

**Revue et nouvelles données sur la sensibilité à la lumière
et orientation non-visuelle chez *Proteus anguinus*,
Calotriton asper et *Desmognathus ochrophaeus*
(Amphibiens urodèles hypogés)**

par

Peter A. SCHLEGEL⁽¹⁾⁽²⁾, Wolfgang BRIEGLEB⁽²⁾, Boris BULOG⁽³⁾
et Sebastian STEINFARTZ⁽⁴⁾

⁽¹⁾Laboratoire souterrain, CNRS
09200 Moulis, St. Giron, France

⁽²⁾Department Biologie II, Biozentrum der LMU, Grosshadenerstr. 2
D-82152 Planegg-Martinsried, Germany
schlegel@zi.biologie.uni-muenchen.de

⁽³⁾Department of Biology, Biotechnical Faculty
University of Ljubljana, Vecna pot 111, POBox 2995
1001 Ljubljana, Slovenia
boris.bulog@bf.uni-lj.si

⁽⁴⁾University of Bielefeld
Department of Animal Behaviour, Morgenbreede 45
D-33615 Bielefeld, Germany
Sebastian.Steinfartz@uni-bielefeld.de

Résumé - Cette revue fait le tour d'horizon de quelques systèmes sensoriels dont peuvent se servir certains urodèles troglaphiles et troglobies pour s'orienter de manière "aveugle" dans leur habitat extrême souterrain. Récemment, un nouveau sens, qui permet aux animaux de s'orienter selon le champs magnétique terrestre ou de naviguer à partir de ladite référence primordiale magnétique et en coopération avec le sens de gravité, a été mis en évidence. De plus, travailler expérimentalement avec des stimuli magnétiques permanents permet de découvrir des seuils de tolérance d'intervention en compétition avec d'autres systèmes sensoriels chez ces animaux. L'audition sous-aquatique en particulier et aussi les stimuli visuels et mécaniques ont été étudiés chez le Protée, mais l'odorat et le sens électrique qui sont bien développés chez les urodèles n'ont pas encore été testés avec cette méthode. En général, toutes les capacités sensorielles non-visuelles pourraient faciliter toutes ou certaines stratégies comportementales d'orientation qui compensent l'orientation visuelle exclue en environnement naturel ou pendant les expériences. Quelques tests aux allozymes ont démontré des différences génétiques significatives entre deux populations endémiques pyrénéennes de *Calotriton asper*, provenant d'habitats distincts mais voisins, une des populations testée vivant à la surface, l'autre dans une grotte voisine. Ces différences génétiques sont renforcées par des différences sensorielles relatives aux systèmes élec-

triques et magnétiques. Ces résultats et des considérations éthologiques et écologiques nous amènent à la conclusion que des cavernicoles (et éventuellement des organismes d'océans profonds) sont plus aptes à acquérir et utiliser des sens non-visuels facilitant l'orientation spatiale. En comparaison avec leurs parents épigés, les animaux colonisant des cavernes et des endroits sombres ont conservé et réactivé d'anciennes propriétés sensorielles qui leur permettent de survivre avec succès dans des habitats dépourvus de lumière. Les dites espèces sœurs de surface ne se servent apparemment plus de ces systèmes sensoriels très développés ou les ont perdus seulement depuis peu (Glaciation de Würm il y a 36 000 ans). Le Plethodontidé d'Amérique, *Desmognathus ochrophaeus*, est en partie adapté à la vie souterraine et démontre un sens magnétique bien développé, tandis que ses cousins *D. monticola* et *D. quadrimaculatus*, tous deux épigés et vivant dans des habitats plutôt sombres également n'exposent pas de sens magnétique selon notre méthode expérimentale. L'axolotl (*Ambystoma trigrinum/mexicanum*) provenant de souches de laboratoire, l'ibérique *Pleurodeles waltl* et *Triturus montandoni* des Carpates, tous temporairement vivant dans l'obscurité montrent des alignements aux champs magnétiques, mais il était plus difficile de le démontrer expérimentalement dans chaque cas, car ces espèces ont tendance à s'habituer au contexte expérimental et finissent par ne réagir que peu ou trop peu aux champs magnétiques. Ces diverses observations suggèrent que le sens magnétique chez les urodèles (développé de manière primaire) n'a pas pu être mis en évidence par notre méthode expérimentale ou n'est pas simplement activé ou désactivé en cas de besoin. Dans cette hypothèse, ce sens magnétique serait plutôt une acquisition phylogénique fixée génétiquement de manière éparse dans certaines populations vivant soit en surface, soit dans des cavernes.

Mots-clés: Sensitivité à la lumière, Yeux rudimentaires/peau, Orientation non-visuelle, Urodèles cavernicoles.

Summary - Review and new data on light sensitivity and non-visual orientation in *Proteus anguinus*, *Calotriton asper* and *Desmognathus ochrophaeus* (Hypogean Amphibian; Urodela). A review is given on several sensory systems that enable troglophile and troglobian urodele species to non-visually orient in their extreme hypogean habitat. In particular, recently a new sense was discovered allowing the animals to compass-orient according to the Earth's magnetic field which could serve as a basic and, only in correlation with gravity-perception, would be an always available reference for orientation. Moreover, working with permanent magnetic field stimuli offers a very sensitive experimental method to discover the urodeles' thresholds for light and acoustical stimuli and perhaps other senses in competition to the magnetic one. Olfaction as well as electrical and mechanical senses were not studied yet with this method, but underwater hearing was. In general, all non-visual sensory capabilities may facilitate certain behavioral strategies which compensate for missing visual orientation. Some genetically differentiating tests, comparing two populations of the endemic Pyrenean species, *Calotriton asper* from separated habitats, surface and cave, as well as ethological and ecological considerations led to the conclusion that cavernicoles (and eventually deep sea organisms) are more likely to own and regularly use the sensorial opportunities of a magnetic sense for spatial orientation: Compared to their epigeal relatives, cave animals may have retained phylogenetically older sensorial properties, transformed or improved them, or finally acquired new ones which enable them to successfully survive in dark habitats. Sister species/ populations living at the surface did not necessarily take advantage of these highly evolved sensory systems and orientation strategies of the troglobian species and may have lost them. E.g. *Desmognathus ochrophaeus* is partly adapted to cave life and exhibits good magnetic sensitivity, whereas, *D. monticola* and *quadrimaculatus* are epigeal and, although living in rather dark places at the surface, did not demonstrate magnetic sensitivity with our method used. Axolotl (*Ambystoma tigrinum/mexicanum*) from laboratory bred strains and the Spanish newt, *Pleurodeles waltl*, and *Triturus montandoni*, frequently living in dark habitats, too, showed alignments to magnetic fields eventually, but it was more tedious to obtain significant results. These diverse observations suggest that the primarily developed magnetic sense in urodeles is not simply "switched on or off" if nec-

essary, but may be a basic(ally) phylogenetic acquisition, now only loosely fixed genetically in certain surface/cave populations, or has not shown up by the method used.

Key-words: Light sensitivity, Rudimentary eyes/skin, Non-visual orientation, Hypogean Urodeles

I. INTRODUCTION

D'un point de vue éco-physiologique, on accepte l'hypothèse générale que les animaux cavernicoles ont du, parmi d'autres adaptations à la vie souterraine, développer et améliorer leurs systèmes sensoriels non-visuels pour pouvoir s'orienter dans leurs habitats dépourvus de lumière. La vie souterraine aurait ainsi amené le Protée, en outre, à spécialiser son oreille interne de façon à plutôt garder, voir affûter son audition larvaire, déjà adaptée aux conditions acoustiques sous l'eau, pour toute sa vie aquatique (par exemple Bulog 1989a, 1989b, Bulog et Schlegel 2000). La valeur spécialement adaptée de son labyrinthe otique est basée sur un arrangement complexe des ciliats de cellules sensorielles auditives de sa macula sacculaire, permettant au système nerveux central (CNS) d'analyser la direction d'ondes

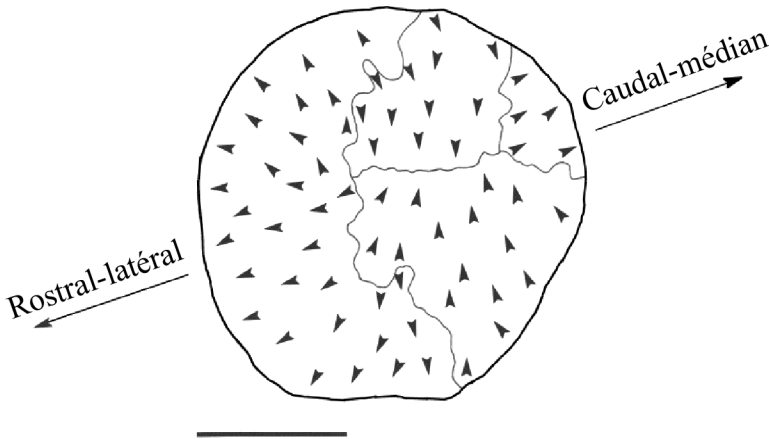


Figure 1 : Complexe morphologico-fonctionnel des cellules sensorielles de la macula sacculaire du Protée, projetée dans un plan. Les flèches indiquent l'orientation morpho-fonctionnelle des cellules sensorielles ciliaires dans les 4 subdivisions de l'organe auditif (dans le sens d'une aiguille d'une montre) : aire rostrale à gauche, aire dorso-médiale en haut, aire caudale à droite et aire ventro-latérale à droite en bas. Les pointes des flèches indiquent les directions dans lesquelles les cellules sont les plus sensibles (= positions de stéréocils des cellules ciliaires, excitatrices) aux ondes sonores (sensibilité aux déplacements de particules). Barre = 100 μ m.

Figure 1: Complex functional-morphological orientation pattern (arrows) of sensory hair-cells in the saccular macula of *Proteus anguinus*. Bar = 100 μ m.

sonores grâce aux déplacements des bottes de cils, qui réagissent à la vitesse/déplacements des particules/molécules d'eau (voir figs 1 et 2).

Une autre possibilité d'orientation non visuelle, premièrement décrite par Schlegel (1996) a été démontrée chez au moins 3 espèces d'urodèles hypogés cavernicoles, le Protée *Proteus anguinus*, l'Euprocte des Pyrénées *Calotriton asper* (ex *Euproctus asper*) et la salamandre sombre de la montagne d'Allegheny *Desmognathus ochrophaeus*, qui s'alignent spontanément selon les lignes et la polarité du champ magnétique terrestre et même à ses déviations artificielles, ce qui met en évidence un sens magnétique important pour se déplacer dans l'obscurité (Schlegel, données non publiées ; Schlegel et Renner, données non

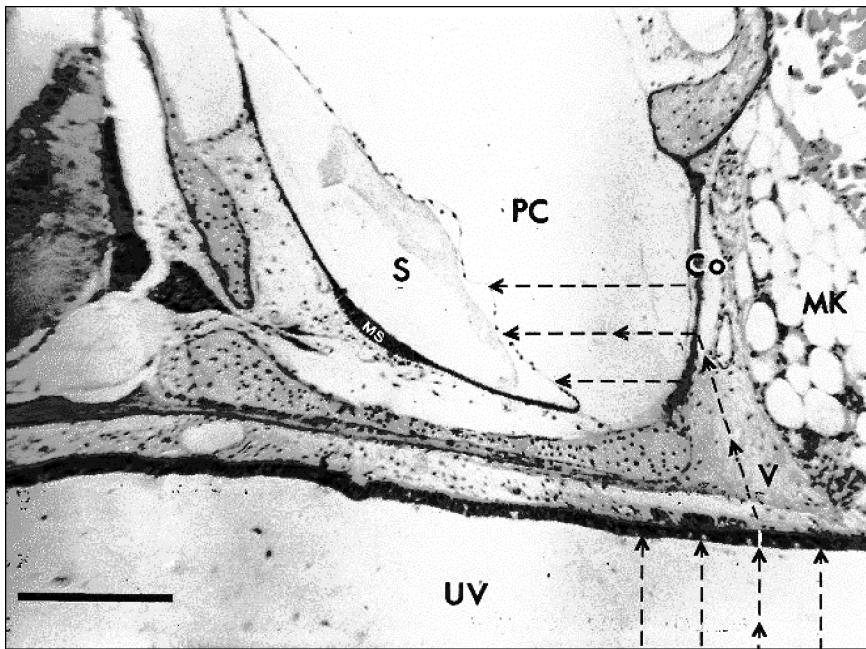


Figure 2 : Coupe transversale du labyrinthe dans la région de la saccule et de la macula sacculaire. La transmission d'ondes sonores est proposée selon les flèches arrivant du plafond de la cavité orale (UV) à travers du tissu connectif fibrillaire vers la columelle (Co) de la fenêtre ovale. La propagation d'ondes sonores continue à travers la citerne périotique (PC) envers la saccule (S) et jusqu'aux épithéliums sensoriels individuels. Barre = 500 μ m.

