

Le rôle de l'œil dans les rythmes migratoires de *Daphnia magna* et *Daphnia longispina* (Cladocères)

S. Cellier¹
M. Rehaïlia¹
J.-L. Berthon¹
B. Buisson¹

Mots clés : migrations, Cladocères, *Daphnia*, œil composé, pigments photoprotecteurs.

Les migrations verticales de *Daphnia* coïncident avec des changements d'intensité lumineuse. Ces déplacements persistent en conditions constantes d'éclairement. Ceci suggère l'existence d'une composante interne intervenant dans le mécanisme des migrations. Cette composante a été recherchée dans l'œil de *Daphnia*. Les organismes sont soumis à diverses conditions d'éclairement : alternance jour/nuit ou éclairement constant. Ils sont fixés à différentes heures de la journée et la structure de l'œil est étudiée à l'aide d'un analyseur d'images.

En alternance jour/nuit, les pigments photoprotecteurs sont plus concentrés autour du cristallin avant le crépuscule et autour de la partie supérieure du rhabdome après le crépuscule. Ce phénomène persiste en conditions constantes d'éclairement, suggérant la présence d'une composante endogène pour le mécanisme de la répartition des pigments.

Nous émettons l'hypothèse que la variation pigmentaire détermine les migrations verticales de *Daphnia*. L'alternance jour/nuit en lumière bleue inhibe les migrations verticales des daphnies et les variations de densité pigmentaires ne sont plus significatives. Ces résultats vont dans le sens de la participation de l'œil à l'horloge interne.

Keywords : migrations, Cladocera, *Daphnia*, composed eye, photoprotector pigments.

The role of the eye in the migratory rhythms of *Daphnia magna* and *Daphnia longispina* (Cladocera)

Vertical migrations of *Daphnia* coincide with changes of light intensity. These displacements persist under constant conditions, suggesting the existence of an endogenous component acting in the migration mechanisms. This component was investigated in the eye of *Daphnia*. Organisms were submitted to various light conditions : alternating light/dark or constant light. They were fixed at different times of the day and the structure of the eye was studied with an image analyser.

Under alternating light/dark, the photoprotector pigments are more concentrated around the cristallin before sunset and are around the upper part of the rhabdom later on. This phenomenon persists under constant light conditions, suggesting the presence of an endogenous component in the mechanism of the pigment distribution.

We propose the hypothesis that pigment variation determines the vertical migration of *Daphnia*. The alternating light/dark in blue light inhibits migrations and variations of pigment density are no more significant. The above results seem to confirm that the displacements of pigment along the rhabdom are part of the internal oscillator, or are an expression of it.

1. Introduction

Les migrations quotidiennes que certains animaux effectuent en groupe correspondent à des déplacements rythmiques et comportant toujours un retour

vers le point de départ. Les animaux planctoniques se concentrent la nuit dans les couches superficielles des plans d'eau ou des océans, l'ascension débutant le plus souvent au crépuscule. Ils redescendent à l'aube et demeurent en profondeur durant la journée (Angeli et al. 1995). Plusieurs facteurs exogènes sont évoqués pour expliquer ce phénomène. La lumière est considérée comme le facteur le plus significatif (Ringelberg & Flick 1994). Elle peut agir soit par son intensité soit par sa qualité spectrale. Les caractéristiques des migrations sont peu ou pas modifiées lorsqu'on soumet les

1. Laboratoire de Biologie Animale et Appliquée, Université Jean Monnet, 23, rue du Dr Paul Michelon, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France.

organismes à diverses intensités lumineuses, si l'on demeure dans la gamme des intensités naturelles. Au contraire, la qualité spectrale semble avoir un effet très important (Berthon 1988). Les migrations des daphnies coïncidant avec les changements d'intensité lumineuse crépusculaire (Grover & Miller 1984), on peut donc penser que leurs photorécepteurs sont impliqués dans le processus migratoire. Des variations structurales et/ou ultrastructurales de l'œil entre le jour et la nuit ont été observées chez de nombreux Cladocères (Nilsson & Odselius 1981). Pour préciser leur rôle, nous avons étudié la structure de l'œil chez deux espèces de daphnies *Daphnia longispina* (O. F. Müller 1785) et *D. magna* (Strauss 1820) et son évolution au cours d'un nyctémère.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les daphnies (*Daphnia longispina* et *D. magna*) ont été prélevées à l'aide d'un filet de type Juday de 88 μm de vide de maille, dans la retenue de Grangent sur la Loire, dans la zone du port de Saint-Victor sur Loire. Elles ont été transportées dans de grands conteneurs, dans de l'eau provenant du site de prélèvement. Les animaux ont été introduits sans délai et de façon identique dans les colonnes d'expérimentations avec de l'eau ayant servi au transport.

