Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Impact de la domestication suite à une stress chronique de confinement chez la perche commune (Perca fluviatilis): analyse physiologique, immunologique et approche préliminaire en protéomique

Mathieu, Cédric

Award date:
2007

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2024

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

IMPACT DE LA DOMESTICATION SUITE A UN STRESS CHRONIQUE DE CONFINEMENT CHEZ LA PERCHE COMMUNE (*PERCA FLUVIATILIS*) : ANALYSE PHYSIOLOGIQUE, IMMUNOLOGIQUE ET APPROCHE PRELIMINAIRE EN PROTEOMIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Cédric MATHIEU

Septembre 2007

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Impact de la domestication suite à un stress chronique de confinement chez la perche commune (*Perca fluviatilis*) : analyse physiologique, immunologique et approche préliminaire en protéomique

MATHIEU Cédric

Résumé

Afin d'évaluer l'impact de la domestication sur les réponses physiologiques et immunologiques au stress de captivité, deux générations de perches (F1 et F4) ont été soumises à un stress de confinement chronique dans des bassins de 0,25m^2 pendant 55 jours. Des prélèvements ont été effectués avant le début de l'expérience ainsi qu'aux J7, 28 et 55. Au point de vue physiologique, nous observons que le taux de croissance spécifique des poissons confinés des 2 générations confondues (0,21 % j^{-1}) est inférieur à celui des contrôles (0,55 % j^{-1}). A J7, la cortisolémie des poissons confinés est supérieure à celle des non confinés, mais les prélèvements ultérieurs ont probablement été perturbés par des facteurs extérieurs. La glycémie moyenne des F4 (59,83 mg dl^{-1}) a été plus élevée ($P<0,05$) tout au long de l'expérience en comparaison à celle des F1 (49,16 mg dl^{-1}). La réponse immunologique du lysozyme est maximale au bout de 7 jours chez les poissons confinés (894 unités ml^{-1}) alors qu'elle est maximale à J28 chez les contrôles (1012 unités ml^{-1}). La production de radicaux libres (ROS) par les macrophages est plus élevée ($P<0,001$) tout au long de l'expérience chez les F4 que chez les F1 (respectivement 8,08 et 5,62 mg de NBT réduit g^{-1} de tissu). Cet effet compense les variations d'ISS observées ($P<0,001$) entre les générations : 0,16% pour les F1 contre 0,08% chez les F4. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de la concentration des Ig totales. Tout au long de l'expérience, la quantité de protéines sériques des F4 (44,53 mg ml^{-1}) est supérieure ($P<0,001$) à celle des F1 (37,95 mg ml^{-1}). De plus, les profils d'expression protéique (gels 2D au ruthénium) sont différents entre ces deux générations. En conclusion, l'acclimatation à l'aquaculture est bénéfique sur certains paramètres (ROS et protéines sériques) mais ne l'est pas pour d'autres (glycémie).

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Septembre 2007
Promoteur: P. Kestemont

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Effect of domestication during chronic confinement stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): physiological and immunological analyses and preliminary proteomic study

MATHIEU Cédric

Abstract

In order to study impact of domestication on physiological and immunological responses to captivity stress, 2 generations of perch (F1 and F4) have been submitted during 55 days to chronic confinement stress in 0.25m^2 tanks. Samplings have been done before the beginning of the study and on day 7, 28 and 55. Regarding physiology, we observe that specific growth rate in confined fish (0.21 % d^{-1}) is lower than in controls (0.55 % d^{-1}), regardless of domestication level. On day 7, cortisol in confined fish is higher than in controls but later samplings have been probably perturbated by external factors. During all the experiment, F4 glycemia (59.83 mg dl^{-1}) is higher ($P<0.05$) than in F1 (49.16 mg dl^{-1}). Lysozyme response of confined fish is highest on day 7 (894 units ml^{-1}) while in controls highest value is observed on day 28 (1012 units ml^{-1}). During all the experiment, F4 superoxyde radical production (ROS) in spleen is higher ($P<0.001$) than in F1 (8.08 and 5.62 mg of NBT reduced g^{-1} of tissue respectively). This effect compensates SSI variation observed ($P<0.001$) between F1 (0.16 %) and F4 (0.08 %) generations. No significant difference is observed in total immunoglobulin concentration. During all the experiment serum proteins in F4 (44.53 mg ml^{-1}) is higher ($P<0,001$) than in F1 (37.95 mg ml^{-1}). Protein expression profiles (2D ruthenium coloured gels) are different between the 2 generations. To conclude, aquaculture acclimation is benefit to some parameters (ROS and serum proteins) but not to others (glycemia).

Licence thesis in Biological Sciences
September 2007
Promotor: P. Kestemont

Arrivé au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes de l'URBO pour l'excellent accueil qu'ils ont réservé aux étudiants.

Premièrement je tiens à remercier mon promoteur, Professeur Kestemont et mes tuteurs, Jessica et Robert pour les très…trop nombreuses fautes laissées dans mes manuscrits et pour l'aide précieuse apportée dans la rédaction de ce mémoire.