Figure 2: Cross section of the otic labyrinth in the region of the sacculus and saccular macula. Proposed sound waves transmission (arrows) from the ceiling of the oral cavity (UV) through the fibrillar connective tissue (V) to the columella (Co) of the oval window. The propagation of the sound waves would continue through the periotic cistern (PC) to the sacculus (S) and then proceed to the individual sensory epithelia. Bar = 500 μ m.

publiées). Le mécanisme sensoriel impliqué le plus probable, et les plus souvent suggéré, est le type “magnétite” (particules de matériaux magnétiques permanents ou para-supra-magnétiques), connu pour permettre cette l’orientation magnétique sans lumière (Deutshländer *et al.* 1999, Diebel *et al.* 2000, Fleissner *et al.* 2003, Hanzlik *et al.* 2000, Winklhofer *et al.* 2001).

Si les références non-visuelles connues pour s’orienter sont présentes et disponibles, elles pourraient, ensemble, être suffisantes pour permettre aux animaux cavernicoles de se déplacer efficacement dans leur habitat souterrain. De plus, la thigmotaxie pratiquée sur le substrat, bien connue chez les cavernicoles, se rajoute aux capacités d’orientation générale pour se repérer dans un espace dépourvu de lumière (voir par exemple Briegleb 1962, 1963, 1974). L’orientation magnétique reste une possibilité de mécanismes d’orientation toujours disponible pour les cavernicoles et elle pourrait ainsi servir de référence pour tous les autres moyens d’orientation. Ceci est ainsi bien connu chez de nombreuses espèces d’oiseaux migrateurs où les jeunes qui disposent dès la naissance d’un sens magnétique primordial, doivent cependant apprendre, petit à petit au cours de leur développement, à se servir de celui-ci comme référence pour tous les autres mécanismes d’orientation (Wiltschko et Wiltschko 1995, Wiltschko et Wiltschko 2003).

Le but de ce travail est de présenter une synthèse des travaux réalisés sur la capacité d’orientation non-visuelle chez *Proteus anguinus*, *Calotriton asper* et *Desmognathus ochrophaeus*, effectués au laboratoire souterrain de Moulis (France).

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Espèces étudiés

Les spécimens de *Proteus anguinus* ont été fournis par le Laboratoire de biologie souterraine du CNRS de Moulis grâce à son élevage, entretenu depuis des années 50/60 dans la grotte “laboratoire”. Certains spécimens proviennent directement de résurgences karstiques en Slovénie (étude de l’oreille, l’œil et l’ouïe au laboratoire de la faculté de Biologie de l’Université de Ljubljana). Endémique des Pyrénées, *Calotriton asper* vit dans des ruisseaux de surface à moyenne et haute altitude (jusqu’à 2400 m), mais il y a aussi plusieurs populations isolées dans certains ruisseaux souterrains karstiques. Les spécimens utilisés provien-

ment des élevages comme celui de la grotte laboratoire de Moulis et de l'Institut (et du Muséum) de l'Université de Hambourg (Allemagne), élevage récemment transféré au "Bio-centre" de l'Université de Munich (Allemagne). Les Pléthodontidés d'Amérique de Nord *Desmognathus ochrophaeus*, *D. monticula* et *D. quadrimaculatus* sont issus d'un élevage de l'Université de Bremen (Allemagne). D'autres espèces d'urodèles ont été étudiées occasionnellement si une vie semi-souterraine ou partiellement dépourvue de lumière était vraisemblablement écologiquement. Des *Ambystoma mexicanum*, *Triturus montadoni*, *T. alpestris*, *T. vulgaris*, *T. cristatus*, et *Pleurodeles waltl* ont ainsi été testés (dons des collègues Pr. Dr. G. Roth, Dr. U. Dicke, et Pr. Dr. J. Parzefall).

B. Conditions expérimentales

Les expériences ont été effectuées dans la grotte laboratoire de Moulis, dans un milieu semi-naturel (température ambiante de 12°), et au laboratoire de l'Institut de Zoologie de l'Université de Munich (Allemagne), dans une cave avec des températures variant de 14 à 18°C.

À l'exception du seul Protée, les animaux testés ne sont pas aveugles, mais ils étaient tous rendus aveugles expérimentalement car observés sous lumière infrarouge (moins de 50 μ W de luminosité). Leurs déplacements et alignements dans un cristallier de 30 cm de diamètre ont été enregistrés sur bande vidéo avec une camera IR ou bien en temps réel ou en échantillons de 10 secondes par minute, afin de compter le nombre d'arrêts directionnels de l'animal et d'obtenir une estimation de la direction préférée pendant une session de 8 à 24 heures. Les arrêts d'au moins d'une seconde ont été attribués lors du dépouillement des enregistrements dans les 8 secteurs majeurs (N, NE, E, SE, S, SO, O, NO), en prenant la direction de la tête ("heading"), quelle que soit la direction du corps. La direction préférée d'un animal pendant une session sous une condition magnétique constante est estimée par la somme des arrêts classés suivant les 8 classes de direction, et représentée par le calcul du vecteur moyen (Batchelet 1981). La longueur de ce vecteur permet d'estimer la signification statistique de la direction de déplacement. La moyenne des vecteurs calculés sur plusieurs sessions du même animal, enregistré sous des conditions magnétiques identiques à plusieurs reprises (échantillons indépendants) permet d'estimer une grande moyenne par animal. Lorsqu'il existe une direction magnétique préférée commune pour un ensemble d'animaux, un vecteur commun pour tous les animaux testés peut être calculé comme la grande moyenne par espèce. Les dif-

férences entre individus et entre “populations” ont été testées par le test de Wilcoxon (Concepts & Applications of inferential statistics: <http://faculty.vassar.edu/Lowry/VassarStats.html>) et de Watson-Williams (Batchelet 1981, program “Oriana 2”, warrenK@kov-comp.com).

C. Otohistochimie et immunocytochimie

Pour le marquage immunologique sur coupes semi-fines, des coupes frontales à travers les yeux et des coupes sagittales de la glande pinéale (0,7-1,0 μm) ont été faites sur un ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut). Les coupes individuelles d’une série étaient placées sur des lames séparées et numérotées consécutivement. La résine d’inclusion était dissoute avec du méthoxide de sodium, et les coupes ont été rincées de suite avec du benzène de méthanol, du méthanol et de l’eau. Des sites de complémentarité non-spécifique ont été bloqués par incubation des coupes dans 1% de sérum albumine bovin, tamponné au phosphate (BSA/PBS) pendant 30 minutes. Les anticorps primaires ont été appliqués pour 1-18 heures à la température ambiante, les coupes rincées dans du PBS et exposées aux anticorps secondaires biotinylés, dilués 1:250 avec BSA/PBS (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 1,5 heures. Après avoir été rincées dans du PBS, des groupes de biotinyl ont été détectés par la solution ABC, diluée 1:50 pour 45 minutes. Le Diamminobenzidine (DBA) était utilisé en chromogène (incubation 6 minutes à 20°) en présence de 0.002% peroxyde d’hydrogène. Après rinçage dans l’eau, les coupes ont été montées dans du glycérol pour la microscopie photonique et photographiées avec un photomicroscope Zeiss Axiopot 1, équipé du contraste de phase et de l’interférence différentielle contrastée (optique Nomarsky). Pour comparer la réactivité immunologique de la même cellule réceptrice, des micrographes (lumière) ont été pris sur des régions identiques, ou des coupes consécutives ont été exposées aux différents anticorps primaires (Kos *et al.* 2001).

III. RÉSULTATS

A. Alignements d’animaux selon le champ magnétique permanent

Les urodèles cavernicoles se dirigeaient spontanément et individuellement vers un but imprédictible (Schlegel, 1996), c’est-à-dire dans une direction magnétique particulière sous

le régime du champ magnétique terrestre ($n = \text{naturel}$). Ceci a été vérifié sur le même spécimen avec des champs magnétiques artificiellement imposés, soit renversés ($mN = S$), soit déviés de $\pm 90^\circ$ ou 135° ($mN = E/SE$ par exemple) : les animaux choisissaient toujours une direction géographiquement opposée ou tournée de $90^\circ/135^\circ$ dans le sens magnétique sollicité (fig. 3). Les animaux suivent les lignes du champ tant que les intensités magnétiques verticales et horizontales appliquées restent dans l'ordre du champ magnétique terrestre local

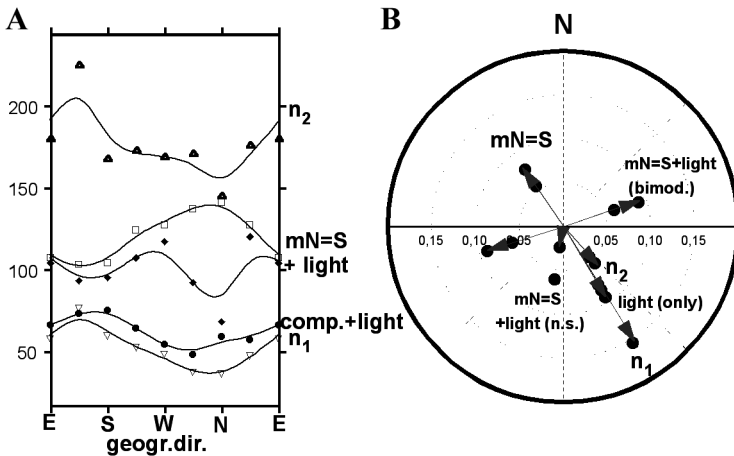


Figure 3 : Réactions d'un Protée aux champs magnétiques naturels et inversés et à une source de lumière dans la salle d'Argile de la grotte de Moulis (Ariège). **A**. Distributions des choix d'animal sous condition magnétique naturelle (n_1 avec lumière supplémentaire et n_2 sans lumière supplémentaire, deux prises de données) et en étant inversée horizontalement sans lumière supplémentaire ($mN = S$). En plus, la réaction positive à la lumière seule, placée au sud, a été enregistrée pendant que le champ magnétique naturel était compensé (comp.). Lorsque la lumière était allumée pendant le régime " $mN = S$ " l'animal réagissait aux deux facteurs d'une manière mixte, donc plutôt bimodale (E/O, à comparer avec la représentation en B). Les données originales (symboles) ont été lissées par un algorithme de spline pour mieux montrer les fonctions sinusoïdales adaptées (lignes). **B**. Somme les résultats de A dans une représentation polaire dont les valeurs du test de Rayleigh étaient pour n_1 , 9,9 ; n_2 , 3,32 ; $mN = S$, 5,9 ; $mN = S + \text{lumière}$, 6,55 bimodales (toutes significatives pour un seuil à 5%).