2.2. Dispositif expérimental

Les organismes récoltés sont répartis dans deux colonnes en altuglass placées au centre d'enceintes climatisées. Chaque colonne mesure 3,0 m de haut et 0,25 m de diamètre intérieur (Fig. 1) et elle n'est remplie que jusqu'à environ 2,5 m de hauteur, par mesure de sécurité. Ces colonnes sont éclairées par un générateur de lumière froide (SCHOTT KL 1500 ou FORT GLY 154) comprenant une lampe à incandescence de 150 Watts.

Un sas permet d'entrer et de sortir de l'enceinte sans modifier les conditions expérimentales. La température de l'eau est fixée à environ 23 °C et le pH à 7,5 - 7,7.

2.3. Plan d'expérimentation

Après un temps d'acclimatation de 48 heures, les animaux sont placés sous l'éclairage choisi :

- alternance jour/nuit de 12 heures de photophase en lumière blanche et 12 heures de scotophase appelée dans la nomenclature habituelle en Chronobiologie LD 12:12 (LD pour Light-Dark),
- éclairage constant en lumière blanche appelé LL (pour Light-Light)

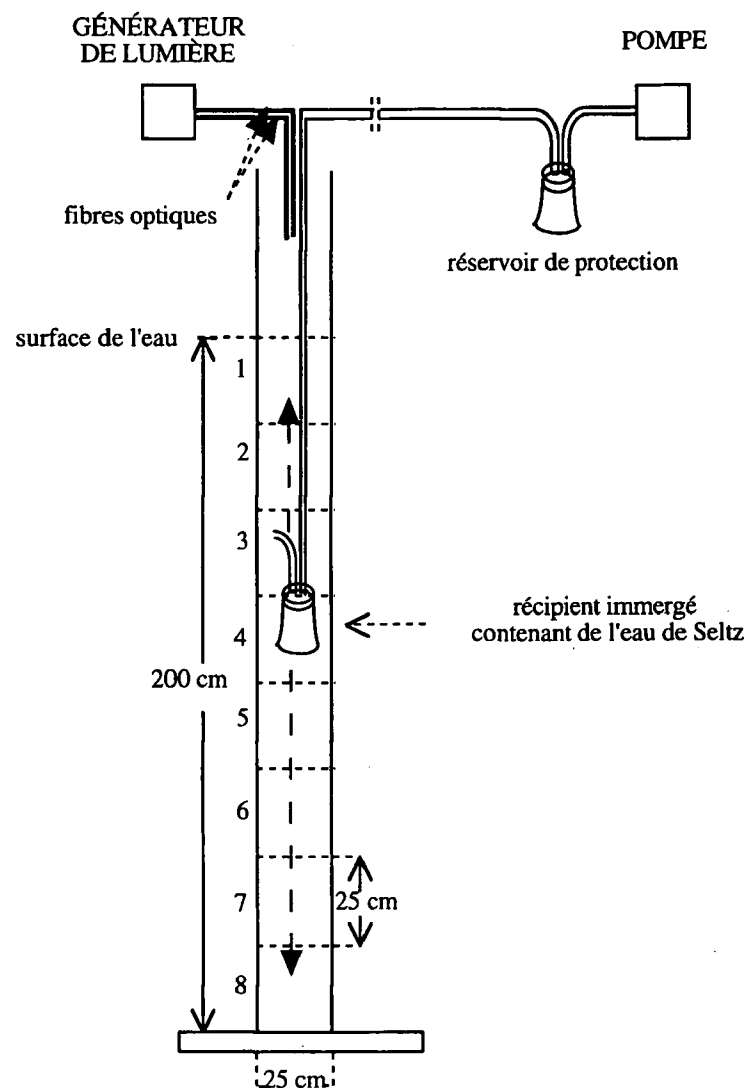


Fig. 1. Schéma général du dispositif expérimental.