Merci à toutes les personnes ayant participé aux prélèvements : Jessica, Robert, Neil, Carole, Emilie, Gersande, Mickael, Christian…ainsi qu'à toutes les personnes du CEFRA responsable de l'élevage des poissons.

Merci à Jessica pour les journées de labo passé ensemble à mettre au point le dosage du NBT et pour le dosage du lysozyme. T'en fait pas la prochaine manip ira beaucoup mieux…

Merci à Frédéric et Virginie de m'avoir appris la protéomique, à Emilie pour le dosage du NBT et à Robert pour le dosage du cortisol. Un tout grand merci à Marie-Claire pour m'avoir appris le dosage du glucose mais surtout pour m'avoir bien aidé ainsi que tous les autres étudiants dans le labo.

Merci à André pour les discussion du lundi matin sur le moto cross de la veille ainsi que pour la mise en place du circuit fermé à la cave…qui n'aura pas servit très longtemps.

Mon cœur, je tiens tout particulièrement à te remercier toi qui met tant de soleil dans ma vie. Merci de m'aimé depuis tout ce temps et de m'avoir supporté pendant ces quelques mois d'énervements mais aussi de joie à tes cotés. Merci aussi pour l'annotation des quelqueS eppendorfS et pour le broyage de rate.

Merci à tous les URBO, les 2 Mel's, Sophie, Noé, Kath, André Castor, Buch', Ln et Ivan pour la bonne ambiance au cours, au stage dans le jura, au souper URBO…mais surtout aux guindailles… URBO powaaa comme dirait nano.

Jacques, Laurent, Lio, Marie, Martial, Seb'président, Ln, Milou, Fanélie, Thibault, Aude, Nano, Christel etc. merci pour ces quelques années de cours ou de soirées passées ensemble.

Merci à mes parents de m'avoir permis de faire ces études. Ca y est c'est la fin…plus besoin de stresser.

Enfin merci à vous qui prendrez la peine de lire ce travail.

Liste des abréviations

α-MSH : Alpha Melanocyte Stimulating Hormone
ABTS : 2.2' – Azino-di-(3-éthyl-Benzthiazolin-sulfonat(6))
ACTH : Hormone Adéno Corticotropique
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANOVA : Analyse de variance
ARN_m : Acide ribonucléique messager
BSA : Albumine Sérique Bovine
CEFRA : Centre de Formation et de Recherches en Aquaculture
CRH : Hormone relchant la corticotropine
CRP : Protéine C-réactive
DDT : Dithiothreitol
Fc : Fraction Constante
GH : Hormone de croissance
H_2O_2 : Eau oxygénée
HPI : Hypothalamus-Hypophyse-Interrénale
HSD : Différence franchement significative
HSP : Protéine de choc Thermique
Ig : Immunoglobuline
IHS : Indice Hepato Somatique
ISS : Indice Spléno Somatique
L-15 : Leibovitz
LPS : Lipopolysaccharide
M : Molaire
MCH : Hormone concentrant la mélanine
Mh : Masse du foie
MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité
Mr : Masse de la rate
Mt : Masse totale de l'individu
N : Nombre d'échantillon
NBT : NitroBlueTetrazonium
PBS : Solution Tampon Phosphate
RIA : Radioimmunoassay
RPM : Tour Par Minute
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SE : Solution d'équilibration
SGR : Taux de Croissance Spécifique
TNF-α : Facteur de nécrose tumorale
Tp : Tampon

Table des matières

Introduction 1
1. Avant-propos 1
2. Description générale de la perche 1
2.1. Taxonomie et distribution géographique 1
2.2. Morphologie 2
2.3. Aquaculture 2
3. Le stress en aquaculture 2
3.1. La réponse au stress et son rôle 2
3.1.1. Réponse primaire 3
3.1.2. Réponse secondaire 3
3.1.3. Réponse tertiaire 4
3.2. Les facteurs responsables du stress 4
3.3. Les indicateurs du stress 5
3.3.1. Le cortisol 5
3.3.2. Le glucose 6
3.3.3. Les ions chlorures 7
3.3.4. Le taux d'hématocrite 7
3.3.5. Les protéines de stress 7
3.4. Les effets délétères du stress 8
3.5. Sélection des individus répondant moins au stress 9
4. Le système immunitaire chez les poissons 9
4.1. Immunité innée 9
4.2. Immunité acquise 10
5. Influence du stress sur le système immunitaire 12
5.1. Effet du stress sur le taux d'Ig sériques 12
5.2. Effet du stress sur le nombre de globules blancs circulants 13
5.3. Effet du stress sur l'activité phagocytaire 14
5.4. Effet du stress sur l'activité cytotoxique des leucocytes 15
5.5. Effet du stress sur l'activité du complément 15
5.6. Effet du stress sur la production des radicaux superoxydes 16
5.7. Effet du stress sur l'activité du lysozyme 17
5.8. Effet du stress sur la résistance aux pathogènes 17
5.9. Effet du stress sur les protéines sériques 18
6. Etat des connaissances en protéomique chez les poissons 19
6.1. Facteurs induisant un changement dans les protéines 19
7. Objectif de cette étude 20
Matériels et méthodes 21
1. Les poissons et l'expérience 21
2. Echantillonnage 22
2.1. Prélèvement du sang 22
2.2. Prélèvement des organes 22