Figure 3: Reactions of a *P. anguinus* to magnetic field conditions and to a light source at SE (run in the "salle d'argile" of Moulis cave). **A**. Distributions of animal's choices under normal (n_1 and n_2 , two data sets) and reversed horizontal field vectors ($mN = S$). In addition, the reaction to the "light (only)" source while the horizontal field was compensated (comp.) and the result of an experiment with the same light on while the magnetic field vector was reversed are shown ($mN = S + \text{light}$, bimod.): bimodal distribution due to magnetic and light effects. A one-modal circular treatment of that data set did not provide a significant favored direction ($mN = S + \text{light}$ n.s.). As data are drawn with approximating spline routine the sinusoidal nature of the functions is visualized. **B**. Summarizes the results of A in a polar plot: n_1 , Rayleigh-value 9.9; n_2 , Rayleigh-value, 4.32; $mN = S$, Rayleigh-value, 5.9; $mN = S + \text{light}$, bimod, Rayleigh-value 6.55 (all significant at $p < 0.05$).

(horizontalement 220 mGauss et verticalement 340 mGauss environ à Moulis et à Munich, ce qui produit des inclinaisons de 56° et 63°). Les choix sont moins nets avec une intensité horizontale réduite à un demi ou un quart. Les champs augmentés d'un facteur de 2 à 3 par rapport à la normale sont perçus par les animaux, mais des combinaisons localement aberrantes faussent les résultats ou les rendent impossible (voir ci-dessous).

B. Alignements d'animaux selon le champ magnétiques et/ou aux facteurs sensoriels non-magnétiques

Si le vecteur horizontal magnétique naturel est compensé par un champ magnétique artificiel opposé (le vecteur magnétique vertical reste stable, mais ne donne pas d'information magnétique horizontale, inclinaison 90°), les animaux ne sont pas toujours désorientés comme attendu sous l'hypothèse d'une direction aléatoire, mais ils indiquaient souvent une direction autre que celle due au champ. Les animaux avaient trouvé une autre source d'orientation, comme la lumière ou des bruits parasites localisés (qui n'interagissaient pas avec le champ magnétique). Dans quelques cas particuliers, ces sources s'avéraient vraiment effectives. Les animaux ne prenaient pas simplement la résultante de l'information magnétique et de l'autre source, mais ils se dirigeaient alternativement vers l'une ou vers l'autre durant toute la session. Le vecteur moyen calculé traduit cette résultante, et les deux maxima observés dans la distribution des choix reflète cette orientation alternative (fig. 3A, B: $mN = S + \text{lumière}$; comp. + lumière et figs 4/6: distraction par bruits).

Dans certains cas, les spécimens préféraient toujours une direction géographique privilégiée quelque soit le champ magnétique présent. Cette source était peut-être plus facile à localiser et à suivre que le magnétisme. Sous le régime "comp.", ces références compétitives étaient le plus souvent détectables par l'observateur et ont pu être éliminées expérimentalement.

Enfin, un animal, après avoir testé sous la condition "comp.", pouvait ensuite dévier de sa direction magnétique préférée d'origine et s'adaptait à la nouvelle source d'orientation. Ce phénomène peut être observé lorsqu'on introduit un marqueur géographique important comme un tube pour s'y cacher, ce dernier étant toujours très attractif pour les animaux cavernicoles (et de surface). Après avoir éliminé la source compétitrice, un animal a de nouveau suivi le champ magnétique renversé (fig. 3A, B, $mN = S$).

Pour éviter les sources sonores gênantes (sons aléatoires), nous avons diffusé un bruit de fond (bande passante < 3 kHz, de type “cascade”) relativement fort (80- 90 dB SPL), émis par un haut-parleur accroché au-dessus de la camera vidéo et dirigé vers le container d’observation. Ce bruit supprimait effectivement les réactions d’animaux dues aux parasites sonores (fig. 6).

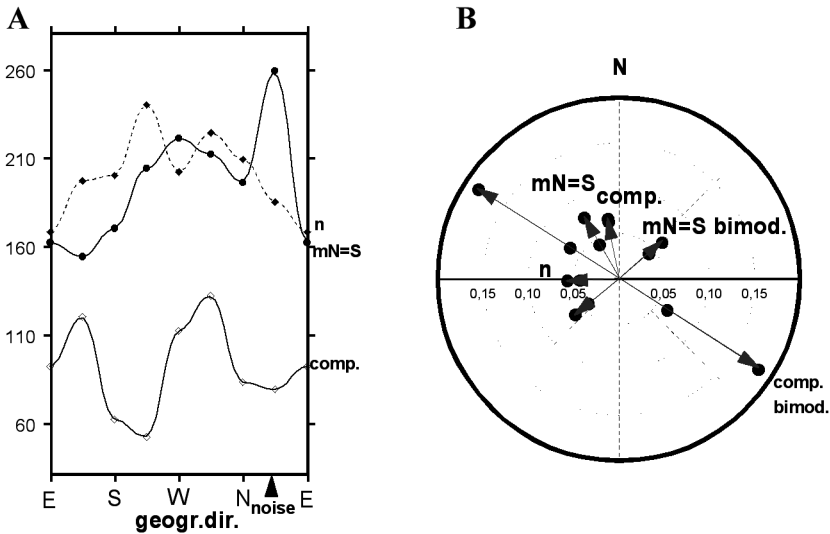


Figure 4 : A. Réaction auditive négative d’un Protée à une source de bruit isolée venant du NE (flèche : eau coulante), pendant que le vecteur magnétique horizontal était compensé artificiellement (comp.). Les maximums des courbes sous des conditions magnétiques opposées (n = naturelle ; mN = S, inversée) tombent bien opposés de 180° aux SO et NE, mais la superposition des deux effets (réactions aux sons et aux champs magnétiques) ne permet pas de calculer de vecteurs polaires nets et appropriés aux conditions bi-factorielles (magnétiques et sonores ; voir représentation polaire en B).

Figure 4: A. Reactions of a *Proteus* to a noise source alone (running water pipes, located at NE, arrow) when the horizontal magnetic vector was compensated (comp.) and to the normal (n) and reversed magnetic field (mN = S), as labeled in A: the respective peaks lay 180° out of each other superimposed on phonotaxis. Neither mono- nor bimodal circular statistics in (B) can reproduce the data of (A) properly as averaging over bi-factorial distributions

C. Photo et phonotaxie

En fonction de l’intensité des sources de références compétitives (lumière ou sons), les animaux s’orientaient envers, positivement ou s’en tenaient à l’écart, négativement, par rapport à la source : ils démontraient de la phonotaxie ou de la phototaxie (voir les exemples dans les figs 3 et 4). La lumière, d’une intensité de 1 Lux (environ 0,1 μW) provoquait des réactions positives, tandis que plus de 10 Lux aboutissaient à des phototaxies négatives. Des

événements sonores attireraient les animaux, ou bien provoquaient leur fuite (Fig. 6). Les Protées sont très sensibles aux déclics de relais et aux bruits produits par la table tournante, utilisée pour supprimer les effets possibles de marques chimiques ou du relief du substrat (capacités thigmotactiques du Protée). Des sonorités naturelles, typiques pour des grottes et habitats aquatiques comme des bruits de gouttelettes ou de ruissellements d'eau, estimées et mesurées dans la grotte de Moulis et dans le laboratoire de la cave à Munich de l'ordre de 30-40 dB SPL (mesurées dans l'air), étaient fort bien détectées par le Protée. Ces excellentes capacités auditives sous l'eau ont été démontrées avec une méthode psycho-acoustique en Slovénie (voir l'audiogramme de la fig. 5, repris de Bulog et Schlegel 2000; après revision, seuils à être rapportés à 40-50 dB rel. 1µPa).

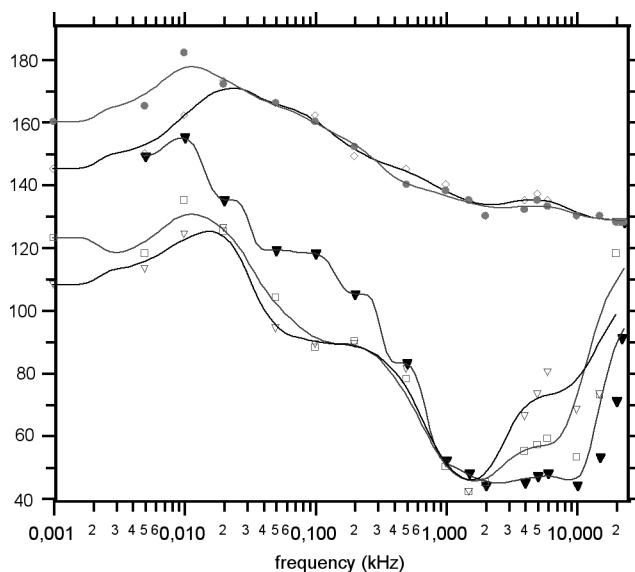


Figure 5 : Audiogrammes enregistrés sous l'eau sur des spécimens de Protée provenant de différentes localités et populations en Slovénie (rectangles, le spécimen blanc avec les meilleurs seuils ; triangles, valeurs moyennes calculées sur tous les "blancs" ; triangles pleins, spécimens noirs). Les symboles et lignes au-dessus des courbes mesurées marquent les niveaux de sons maximaux disponibles du haut-parleur aquatique utilisé (avec une atténuation de 0 dB, mesuré à l'emplacement de l'animal). Axe des ordonnées : niveau sonore en dB relatif à 1 µPascal pression prise comme standard conventionnel.

Figure 5: Under water audiogram of specimens of white (squares, white, best specimen, triangles, average over whites) and black (filled triangles) *Proteus* populations of Slovenia. Approximating lines calculated as splines and drawn on the base of the measured points (Axum 6 graphic program). Lines on top of the graph indicate the maximal pressure levels available (two calibrations: ordinate given in dB relative 1 µPascal) from the under water loud speaker at the position of the animal obtained with 0 dB attenuation; x-axis given in log of frequency (kHz)

Nous n'avons certainement pas détecté toutes les sources non-magnétiques déroutantes (sons, lumière, etc.), mais la direction en devenait apparente par la direction moyenne choisie par l'animal. Le Protée est particulièrement capable de se servir des ces moindres informations. Par exemple, dans le laboratoire à Munich, des sons très faibles venaient du NE (bruits d'eau courante dans la tuyauterie), à peine audibles (fig. 4). Les brouilleurs sonores efficaces devaient être suffisamment forts (voir ci-dessus) pour complètement masquer ces parasites faibles (fig. 6). Ceci démontre encore une fois la très bonne sensibilité directionnelle du système auditif de cet animal (fig. 1, Bulog 1989a, b, Bulog et Schlegel 2000), et met en évidence combien à l'obscurité, les animaux peuvent trouver opportunistiquement des références non-visuelles d'orientation pour remplacer un sens visuel qui est prépondérant dans un autre environnement.