Fig. 1. General scheme of the experimental design.

- alternance jour/nuit en lumière bleue ou LD bleu (12:12).

L'aube et le crépuscule (subjectifs ou objectifs) sont fixés respectivement à 6 h. et à 18 h.

Les daphnies sont prélevées directement au sein de la colonne, grâce à un conteneur rempli d'eau de Seltz et relié à une pompe à vide (KNF) (Fig. 1).

Les animaux, anesthésiés dès leur prélèvement par le dioxyde de carbone (eau de Seltz), sont fixés dans un mélange (V/V) de glutaraldéhyde à 0,08 % et de tampon cacodylate de sodium 0,04M. Le pH doit être de 7,3 - 7,4 et la pression osmotique de 80 mOsm. La durée de la fixation est d'au moins deux heures à 4°C.

Après trois bains de rinçage de 15 mn dans le tampon, les échantillons sont maintenus une nuit dans du tampon cacodylate de sodium 0,04 M à 4°C.

La post-fixation est effectuée dans un mélange (V/V) de tétraoxyde d'osmium à 2 % et de tampon cacodylate 0,04 M, durant une heure à température ambiante. On rince ensuite durant cinq minutes à l'eau distillée.

Après une déshydratation progressive à l'alcool, les échantillons sont transférés dans un bain de substitution alcool / résine SPURR (V/V), puis deux bains d'imprégnation avant inclusion dans le SPURR. La polymérisation est obtenue en 24h à 60°C.

On réalise ensuite des coupes sagittales de 400 nm d'épaisseur au niveau de l'œil (ultramicrotome Sorval Porter-Blum MT 6000). Cette épaisseur correspond au diamètre moyen des grains de pigments. Sur une coupe on observe donc une seule couche de grains, ce qui facilite leur dénombrement.

2.4. Analyse

Les coupes sont traitées en analyse d'image (Logiciel Samba 2005). L'œil composé des daphnies comporte 32 ommatidies. Chaque ommatidie possède un cristallin, un rhabdome et une fibre nerveuse. L'ensemble est bordé par des grains de pigments (Figs. 2a et b).

Pour l'analyse, chaque ommatidie est divisée arbitrairement en trois parties (zones 1 à 3). La première correspond à la partie la plus extérieure de l'ommatidie, comprenant le cristallin, la deuxième correspond à la région antérieure du rhabdome et la troisième à sa région postérieure (Figs. 2c et d).

Il est possible de dénombrer les pigments dans chacune des zones, soit directement sur écran, soit sur cliché. Cependant, les variations de leur densité entre le jour et la nuit ne sont pas clairement perceptibles. Un traitement statistique est indispensable.

Chaque ommatidie peut être représentée par un vec-

teur de R^3 , $X = \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \end{pmatrix}$, où X_i est la densité pig-

mentaire de la zone i .

Les moyennes des observations sont analysées, dans un premier temps, avec un test t de Student. Ceci permet d'estimer la variation pigmentaire d'une zone au cours de la journée. Pour tenir compte de la structure multivariée des observations, un test T^2 de Hotelling est ensuite réalisé.

3. Résultats

En alternance jour/nuit en lumière blanche (ou LD 12:12 blanc), une modification de la structure de l'œil

entre les phases d'éclairement et d'obscurité est observée. Les grains de pigments se déplacent le long du rhabdome de chaque ommatidie : ils sont plus concentrés en zone 1, avant le crépuscule et en zone 2, après. Pour les zones 1 et 2, en LD, il existe une différence significative ($p = 0,0001$) entre les densités pigmentaires observées avant et après le crépuscule (Tableau 1). Ceci n'est pas le cas pour la zone 3.

Ce phénomène persiste lorsque l'expérience est conduite en conditions constantes d'éclairement (LL blanc). Les 3 zones, prises séparément, ne présentent pas la même structure pigmentaire (Tableau 2). L'ensemble des zones présente des moyennes de densité pigmentaire différentes avant et après le crépuscule.

