i>32,34</i>
<i>Insaturés</i>	<i>67,12</i>	<i>67,89</i>

Fig. 1

Microphotographies de plaquettes vitellines (p) et gouttelettes lipidiques (flèches). Les gouttelettes sont colorées en rouge foncé par l'Oil Red O et apparaissent ici en noir, tandis que les plaquettes sont essentiellement colorées par le vert lumière et apparaissent en gris. A: frottis. B: coupe semifine. La coupe permet de distinguer dans chaque plaquette un cristalloïde (gris) et une zone périphérique amorphe (halo incolore séparant le cristalloïde des gouttelettes foncées). La membrane des plaquettes n'est décelable que sur frottis. Barre: 50 μm .