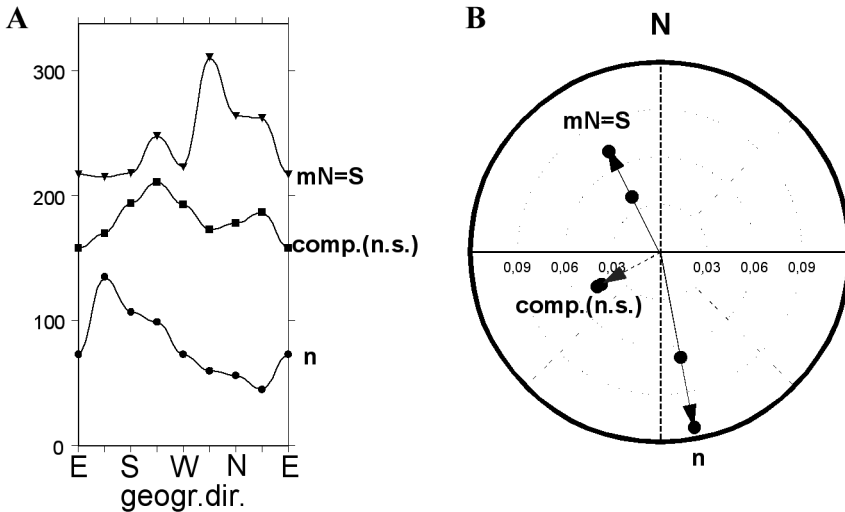


Figure 6 : Réactions de l'animal de la figure 4 au champ magnétique naturel (n), inversé (mN = S) et horizontalement compensé (comp.) lorsque les sons parasites du SE sont masqués par du bruit blanc (bande passante basse, en dessous de 3 kHz, niveau autour de 80 dB SPL) transmis par un haut-parleur monté au-dessus de la camera vidéo. A et B même symboles que les figures précédentes.

Figure 6: A/B, reactions of the same animal as in fig. 4 to the normal (n), (mN= S), and (comp.) magnetic condition when originally disturbing noises at NE were jammed/masked by low frequency continuous noise from the top (around 80 dB SPL). See text for details.

D. Stabilité à long terme de préférences magnétiques et effets de stimulations magnétiques inhabituelles (vecteurs magnétiques grossièrement différents d'habitats usuels)

La stabilité du choix magnétique d'un animal a été étudiée en multipliant les mêmes tests magnétiques sur des mois, voir des années. Les mêmes préférences, avec des fluctuations, ont été observées. Lorsque les animaux, après les tests, ne sont pas remis dans leur aquarium habituel, il y a risque que l'animal ne change de préférence à cause d'un nouvel environnement (l'animal s'adapte à d'autres marqueurs prépondérants, Schlegel et Renner, données non publiées).

Le comportement magnétique d'un *Protée* a été enregistré sur plusieurs semaines et même des situations magnétiques aberrantes et jamais expérimentées par l'animal ont été appliquées. Dans de tels cas, les animaux alternent typiquement entre deux directions oppo-

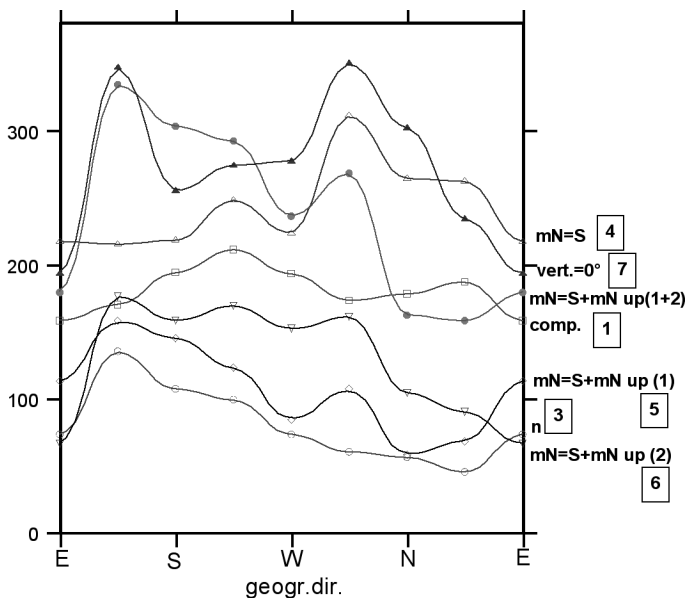


Figure 7 : Succession des réactions au jour le jour du *Protée* des figs 4-6 aux diverses conditions magnétiques, expérimentées naturellement (n , $mN = S$) et non-expérimentées par l'animal dans son environnement habituel ($mN = S + mN \text{ up}$), appliquées pendant deux jours et somme des deux ($mN = S + mN \text{ up}_{(1+2)}$), puis $\text{vert.} = 0^\circ$ au dixième jour) et suivants (indiqués dans la marge droite, les chiffres encadrés se réfèrent aux jours consécutifs).

Figure 7: Sequence of reactions of the *Proteus* of figs 4-6 to different magnetic conditions as labeled; numbers in boxes refer to days after the first experiment (comp. [1]). Kernel (interpolating) spline smoothing.

sées après un certain temps ou produisent des distributions bi-modales, intercalé d'un jour de "comp." [1] (figs 7-9). Finalement, l'animal revenait à son premier choix (SE, fig. 10). Il s'agissait en effet du même spécimen connu des figs 3/4/6 qui choisissait SE (fig. 7n[3]) et NO sous la condition $mN = S[4]$ (fig. 7). Il préférait SE de nouveau quand tous les deux vecteurs magnétiques étaient renversés (fig. 7, $mN = S + mN$ up (1)[5] et (2)[6]), mais il produisit un deuxième pic mineur à NO déjà (choix légèrement bi-modal comme uni-modal également, $mN = S + mN$ up (1+2)[5+6], les deux sets de données ensemble). L'animal passait au choix purement bi-modal quand le vecteur vertical était compensé (fig. 7, vert. = 0° [7]). Il réagissait de la même façon quand l'intensité totale était exercée horizontalement seule (fig. 8, vert. = $0^\circ + 430$ mGauss[8]). Lorsque le lendemain, la condition (n) était rappliquée avec le même vecteur horizontal que la veille (fig. 8, $n_2 + 430$ mGauss[11] et $n_1 + 2 + 430$

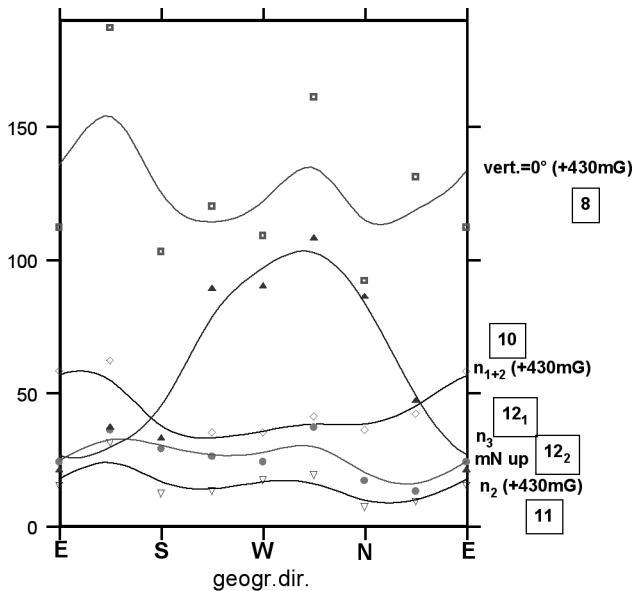


Figure 8 : Suite des réactions après la fig. 7 (routines "approximating spline" appliquées pour montrer les fonctions mathématiques sous-jacentes). Même les renforcements du champ magnétique horizontale (à 430 mG ce qui correspond à l'intensité totale, mais appliquée uniquement dans le plan horizontal : $n_{1+2}(+430$ mG) et $n_2(+430$ mG) ; n_1 n'étant pas représenté serait la différence entre ces deux dernières courbes) ne changent pas les réactions basales ni rendent possible un choix uni modal si le vecteur vertical n'est pas disponible pour l'animal, vert. = 0° (+430 mG).

Figure 8: Reactions following Fig. 7: further magnetic conditions as labeled. Approximating spline smoothing was chosen to roughly demonstrate basic mathematical functions (single or double sine waves).

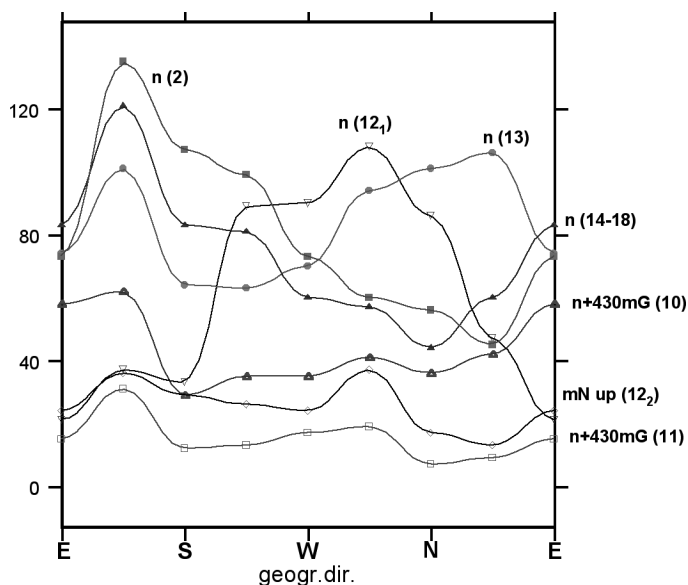


Figure 9 : Suite de réactions du Protée ayant subi des combinaisons magnétiques non- expérimentées par l'animal dans son environnement habituel (figs 7-8, n + 430 mG; mN up). Noter le retour gradué du n(2) en passant n(12) et n(13) au n(14-18).

Figure 9: Further experiments after the series of figs 7-8 showing deviations of n-choices when unnatural magnetic vector combinations were supplied (n+430 mG; mN up) in sequence. Note the gradual return from n(2) over n(12) and n(13) back to n(14-18); Kernel (interpolating) spline smoothing, see text for details.

mGauss[10]) l'animal choisissait légèrement bi-modalement mais encore SE (fig. 8, n1 + 2 [10]). Si par contre, le surlendemain, vecteurs naturels, horizontal et vertical, étaient appliqués, l'animal préférait clairement NO au lieu de SE comme si le champ horizontal était renversé (fig. 8, n3 [121]). Quand, le jour suivant, le vecteur vertical était renversé (fig. 8, mN up [122]) l'animal produisit finalement un choix bi-modal, comme l'avant veille et sous les deux conditions, vert. = 0° (fig. 7, vert. = 0°[7]) et fig. 8 (vert. = 0° + 430 mGauss[8]). Après tant de changements, la nouvelle référence de l'animal semblait être devenue le NO au lieu du SE originalement (fig. 8, n3 [121]). En résumé, l'histoire des conditions magnétiques (en partie non-naturelles) subie sur 12 journées peut amener l'animal à changer son choix. Lorsque la condition naturelle (n) était ramenée pendant les jours suivants (fig. 9, n[121] et [13, 14-18]), l'animal revenait graduellement à son choix initial (fig. 9, comp. n[1], en suite n[121], et finalement n [13, 14-18]), après un intermezzo d'un champ n- renforcé et le vec-

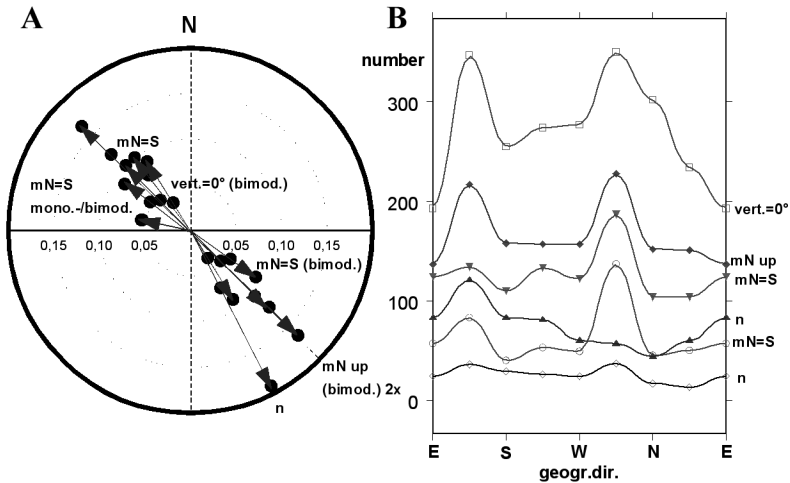


Figure 10 : Synthèse des expériences décrites dans les figures précédentes, en présentation polaire (A) et en distribution (B). Remarquer la stabilité de l'axe générale établie SE/NO, mis en évidence par calculs bi modaux. En B, traitements par "interpolating spline".