Globalement, les pigments sont répartis de façon différente, avant et après le crépuscule, aussi bien en alternance jour/nuit qu'en conditions constantes d'éclairement en lumière blanche (Tableau 3).

En alternance jour/nuit en lumière bleue (Tableau 4), aucun mouvement pigmentaire n'est observé, quelle que soit la zone. Aucune zone ne présente de différence significative entre avant et après le crépuscule. Les observations faites avant le crépuscule ne se distinguent pas de celles faites après le crépuscule (Tableau 5).

4. Discussion

En conditions constantes d'éclairement, plusieurs auteurs ont constaté la persistance des migrations (Esterly 1917, Berthon 1988, Haney 1993) lesquelles peuvent aussi persister *in situ* en l'absence du signal lumineux adéquat (Berthon & Buisson 1984). Il existe donc des migrations verticales en absence de stimuli environnementaux, en l'occurrence de variations d'éclairement. On peut penser alors à l'intervention d'une horloge biologique interne dans le mécanisme qui déclenche la migration des organismes, même en absence de signal extérieur.

Cependant, lorsqu'un tel signal existe (par exemple en LD), l'oscillateur synchronise son activité sur le rythme du facteur externe. En conditions naturelles, l'alternance jour / nuit ne joue pas le rôle de déclencheur mais celui de synchroniseur du déclencheur interne.

Des mouvements de pigments se produisent en LD. La persistance des variations des pigments en LL blanc suggère que l'œil joue le rôle d'oscillateur interne ou du moins participe à l'horloge biologique contrôlant les migrations nyctémérales chez *Daphnia*.

La lumière bleue inhibe la migration verticale de *Daphnia* (Berthon 1988). Il nous a alors paru intéressant d'observer l'œil des organismes éclairés en lumière

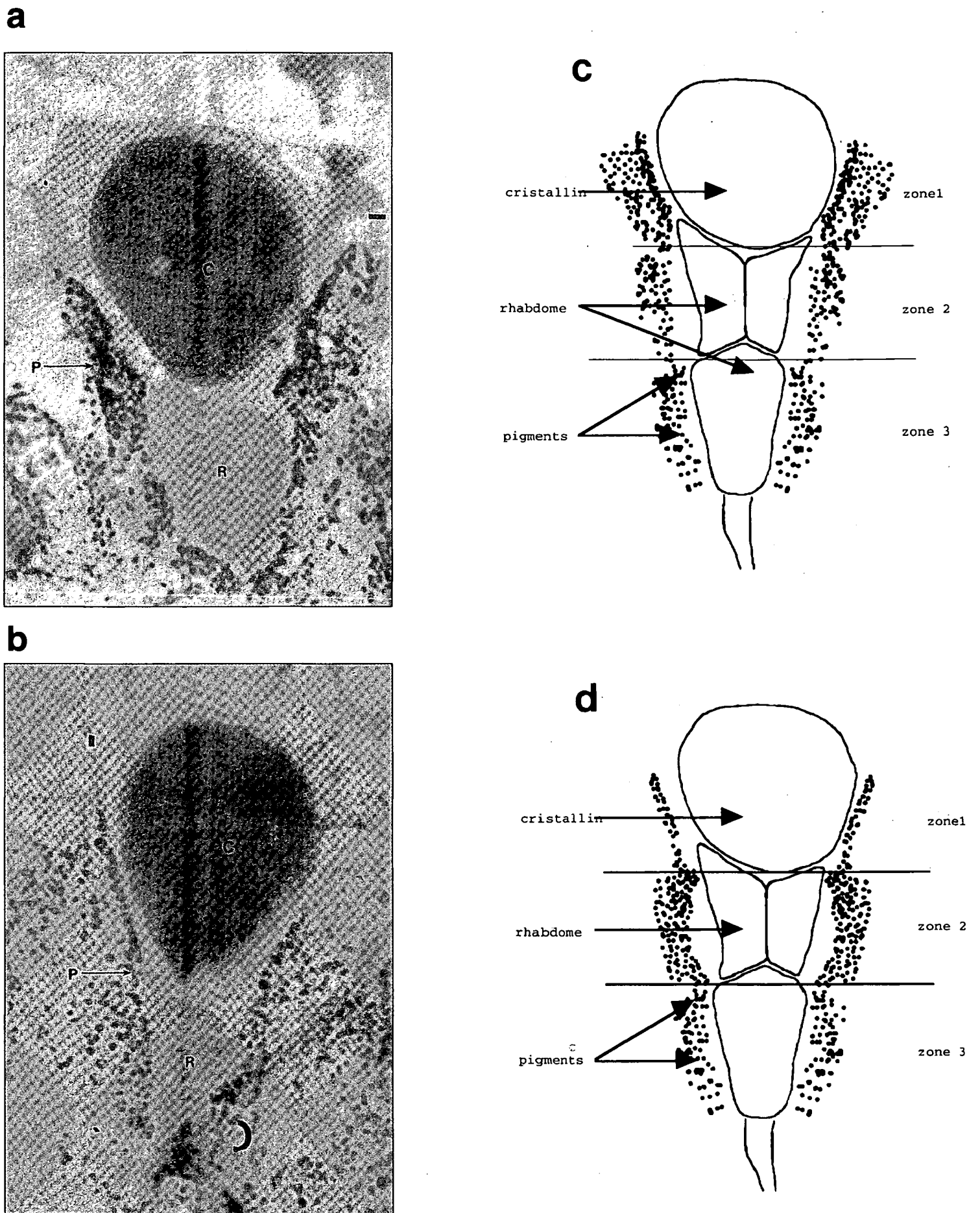


Fig. 2. a - Photo d'une coupe d'oeil à 17 heures (1 heure avant le crépuscule). b - Photo d'une coupe d'oeil à 19 heures (1 heure après le crépuscule). c - Représentation schématique d'un oeil coupé à 17 heures (1 heure avant le crépuscule). d - Représentation schématique d'un oeil coupé à 19 heures (1 heure après le crépuscule).

Fig. 2. a - Photo of an eye fixed at 5 p.m. (1 hour before dusk). b - Photo of an eye fixed at 7 p.m. (1 hour after dusk). c - Schematic representation of an eye fixed at 5 p.m. (1 hour before dusk). d - Schematic representation of an eye fixed at 7 p.m. (1 hour after dusk).

Tableau 1. Densités moyennes des pigments, avant et après le crépuscule, exprimées en surface (μm^2) et résultats du test t de Student, par zone en alternance jour/nuit.

Table 1. Average densities of pigments, before and after dusk, expressed in surface (μm^2) and results of the Student t test, for each zone under alternating day/night conditions.

	Heure	Fréquence	Moyenne	Déviati on standard	
Zone 1	-1h	17	20,83	2,41	t : 8,31
	+1h	13	14,60	1,36	p : 0,0001
Zone 2	-1h	17	24,09	2,52	t : -7,32
	+1h	13	32,12	3,49	p : 0,0001
Zone 3	-1h	17	23,97	3,07	t : 0,74
	+1h	13	23,15	2,93	p : 0,4628

Tableau 2. Densités moyennes des pigments, avant et après le crépuscule subjectif, exprimées en surface (μm^2) et résultats du test t de Student, par zone en conditions constantes d'éclairc
ement.

Table 2. Average densities of pigments, before and after subjective dusk, expressed in surface (μm^2) and results of the Student t test, for each zone under constant conditions of light.

	Heure	Fréquence	Moyenne	Déviati on standard	
Zone 1	-1h	14	20,80	2,60	t : 5,78
	+1h	11	15,56	1,68	p : 0,0001
Zone 2	-1h	14	25,69	2,99	t : -3,72
	+1h	11	30,23	3,06	p : 0,0011
Zone 3	-1h	14	25,36	2,41	t : 4,28
	+1h	11	21,64	1,76	p : 0,0003

Tableau 3. Résultats du test T^2 de Hotteling entre les moyennes avant et après le crépuscule, en alternance jour/nuit (LD) et en conditions constantes d'éclairc
ement (LL).

Table 3. Results of the T^2 Hotteling test for the comparisons of means before and after dusk, under alternated light (LD) and under constant conditions of illumination (LL).