Figure 10: Synthesis of the previous experiments, with view as combined polar plot (A) and distributions (B). Note the stable choices within the SE/NW-axis. In B, Kernel interpolating spline smoothing.

teur vertical, $n + 430$ mGauss (10, 11) et mN up[122] (soit presque exactement le même que deux semaines auparavant).

Des combinaisons magnétiques non-expérimentées par des animaux peuvent atténuer et même changer le choix magnétique, mais le même animal peut aussi conserver sa préférence très longtemps. L'axe primordial reste encore plus stable que la polarité, et le temps et la séquence de conditions magnétiques jouent un rôle à moyen, mais non pas à très long terme (voir la comparaison entre les courbes n1 dans la fig.10 et fig. 11, n[14]).

E. Compétition entre alignements selon des marques géographiques, références extérieures et magnétiques

Contrairement aux références externes (sons), des informations éventuellement présentes dans le container d'expériences (traces olfactives ou gustatives), pouvant provenir de l'odeur propre des animaux testés (Briegleb 1962, O. Guillaume et J. Parzefall, communication personnelle), et très efficaces pour l'orientation des animaux cavernicoles (Briegleb 1962, Durand et Parzefall 1987, Durand *et al.* 1981, 1983, Richard *et al.* 1983), ne jouaient

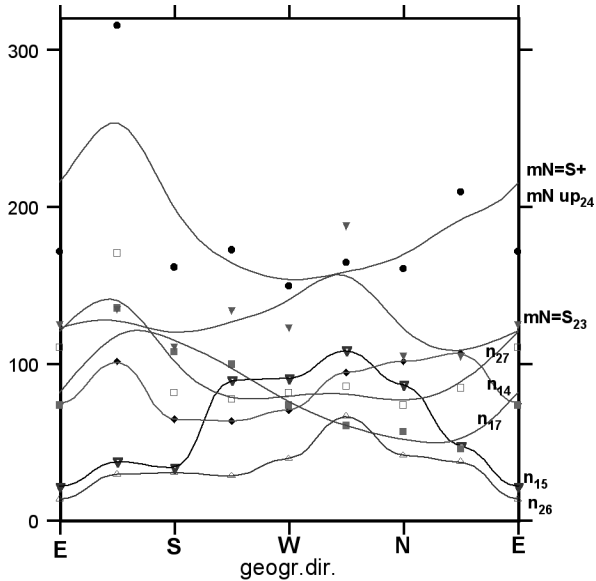


Figure 11 : Reprises des réponses stables et transitoires du même Protée aux trois conditions magnétiques standards (jours sélectionnés comme indiqués par les index). Noter les choix transitoires n_{14} , n_{15} et n_{26} (Données des figures antérieures 7-10). L'approximation "spline smoothing" a été utilisé pour les résultats stables ($mN = S+mN_{up_{24}}$, $mN = S_{23}$, n_{17} , n_{27}), et l'interpolation de Kernel pour les distributions transitoires ($n_{14, 15, 26}$)

Figure 11: Stable and transient preferences of the same animal to the 3 standard magnetic conditions (days of the experiments as labeled in the index). Note the transient choices n_{14} , n_{15} , and n_{26} (data partly redrawn from the last Figs 7-10). Approximating spline smoothing was used for the stable results ($mN = S+mN_{up_{24}}$, $mN=S_{23}$, n_{17} , n_{27}), and Kernel (interpolating) smoothing for the distributions ($n_{14, 15, 26}$)

pas ou peu de rôle dans le contexte de notre étude : des expériences avec plusieurs modèles de table tournantes éliminent en principe ces effets.

Une activité motrice quasi-permanente est plutôt typique pour des animaux cavernicoles (Culver 1982, Juberthie et Decu 1994, Juberthie-Jupeau 1983), ce qui permet de récolter beaucoup de données sur un même animal et dans des laps de temps raisonnables. Les animaux observés se déplaçaient souvent et beaucoup dans la situation expérimentale (alors qu'ils restent normalement plutôt immobiles dans leur abri), traduisant un certain stress ou excitation dans les conditions expérimentales. Les espèces de surface (*Desmognathus monticola*, *D. quadrimaculatus*, *Triturus vulgaris*, *T. cristatus*) montraient moins d'activités dans le même type d'expériences et ne réagissaient pas ou trop peu au champ magnétique. Cepen-

dant, *Desmognathus ochrophaeus* et *Triturus alpestris* ont démontré des comportements d'alignements magnétiques semblables à ceux observés chez *Proteus anguinus* (Schlegel et Renner, données non publiées).

F. Expériences sur la sensibilité à la lumière chez le Protée

1. Anatomie des yeux

Bien que la structure rudimentaire des photorécepteurs du Protée suggère plutôt qu'ils ne soient pas fonctionnels, les yeux étudiés montraient des indices de sensibilité à la lumière : la présence de pigments visuels immuno-positifs a été détectée à l'aide d'anticorps anti-Opsin dans des yeux et organes pineaux régressés. Ceci indique la possibilité d'une certaine sensibilité à la lumière, même préservée chez le Protée, cavernicole strict. Pour étudier les différents stades de dégénérescence, nous avons observé les photorécepteurs de différentes populations de *Proteus* en Slovénie, par analyse ultra-structurale des cellules photoréceptrices (Bulog 1992, Kos et Bulog 1996, Kos *et al.* 2001).

L'analyse immuno-cytochimique des pigments visuels nous a permis d'aborder la fonctionnalité des ces photorécepteurs. Ceux d'un œil régressé d'un *Proteus anguinus anguinus* de la "Grotte de Planina" contenaient des segments extérieurs dégénérés, peu de disques spirales et des bouquets irréguliers de membranes (Kos *et al.* 2001). La majorité de ces segments externes démontraient un marquage immunologique pour le cône Opsin sensible au rouge, et ne que peu d'entre eux ont été retrouvés positifs à la rhodopsine. La dégénérescence était encore plus prononcée dans des photorécepteurs d'animaux provenant de la "Doline d'Otovec" qui sont complètement dépourvus de segments externes, et la plupart d'eux ne possèdent même pas de segment interne.

La prédominance de segments externes positifs pour COS-1 dans la rétine de *Proteus* de Planina révèle une forte tendance à changer la proportion de cônes/bâtonnets en faveur de cônes sensitifs au rouge. Cette tendance est davantage prononcée dans les organes pineaux de tous les animaux observés où le seul pigment visuel était le pigment de cône positif pour COS-1 (sensible au rouge), localisé dans des segments externes rudimentaires. COS-1 est un anticorps monoclonal de souris détectant la portion C-terminal du rouge/vert Opsin du cône des amphibiens jusqu'aux primates (Röhlich et Szél 1993). À l'inverse, des animaux d'une autre population ("Doline d'Otovec"), présentant un niveau de dégénérescence plus avancé

de la rétine, démontraient une réactivité immunitaire dans quelques perikarya, sans aucune réaction au COS-1.

Les yeux non-dégénérés du *Proteus anguinus parkelj*, la sous-espèce pigmentée, présentaient toutes les caractéristiques des yeux des vertébrés (Bulog 1992). Le marquage immuno-cyto-chimique avec des anticorps variés d'anti-Opsine nous a permis de classer les différents types de photorécepteurs : la majorité des cônes était marquée par d'anticorps spécifiques pour des pigments visuels sensibles aux longueurs d'ondes longues. Nous avons trouvé, dans la rétine du Protée noir, (i) des bâtonnets principales, marqués d'anticorps AO d'anti-Rhodopsine, (ii) des cônes sensibles au rouge, marqués de mAb COS1 et B2 (des anticorps spécifiques aux pigments visuels de longueur d'ondes longues dans beaucoup d'autres espèces de vertébrés), et (iii) un type de photorécepteur qui devrait représenter un cône sensible au bleu ou aux UV, marqué d'anti-Rhodopsine mAb K55-75C (Kos *et al.* 2001 et voir fig. 14).

Parmi les amphibiens, deux types de bâtonnets et trois types de cônes spécifiques aux couleurs ont été décrits (cônes sensibles aux rouge, bleu et UV chez le Xénope lisse (*Xenopus laevis*) : Röhlich *et al.* 1989, Röhlich et Szél 2000, Witkovsky 2000, Zhang *et al.* 1994, et chez la Salamandre tigre (*Ambystoma tigrinum*) : Sherry *et al.* 1998).

Finalement, des pigments visuels sont encore exprimés dans des photorécepteurs dégénérés des yeux et de la glande pinéale du Protée aveugle. Mais cela ne peut définitivement répondre à la question de la sensibilité à la lumière du Protée, comme confirmé par les études antérieures physiologiques, morpho-fonctionnelles et comportementales. Des expériences électrophysiologies avaient révélé que les photorécepteurs de la rétine du *Proteus anguinus* sont réactifs à la lumière (Gogala *et al.* 1965, Zener, 1973). Le nerf optique est toujours présent (Durand 1971, Hawes, 1946), permettant la transmission des stimuli visuels au système nerveux central.

La découverte que certains pigments visuels sont exprimés même dans les yeux extrêmement régressés est en accord avec des résultats d'études de développement sur l'œil du poisson cavernicole *Astyanax fasciatus*, dont les photorécepteurs ont subi d'une régression similaire à celle du *Proteus*. Des expériences d'hybridation *in situ* sur la transcription du gène Opsin ont révélé qu'un gène structural, nécessaire pour la morphogenèse de l'œil, est toujours exprimé bien que les structures sous-jacentes, les membranes du segment externe, soient différenciées normalement (Langecker *et al.* 1993). Ce résultat confirme l'hypothèse

que la régression de l'œil du poisson cavernicole est causée par une mutation des gènes de contrôle du développement plutôt que par une perte de fonctionnement de gènes de structure (Wilkins 1988, Langecker *et al.*, 1993). Ce résultat pourrait aussi s'appliquer au processus de dégénération des yeux du Protée.

2. Anatomie de la glande pinéale

L'organe pinéal des amphibiens est connu pour contenir des photorécepteurs bien développés (Vigh et Vigh-Teichmann 1999). Un type de bâtonnet large et plus petit ainsi que deux types de cônes, immuno-cyto-chimiquement distincts, ont été décrits par microscopie électronique. Le cône plus large était COS-1- positif alors que le type de cône plus mince restait négatif avec tous les anticorps testés (Vigh et Vigh-Teichmann 1999). En comparant ces résultats avec la cytologie de la glande pinéale du Protée cavernicole, le seul photorécepteur rudimentaire relictuel semble celui du cône sensible au rouge. L'aire de la peau située au-dessus de la glande pinéale du Protée est plus pâle en comparaison avec d'autres parties de la peau, ce qui est dû à l'absence de mélanophores (observée en appliquant un stimulus de lumière avec une source de lumière à fibres optiques). L'illumination de cette aire provoque un fort comportement photo-phobique (observations non publiées).