	LD -1 / LD +1	LL -1 / LL +1
T^2	304,46	247,99
	p < 1 %	p < 1 %

Tableau 4. Densités moyennes des pigments, avant et après le crépuscule, exprimées en surface (μm^2) et résultats du test t, par zone en alternance bleu/nuit .

Table 4. Average densities of pigments, before and after dusk, expressed in surface (μm^2) and results of the t test, for each zone under alternating blue/night .

	Heure	Fréquence	Moyenne	Déviati on standard	
Zone 1	-1h	70	43,81	23,89	t : 0,46
	+1h	62	41,40	35,52	p : 0,64
Zone 2	-1h	70	41,88	17,18	t : 0,47
	+1h	62	39,99	27,71	p : 0,63
Zone 3	-1h	70	47,65	23,83	t : 1,91
	+1h	62	39,21	26,84	p : 0,05

Tableau 5. Résultats du test T^2 de Hotteling entre les moyennes avant et après le crépuscule, en alternance bleu/nuit.

Table 5. Results of the T^2 Hotteling test for the comparisons of the means before and after dusk, under alternating blue/night LD.

	LD -1 / LD +1
T^2	1,40
	p = 0,24

re bleue. Nous n'avons pas observé de déplacement significatif de pigments en LD bleu. L'absence de mouvement des pigments le long des rhabdomes paraît en relation avec l'absence de migration des daphnies. Le mouvement des pigments semble donc correspondre à l'oscillateur interne responsable du mouvement migratoire des daphnies. Cet oscillateur est synchronisé par les variations d'éclairement en lumière blanche.

5. Conclusion

Le maintien des migrations en conditions constantes suggère l'existence d'une composante interne intervenant dans leur mécanisme. D'une part, la persistance des déplacements de pigments en conditions constantes d'éclairement et d'autre part, le fait que la lumière bleue (LD) inhibe à la fois les migrations verticales des organismes et celle des grains de pigments autour des ommatidies indiquent que les phénomènes observés dans l'œil constituent probablement l'oscillateur interne contrôlant le rythme des migrations verticales journalières chez *Daphnia*.

La suite de ce travail aura pour but de répondre aux deux questions qu'il soulève :

- comment la lumière bleue inhibe-t-elle le déplacement des pigments dans l'œil et, par conséquent, les migrations verticales des daphnies ?
- comment l'information du blocage des pigments est-elle transmise aux effecteurs du déplacement des organismes ?

Concernant cette seconde question, nous recherchons d'éventuelles modifications au niveau du système nerveux, qui est réduit chez les Cladocères, comme, par exemple, une production de neurosécrétions variant entre le jour et la nuit.

Travaux cités

- Angeli N., Pont D. & Pourriot R. 1995. — Hétérogénéité spatiale et migration du plancton, in *Limnologie générale*. Pourriot R. & Meybeck (eds) M. Masson, Collection d'écologie 25, Paris : 411-440.
- Berthon J. L. & Buisson B. 1984. — Mise en évidence d'une composante interne dans les migrations nyctémérales de Crustacés planctoniques. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 22 : 1498-1503.
- Berthon J. L. 1988. — Contenu énergétique, migrations et stratégies du zooplancton lacustre. Thèse Univ. de Saint-Etienne : 313 p.
- Esterly C. O. 1917. — The occurrence of a rhythm in the geotropism of two species of plankton Copepods when certain recurring external conditions are absent. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 16, (21) : 393-400.
- Grover P. B. & Miller R. J. 1984. — Effects of Crepuscular Photoenvironment on Light-Induced Behavior of *Daphnia*. *Physiology & Behavior*, 33 : 729-732.
- Haney J. 1993. — Environmental control of diel vertical migration behaviour. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 39 : 1-17.
- Nilsson D. E. & Odselius R. 1981. — A new mechanism for light-dark adaptation in the *Artemia* compound eye (Anostraca, Crustacea). *J. Comp. Physiol.*, 143 : 389-399.
- Ringelberg J. & Flik B. J. G. 1994. — Increased phototaxis in the field leads to enhanced diel vertical migration. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 8 : 1855-1864.