3. Sensitivité de la peau à la lumière

La colorisation des cellules dans la couche basale de l'épithélium de la peau du Protée blanc avec mAb COS-1 montre la possibilité qu'un pigment photo-sensible soit impliqué dans la photosensibilité de la peau. Récemment, une Opsine a été identifiée, une Mélanopsine dans des cellules dermales mélanophores de *Xenopus laevis* (Provencio *et al.* 1998). Sa conformation est semblable à toutes les Opsines connues et spécialement des Opsines d'invertébrés. La séquence d'acides aminés partage 39% de loci uniques avec la Rhodopsine d'Octopus et 30% de correspondance avec des Opsines de vertébrés. Malgré son origine chez les vertébrés, la mélano-Rhodopsine du Protée est plus homologue aux Opsines d'invertébrés, et spécialement de la Rhodopsine d'Octopus, et moins homologue avec les Opsines typiques pour les vertébrés. Une analyse phylogénique indique que la Mélanopsine et les Opsines des invertébrés ont évolué d'un ancêtre commun. La Mélanopsine est distribuée dans des mélanophores, dans l'iris et dans le cerveau profond, suggérant qu'elle soit utilisée par des photorécepteurs non-visuels (Provencio *et al.* 1998).

4. Observations du comportement par rapport à la sensibilité à la lumière

Les résultats décrits reprennent et complètent des expériences plus anciennes sur le Protée dépourvu d'yeux (Briegleb 1962, 1963 qui lui-même se référait à l'étude de Hawes 1946). Il s'agit ici de l'étude de la sensibilité de la peau à la lumière en fonction de sa longueur d'onde et de l'étude de la projection au CNS de cette réaction épidermique. Des spécimens de Protée, âgés d'environ 50 ans, ont été éclairés directement avec des spots de lumière pour distinguer les réactions dues aux yeux dégénérés et, éventuellement, à l'organe pinéal, et celles lorsqu'on ne stimule que localement la peau. Les observations étaient réalisées sous lumière infrarouge et rouge faible (moins de 1 Lux), et les stimulations par d'étroits spots de lumière d'un diamètre de 0,5 à 2 cm projetés sur une patte, la queue ou le corps d'un individu à mi-couvert d'un abri. Comme précédemment observé par Briegleb (1962), les animaux déplaçaient le membre concerné ou la queue hors du spot de lumière, dans la bonne direction et non pas par essais et erreurs, peu de secondes après avoir été éclairés. Le Protée ne s'habitue pas à la stimulation ni de la peau ni de la tête (ou très peu comme avec la stimulation magnétique). L'animal finissait par s'en aller en se sauvant sous l'abri familier le plus proche dans son bassin habituel (3,5 sur 5,5 m, profondeur d'eau 8 à 75 cm).

Après de multiples tests sur plusieurs animaux, nos résultats montrent que, avec 5 verres de couleur entre 400 et 680 nm de longueurs d'onde, les animaux ne réagissaient plus à des luminosités $< 0,5-1$ Lux (de l'ordre de grandeur aux observations plus anciennes : Briegleb 1962, J. Durand, communication personnelle). Lorsque la tête seule était illuminée les animaux réagissaient par leur comportement d'alerte typique (levé de la tête, morsure en direction du spot comme décrit par Briegleb 1962). Si les individus entiers sont éclairés pendant quelques secondes, ils ne bougent pas, mais si la lumière est éteinte ils se sauvent immédiatement par une réaction typique de retournement (Hawes 1946).

Les seuils indiqués ne sont probablement pas les seuils absolus mais plutôt des limites de tolérance leur laissant assez d'obscurité pour la vie souterraine. Les animaux perdaient de leur irritation à la lumière lorsqu'ils étaient exposés au cycle jour/nuit et à 500-1000 Lux (Nusbaum 1907, et observations non publiées).

A l'inverse, des animaux testés dans la Grotte de Moulis ("Salle d'Argile") ont révélé une très bonne sensibilité à une source particulière de lumière. Dans une expérience d'alignements magnétiques, 4 individus se dirigeaient tous significativement vers le SE quelque soit la condition magnétique appliquée. Il s'est révélé, après un certain temps, que ces ani-

maux avaient réagi à une ampoule jaune-rouge de 60 Watt chauffante, à une distance de 40-50 m (fig. 3 A, B, mN = S, comp.). La luminosité, à une distance de deux mètres de l'ampoule, mesurée à l'aide d'un optomètre donnait des valeurs justes au-dessus du seuil de sensibilité de l'instrument, à 0,01Lux (0,001 μ W sans le filtre photométrique). La longueur d'ondes émises était entre le bleu et 900 nm environ (IR). Que la réaction observée des animaux soit due aux peu de bâtonnets et cônes dans les yeux et l'organe pinéal dégradés (mais présents dans la population de Protée à Moulis provenant de la "Grotte de Pivka" très proche de celle de Planina) ou bien à la sensibilité de la peau n'est pas encore résolu.

Pendant les expériences avec spots de lumière, nous n'étions pas capables de tester les sensibilités éventuelles à l'IR, car nous ne pouvions pas reconnaître, à l'aide de la Camera IR, les spots d'IR produits (830-100 nm), à une profondeur d'eau de 50-70 cm où les animaux se trouvaient. IR est trop absorbé par l'eau même peu profonde si bien que les intensités d'IR disponibles ne pouvaient pas être contrôlées. Quand la source gênante a été recouverte de métal, les animaux ne s'orientaient plus vers cette lumière, mais s'alignaient exclusivement selon le champ magnétique donné (fig.3, n, mN = S et comp.).

Nous ne savons toujours pas si les animaux sont capables de déterminer la direction de la lumière grâce à leurs yeux ou à l'organe pinéal, mais ils pourraient le faire via la sensibilité de la peau en comparant, au niveau du CNS, des intensités de lumière différentes perçues sur différentes portions du corps. La phototaxie négative peut servir à se dissimuler, et le Protée peut vivre avec succès dans des biotopes épigés à condition qu'il n'y ait pas de prédateurs ni de parasites (Hawes 1946, Briegleb 1962, Nusbaum 1907, J. Durand et Ch. Juberthie, communication personnelle).

III. DISCUSSION

La sensibilité de la peau à la lumière est très répandue dans le règne animal (Millot 1968, de la Motte 1964, Steven 1963). Chez les animaux cavernicoles, des individus peuvent, activement ou passivement, venir au grand jour. Pour le Protée, la réaction classiquement décrite est la fuite de la lumière (Hawes 1946 et références ci-dessus). Cette réaction observée dans le milieu souterrain serait une réaction de protection contre les prédateurs/ou parasites préalablement rencontrés dans des ruisseaux et rivières de surface. Nous proposons que la sensibilité élevée pour la lumière aurait pu être une caractéristique ancienne d'an-

cêtres épigés du Protée, qui étaient vraisemblablement déjà néoténiques (Herre 1939). Le Protée n'aurait pas été exclusivement aquatique et aurait pu vivre dans des marécages, comme actuellement *Necturus*, espèce la plus proche de *Proteus* en Amérique du Nord, et qui est également scotophile (cherchant l'obscurité). Les yeux et les mélanophores de la peau du Protée disparaissent pendant la vie souterraine. Les deux sous-espèces de Protée (cavernicole et épigé) disposent des cellules pigmentaires stellates avec des granules dans le derme. Cependant, les promoteurs de mélanophores au-dessous de la lamelle basale sont plus nombreux chez les spécimens pigmentés (Kos 1992, Kos et Bulog 1993).

La scotophilie ne prévient cependant pas la prédation par les écrevisses et les Salmonidés, comme dans grotte Pivka près de Postojna en Slovénie (Briegleb 1962, 1963, 1974). Dans la partie fluviale de la grotte de Pivka une population dense d'écrevisses (*Astacus*) perd graduellement sa pigmentation noire vers l'aval pour une colorisation rouge et bleu. Le *Proteus* n'y a jamais été rencontré bien que l'habitat principal de la population de Protée soit, par son hydrologie, pleinement connectée avec la rivière souterraine de Pivka (Briegleb 1962, 1963, 1974). Le Protée, à l'origine néoténique, aurait pu récemment (pendant le dernier interglaciaire), colonisé les grottes du Karst Dinarien, alors disponibles. Il a pu profiter de proies installées antérieurement (crustacés *Troglocaris*, *Niphargus*, *Assellus* et vers aquatiques Turbellariés), et s'adaptera par évolution régressive (yeux) au milieu entièrement hypogé.

A. Comportement général du Protée dans l'obscurité

Un Protée, après avoir lâché dans un habitat inconnu, se met à marcher le long de la limite externe du nouvel habitat pendant environ 20 minutes puis explore la partie centrale du container jusqu'à ce qu'il trouve un abri entre pierres et cailloux. Après d'autres prospections, un abri définitif est sélectionné et n'est plus abandonné pour des mois, même des années. Dans un habitat habituel, le Protée inspecte le substrat, d'une façon apparemment aléatoire, cherchant des proies avec son museau dans le sédiment et l'argile. La repérage des proies et la capture sont réalisées grâce aux systèmes mécano, chimico et d'électroperception (Schlegel 1997). Les proies sont des crustacés *Troglocaris*, *Niphargus* et *Assellus*, mais aussi des petits poissons, grenouilles et larves d'urodèles.

A l'occasion d'une rencontre entre deux individus, les interactions finissent presque toujours par une fuite d'un des participants. Il y a des comportements agonistiques entre les

mâles pour établir une hiérarchie (Briegleb 1962). Deux mâles adultes ensemble dans un aquarium relativement petit (35 x 20 x 20 cm sous lumière du jour) finissent par se blesser sérieusement dans leurs combats qui peut mener à la mort d'un des rivaux.

Un Protée posé sur de l'argile humide hors de l'eau peut se mettre à marcher sur quatre pattes, le corps surélevé sans contact avec le sol. Dans le laboratoire de l'Institut Zoologique de Munich, un Protée a passé des semaines sur une rampe de ciment sortant de l'eau. Le Protée est capable de se déplacer même en sortant de l'eau (M. Aljancic, observations réalisées à la grotte de Planina).

L'observation du comportement de phototaxie positive (cf. fig. 3) pour des sources de faible lumière provient de la sortie, souvent en grande quantité, de Protée par l'ouvertures de certaines grottes et siphons en Slovénie, en particulier pendant la pleine lune (documenté sur une bande vidéo de B. Bulog et J. Parzefall (communication personnelle). Recherche de proies plus abondantes à l'extérieur ou de partenaires sexuels, la raison du synchronisme de ce comportement n'est pas élucidée.

B. Caractérisation génétique d'Euproctes de grottes et de surface

Pendant les expériences dans un champ magnétique, décrites pour le seul Protée et mentionné pour *Desmognathus ochrophaeus* précédemment, nous avons observé que les Euproctes de populations hypogées se comportaient comme les Protées, contrairement à ceux des populations de surface. De plus, les individus des populations de grotte présentaient une sensibilité jusqu'à 30 dB supérieure à ceux des populations de surface (fig. 12, Schlegel 1997, Schlegel et Bulog 1997). Ce caractère pourrait avoir un contrôle génétique, arguant alors pour une séparation complète des populations. Nous avons analysé la variabilité de l'ADN mitochondrial (région de contrôle) et de 22 loci nucléaires codant pour des protéines (le détail des méthodes utilisées est décrit dans Steinfartz *et al.* 2000 et Steinfartz *et al.* 2002) chez des individus provenant de (i) l'élevage de la grotte de Siech près de Saurat ramenée dans la grotte de Moulis, (ii) l'élevage d'une autre colonie entretenue à Moulis qui venait de surface (ruisseau d'Aulus les Bains, à une distance de 20 km à vol d'oiseau, mais géographiquement et hydrologiquement bien séparé de la grotte de Siech), et (iii) des échantillons préservés d'une population plus distante du ravin de Castelmouly près du Col Tourmalet, à 150 km à ouest des autres localités (Euprocte décrit comme *E. a. castelmouliensis* par Wolterstorff 1925). À partir du séquençage d'un fragment de 597 paires de bases, un caractère

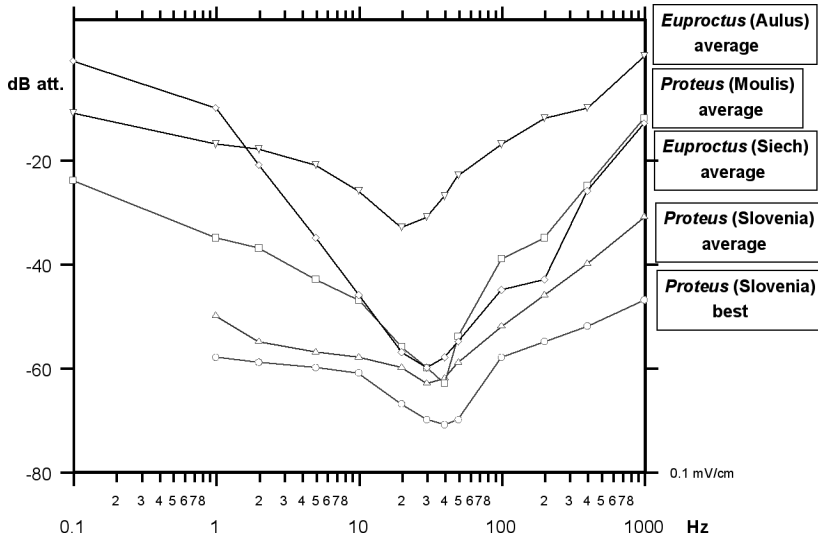


Figure 12 : Sensibilités chez *Calotriton (Euproctus) asper* des Pyrénées et *Proteus anguinus* de Slovénie aux stimulus électriques sinusoïdaux en fonction de la fréquence (axe des abscisses, Hz, échelle logarithmique). L'ordonnée est donnée pour les seuils d'intensité nécessaires pour une réaction liminaire de l'animal en dB relatif (atténuation : 0 dB att. = 1V/cm ; - 80 dB att. = 0,1 mV/cm, comme indiqué sur la marge de droite).

Figure 12: Sensitivity of *Calotriton (Euproctus) asper* (Pyrénées) and *Proteus anguinus* (Slovenia) to sinusoidal electrical stimuli as a function of frequency (abscissa, Hz, log.-scale). Ordinate, threshold amplitudes for just noticeable behavioral reactions in rel. dB (attenuation; 0 db att. = 1V/cm; -80 dB att = 0.1 mV/cm, as indicated at the right margin).

diagnostique a pu être assigné aux animaux de la grotte de Siech (fig. 13). Tous les loci (protéines), à l'exception du locus Albumin étaient identiques pour les individus de la grotte de Siech et du ruisseau d'Aulus. La faible différenciation pour les marqueurs mitochondriaux et nucléaires suggère une séparation récente des populations grotte de Siech et ruisseau d'Aulus (par exemple depuis la fin de la glaciation du Würm dans les Pyrénées). Bien que des caractères morphologiques externes ne se soient pas encore différentes entre populations hypogée et épigée, les caractéristiques comportementales observées (alignement par rapport au champ magnétique) apparaissent différentes : la capacité à s'aligner sur des paramètres magnétiques serait une adaptation de l'Euprocte cavernicole. La sensibilité magnétique n'a rien à voir avec la sensibilité du système électrosensoriel de la ligne latérale (Schlegel 1996, 1997). La tendance à la décroissance parallèles des seuils de sensibilité dans ces deux systèmes sensoriels pourrait ne pas être une simple coïncidence, mais pourrait démontrer des

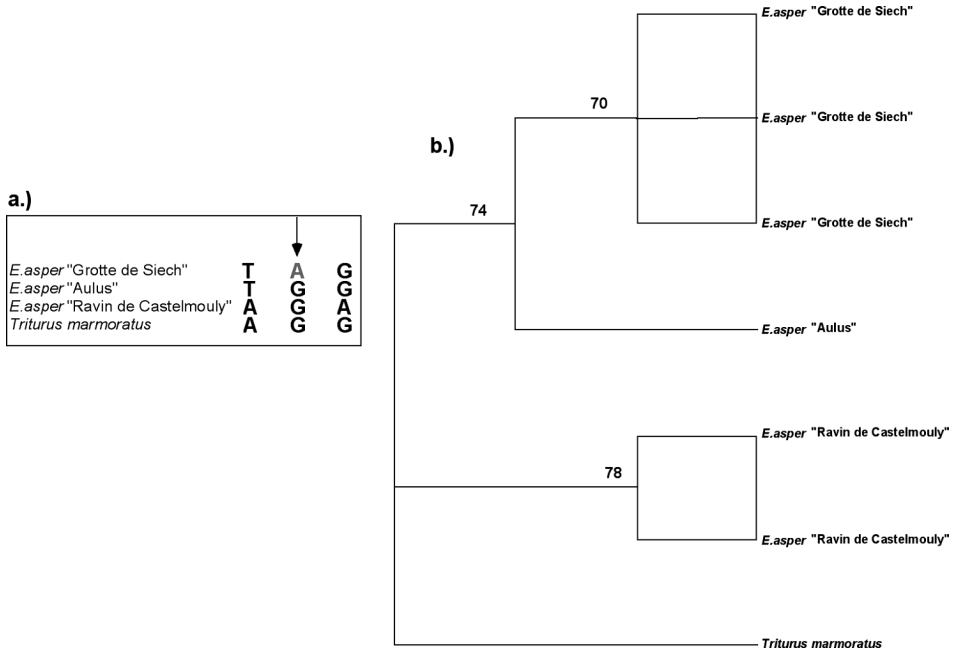


Figure 13 : Distances génétiques chez des *Calotriton (Euproctus) asper* de diverses localités. a) Variabilité de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (597 paires de bases) chez des individus d'une population souterraine de la grotte de Siech (Saurat, Ariège) et deux populations de surface (Aulus les Bains et de Ravin de Castelmouly), avec *Triturus marmoratus* comme groupe externe. Le site diagnostique pour *C. asper* de la grotte de Siech est marqué par une flèche. b) Arbre consensus (bootstraps calculés pour 1000 répliquas) pour *C. asper* (*T. marmoratus* comme groupe externe). Les chiffres sur les dichotomies donnent les pourcentages de support pour cette dichotomie et les taxa terminales correspondantes.

Figure13: Genetic distances in *Calotriton (Euproctus) asper* from diverse localities. a) DNAm variability (D-loop, 597 bp) in individuals from one cave (Grotte de Siech) and two surface populations (Aulus and Ravin de Castelmouly), with *Triturus marmoratus* as outgroup. The only diagnostic site for *C. asper* from the "Grotte de Siech" is marked by an arrow. b.) Bootstrap consensus tree based on 1000 bootstraps replicates for *C. asper* (*Triturus marmoratus* as outgroup). Numbers above nodes indicate percentage support for this node and its corresponding terminal taxa.

modifications des systèmes sensoriels des individus migrant entre des habitats épigés et hypogés ou vice versa (cf. fig. 12).

La capacité à s'orienter dans le champ magnétique terrestre, observée chez l'Euprocte cavernicole est perdue lorsque les individus sont élevés un an hors de leur milieu d'origine. D'autre part, les Euproctes élevés dans la grotte de Moulis et capturés à Aulus il y a plus de 10 ans, ainsi que leur descendants nés dans la grotte, ne deviennent pas sensibles au champ

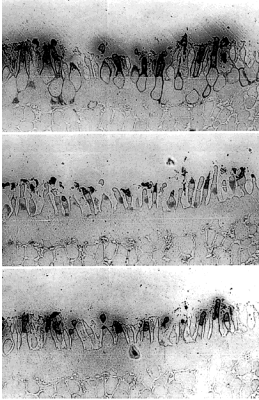


Figure 14 : Marquage immunologique de coupes semi-fines adjacentes de la rétine chez *Proteus anguinus* ssp. *parkelj* X580 (modifiée d'après Kos, Bulog, Szél & Röhlich 2001). MAb OS2 colore toutes cellules photoréceptrices, mAb B2 colore des cônes sensibles au rouge. L'anticorps anti-Rhodopsin AO marque les segments rod externes (photos microscopiques du haut en bas).

Figure 14: Immunolabelling of adjacent semithin sections of the retina in the *Proteus anguinus parkelj* X580 (modified from Kos, Bulog, Szél & Röhlich 2001). mAb OS2 stains all photoreceptor cells, mAb B2 stains red-sensitive cones. Anti-rhodopsin antibody AO labels rod outer segments (photographs from up to down)

magnétique, malgré une vie complètement cavernicole. La capacité d'alignement sur le champ magnétique serait absente de cette population, et ne pourrait être récupérée ou réactivée au besoin ou de novo sous des conditions d'obscurité.

V. CONCLUSION

Toutes les observations sur l'orientation magnétique des urodèles ont montré que des animaux en milieu souterrain se servent de tous leurs systèmes sensoriels, incluant la sensibilité à la lumière des yeux (même réduits), de la glande pinéale et de la peau. L'odorat et le goût, certainement très important, n'ont pas été traité ici (voir Briegleb 1962, 1963, Durand *et al* 1981 1982 1983, Papi et Ioalè 1988, Richard *et al.* 1983, O. Guillaume et J. Parzefall, communication personnelle), tout comme les sens mécaniques (Durand et Parzefall 1987). Les aptitudes décrites, probablement améliorées jusqu'à un certain degré pendant l'évolution récente ont permis aux populations (pré-adaptées) de coloniser les grottes comme nouvel habitat permanent. L'orientation et la navigation dans l'environnement (Fisher *et al.* 2001, Phillips *et al.* 1995) est toujours basée sur une combinaison des informations sensorielles disponibles, et incluant la mémoire topographique pour son propre habitat proche.

La discussion sur la date de colonisation de l'habitat hypogé par le *Proteus*, et la perte secondaire de la fonctionnalité des yeux reste d'actualité. À la découverte de la sous-espèce *Proteus anguinus parkelj* décrite par Sket et Arntzen (1994), et à partir des études génétiques sur les populations de morphe noir et blanc, la perte de la vision et la séparation des populations de cette région apparaissent avoir eu lieu plutôt récemment, pendant la glaciation de Würm, qui s'est terminait à - 15 000 ans en Slovénie (avec de fort effets de gouleau d'étran-

glement évolutif). Les différences remarquables de structure et d'immunocytochimie observées entre les populations de Planina et d'Otovec en Sloveenie devraient être fixées génétiquement : ces animaux appartiennent à deux groupes de populations distinctes, comme l'a montré l'analyse d'allozymes (Sket & Arntzen 1994). La dégénérescence des yeux dans d'autres populations de morphe blanc de Protée apparaît également fixée génétiquement mais argumenterait plutôt pour une perte de la vision datant de la glaciation de Mindel et de Riss il y a plus de 300 000 ans.

Remerciements : Les stages d'un auteur (P.S.) à Moulis ont été sponsorisés en partie par le programme PROCOPE et le Centre de coopération universitaire franco-bavarois. P.S. doit énormément aux directeurs du CNRS-Moulis coopérants de ces programmes d'échanges scientifiques, Ch. Juberthie, J. Durand et A. Mangin, qui l'ont invité à ces stages et qui l'ont aidé essentiellement avec leurs connaissances professionnelles et le support du Laboratoire souterrain. Nous remercions, en particulier, pour des discussions et suggestions valables, les docteurs J. Durand, M. Beblo (qui a procuré deux bobines Helmholtz pour la grotte laboratoire et son expertise géo-physique), et G. et G. Fleissner, R. et W. Wilschko (tous les quatre Francfort/Main) pour les commentaires de toute sorte. Les spécimens de *Desmognathus* ont été donnés par les Pr. Dr. G. Roth, Dr. U. Dicke et Dr. W. Grunwald de l'Université de Bremen et par le Pr. Dr. J. Parzefall de l'Université de Hambourg. Finalement nous remercions M. Diesener, M. Dupuis et K. Schmidt pour la maintenance des animaux. Le résumé en Français a été aimablement corrigé et rédigé par M. Sala.

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Batchelet E. 1981 - Circular statistics in biology. London: Academic Press.
- Briegleb W. 1962 - Zur Biologie und Ökologie des Grottenolms (*Proteus anguinus* Laur. 1768). *Z. Morphol. Ökol. Tiere*, 51: 271-334.
- Briegleb W. 1963 - Zur Kenntnis eines Ökotopt von *Proteus anguinus* Laur. 1768. *Acta Carsol.*, 3: 149-196.
- Briegleb W. 1974 - Der Extrembiotop Höhle als Informationslieferant für die allgemeine Physiologie am Beispiel des Grottenolms (*Proteus anguinus* Laur.). *Acta Carsol.*, 6: 287-297.
- Bulog B. 1989a - Tectorial Structures of the inner ear sensory epithelia of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *J. Morphol.*, 201: 59-68.
- Bulog B. 1989b - Differentiation of the inner ear sensory epithelia of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *J. Morphol.*, 202: 325-338.
- Bulog B. 1992 - Ultrastructural analysis of the retina of *Proteus* sp. - Dark pigmented specimens (Urodela, Amphibia). *Electron Microscopy*, Vol. 3, Biological Sciences: 659-660, EUREM 92, Proceedings, Granada, Spain.
- Bulog B. & Schlegel P. 2000 - Functional morphology of the inner ear and underwater audiograms of *Proteus anguinus* (Amphibia, Urodela). *Eur. J. Physiol.*, 439 (suppl.) 3: R165-R167.
- Culver C.C. 1982 - Cave life. Harvard University Press, Cambridge, Mass. and London, England.
- Deutschlander M.E., Borland S.C. & Phillips J.B. 1999 - Extra ocular magnetic compass in newts. *Nature*, 400: 324-325.

- Diebel C.E., Proksch R., Green C.R., Neilson P., & Walker M.M. 2000 - Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature*, 406: 299-302.
- Durand J.P. 1971 - Recherches sur l'appareil visuel du Protée, *Proteus anguinus* Laurenti, Urodèle hypogé. *Ann. Spéléol.*, 26(3) : 497-824.
- Durand J.P., Parzefall J. & Richard B. 1981 - Proteidae prey detection and the sensory compensation problem. Proc. VIII^e Int. Cong. Spéléol., 31-34, Bowling Green, USA.
- Durand J.P., Parzefall J. & Richard B. 1982 - Etude comparée de la détection chimique des proies par *Proteus anguinus*, cavernicole, et son parent de surface *Necturus maculosus* (Proteidae, Urodela). *Behav. Process.*, 7 : 123-134.
- Durand J.P., Bouillon M. & Parzefall J. 1983 - Réponse de *Proteus anguinus* L., amphibien cavernicole à des stimuli chimiques provenant de la ponte. *Mém. Biospéol.*, 10 : 395-399.
- Durand J.P. & Parzefall J. 1987 - Comparative study of rheotaxis in the cave salamander *Proteus anguinus* and its epigeal relative *Necturus maculosus*. *Behav. Process.*, 15: 285-291.
- Fleissner G., Holtkamp-Rötzler E., Hanzlik M., Winklhofer M., Fleissner G., Petersen N. & Wiltshko W. 2003 - Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. *J. Comp. Neurol.*, 458: 350-360.
- Fisher J.H., Freake M.J., Borland S.C. & Phillips J.B. 2001 - Evidence for the use of magnetic map information by an amphibian. *Anim. Behav.*, 62: 1-10.
- Gogala M., Michieli B. & Zener B. 1965 - Electrophysiological investigations of the reduced eye of *Proteus anguinus*. Act. IV Congr. Int. Speleol., Ljubljana, 78-79.
- Hanzlik N., Heunemann C., Holtkamp-Rötzler E., Winklhofer M. & Fleissner G. 2000 - Super paramagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. *Biometals*, 13: 325-331.
- Hawes R.S. 1946 - On the eyes and reactions to light of *Proteus anguinus*. *Quart. J. Micr. Sci.*, 86: 1-53.
- Juberthie-Jupeau L. 1983 - Etude expérimentale de la présence de Coléoptères Bathysciinae souterrains autour de substances alimentaires. *Mém. Biospéol.*, 10 : 439-444.
- Juberthie C. & Decu V. 1994 - Encyclopaedia Biospeleologica. Société de Biospéologie, Moulis, France and Bucarest, Rumania.
- Kos M. 1992 - Fine structure of the skin of *Proteus anguinus* Laurenti (Urodela, Amphibia) and comparison of the skin of the pigmentless and the pigmented specimen. Graduation thesis, Ljubljana, Slovenia.
- Kos M. & Bulog B. 1993 - Differences between the fine structure of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia) skin and the black pigmented *Proteus* sp. Proceedings Multinational Congress on Electron Microscopy: 439-440. Parma, Italy.
- Kos M. & Bulog B. 1996 - Pineal and retinal photoreceptors of *Proteus anguinus* (Amphibia: Proteidae). *J. Comput. Assist. Micr.*, 8: 239-240.
- Kos M., Bulog B., Szél A., & Röhlich P. 2001 - Immunocytochemical demonstration of visual pigments in the degenerate retinal and pineal photoreceptors of the blind cave salamander (*Proteus anguinus*). *Cell Tissue Res.*, 303: 15-25.
- Langecker T.G., Schmale H., & Wilkens H. 1993 - Transcription of the opsin gene in degenerate eyes of cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) and of its conspecific epigeal ancestor during early ontogeny. *Cell Tissue Res.*, 273: 183-192.

- Millott N. 1968 - The dermal light sense. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 23: 1- 36.
- Motte I. de la 1964 - Untersuchungen zur vergleichenden Physiologie der Lichtempfindlichkeit geblendeteter Fische. *Z. Vergl. Physiol.*, 49: 58-90.
- Nusbaum J. 1907 - Ein Fall von Viviparität bei *Proteus anguinus*. *Biol. Zbl.*, 27: 370-375.
- Papi F. & Ioalè P. 1988 - Pigeon navigation: new experiments on interaction between olfactory and magnetic cues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91A: 87-89.
- Phillips J.B., Adler, K. & Borland S.C. 1995 - True navigation by an amphibian. *Anim. Behav.*, 50: 855-858.
- Provencio I., Jiang G., De Grip W.J., Hayes W.P. & Rollag M.D. 1998 - Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 340-345.
- Richard B. Parzefall J., & Durand J.P. 1983 - Communications chimiques chez deux Proteidae, *Proteus anguinus* et *Necturus maculosus*. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 107 : 597-605.
- Röhlich P., Szél Á., & Papermaster D. 1989 - Immunocytochemical reactivity of *Xenopus laevis* retinal rods and cones with several monoclonal antibodies to visual pigments. *J. Comp. Neurol.*, 290: 105-117.
- Röhlich P. & Szél Á. 1993 - Binding sites of photoreceptor-specific antibodies COS-1, OS-2 and AO. *Curr. Eye Res.*, 12: 935-944.
- Röhlich P. & Szél Á. 2000 - Photoreceptor cells in the *Xenopus retina*. *Micr. Res. Techn.*, 50: 327-337.
- Schlegel P. 1996 - Behavioral evidence and possible physical and physiological mechanisms for earth-magnetic orientation in the European Blind Cave Salamander, *Proteus anguinus*. *Mém. Biospéol.*, 23 : 5-16.
- Schlegel P. A. 1997 - Behavioral sensitivity of the European Blind Cave Salamander, *Proteus anguinus*, and a Pyrenean Newt, *Euproctus asper*, to electrical fields in water. *Brain Behav. Evol.*, 49: 121-131
- Schlegel P. & Bulog B. 1997 - Population-specific electro sensitivity of the European blind cave salamander, *Proteus anguinus*. *J. Physiol. (Paris)*, 91(2): 75-79.
- Sherry D.M., Bui D.D. & DeGrip W.J. 1998 - Identification and distribution of photoreceptor subtypes in the neotenic salamander retina. *Vis. Neurosci.*, 15 : 1175-1187.
- Sket B. and Arntzen J.W. 1994 - A black, non-troglophobic amphibian from the karst of Slovenia: *Proteus anguinus parkelj* n.ssp. (Urodela: Proteidae). *Bijdragen tot de Dierkunde*, 64(1): 33-53
- Steinfartz S., Veith M. & Tautz D. 2000 - Mitochondrial sequence analysis of Salamandra taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Mol.Ecol.*, 9: 397-410.
- Steinfartz S., Hwang U. W., Tautz D., Öz M. & Veith M. 2002 - Molecular phylogeny of the salamandrid genus *Neurergus*: evidence for an intrageneric switch of reproductive biology. *Amphibia-Reptilia*, 23: 419-431.
- Vigh B. & Vigh-Teichmann I. 1999 - Comparative morphophysiology of the pineal organs of vertebrates. In: Joy KP, Krishna A, Haldar C (eds) Comparative endocrinology and reproduction, 479-506, Narosa Publishing House, New Delhi.
- Wiltschko R. & Wiltschko W. 1995 - Magnetic orientation in animals. *Zoophysiology* (vol. 33), Springer, Berlin.
- Wiltschko, W. and Wiltschko, R. 2003 - Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *J. Comp.Physiol. A*, 191: 675-693

Winklhofer M., Holtkamp-Roetzler E., Hanzlik M., Fleissner G., & Petersen N. 2001 - Clusters of super paramagnetic particles in the upper-beak skin of homing pigeons: evidence of a magneto receptor? *Eur. J. Mineral.*, 13: 659-669.

Witkovsky P. 2000 - Photoreceptor classes and transmission at the photoreceptor synapse in the retina of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Micr. Res. Techn.*, 50: 338-346

Wolterstorff W. 1925 - Über mehrere Lokalformen des Pyrenäenmolches, *Euproctus asper* Dugès. *Abh. Ber. Mus. Nat. Heimatk. Magdeburg*, 4(1): 61-76.

Zener B. 1973 - The light sensitivity of the cave salamander *Proteus anguinus* Laur. *Period. Biol.*, 2: 16.

Zhang J., Kleinschmidt J., Sun P. & Witkovsky P. 1994 - Identification of cone classes in *Xenopus retin* -
na by immunocytochemistry and staining with lectins and vital dyes. *Vis. Neurosci.*, 11 : 1185-1192.

manuscrit accepté le xxx