3. Dosages des différents indicateurs 23
3.1. Le cortisol 23
3.2. Le glucose 24
3.3. Le lysozyme 24
3.4. Les radicaux superoxydes ou dosage NBT 24
3.5. Dosage des protéines 25
3.6. Dosage des immunoglobulines totales 25
4. Analyse statistique des résultats des dosages 26
5. La protéomique 27
5.1. Avantage de la protéomique 27
5.2. Description des manipulations 27
Résultats 30
1. Les paramètres mesurés sur les poissons 30
1.1. La masse moyenne des poissons 30
1.2. L'IHS (Indice Hépato Somatique) 31
1.3. L'ISS (Indice Spléno Somatique) 32
2. Les indicateurs de stress 33
2.1. Le cortisol sanguin 33
2.2. Le glucose sanguin ou glycémie 34
3. Les indicateurs du système immunitaire 36
3.1. Le lysozyme 36
3.2. La production de radicaux superoxydes au niveau de la rate 37
3.3. Les protéines sériques 38
3.4. Les immunoglobulines (Ig) totales 39
4. Approche préliminaire en protéomique 40
Discussion 42
1. Paramètres physiologiques 42
2. Discussion sur les paramètres immunologiques 47
Conclusion et perspectives 52
Bibliographie 53

Introduction

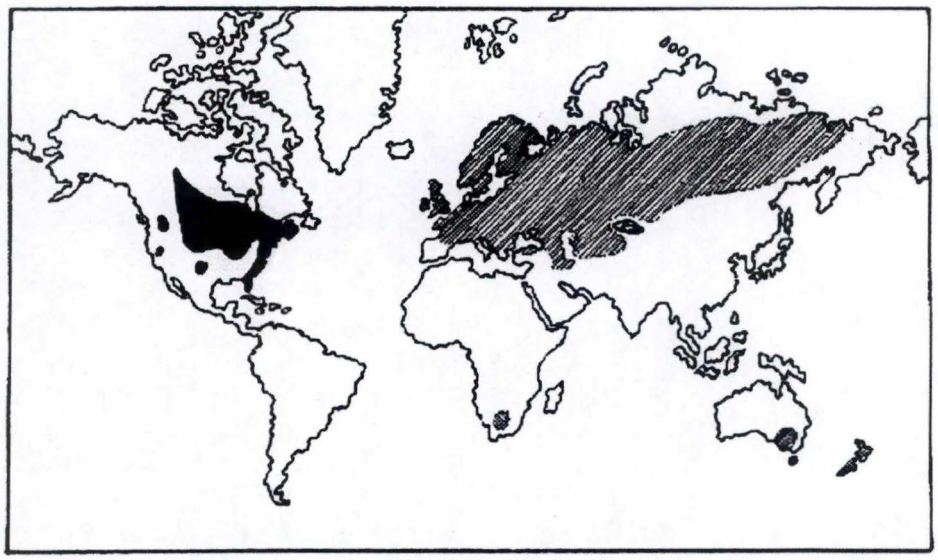


Figure 2.1 : Distribution des différentes espèces de *Perca* dans le monde (Craig, 2000) :

- *Perca flavecens*
- *Perca fluviatilis*
- *Perca schrenki*

Introduction

1. Avant-propos

L'aquaculture est en plein essor depuis quelques décennies. Actuellement, la stabilisation des captures de pêche ne permet plus de soutenir la demande mondiale en poissons qui ne cesse d'augmenter. Parallèlement à cela, l'aquaculture de la truite, traditionnelle en Europe, s'essouffle. Il est donc nécessaire de diversifier les marchés. L'aquaculture s'est entre autre tournée vers la perche commune, un poisson européen à la chair blanche très appréciée des connaisseurs afin d'en maîtriser la production et de pouvoir ainsi alimenter les marchés.

Jusqu'à présent, la principale source d'approvisionnement des marchés en perche provenait de la pêche dans les grandes rivières ou les grands lacs européens tel le Léman. Or, comme partout dans le monde, cette source n'est plus apte à fournir la demande. De plus, la qualité des poissons pêchés peut varier très fort en fonction de l'année ou du moment de la pêche.

Pour la perche commune (*Perca fluviatilis*), l'aquaculture en étang est pratiquée depuis longtemps. Cependant des problèmes de nanisme et de cannibalisme rencontrés chez cette espèce ont amené les aquaculteurs à améliorer la production jusqu'alors peu rentable. Il était donc nécessaire de mettre sur pied une aquaculture moderne et viable pour la perche (Fontaine, 2004). Toutefois, dans les élevages actuels, les conditions sont souvent proches de la limite de tolérance de l'espèce, et ce, pour assurer une croissance maximale. Cette exploitation soutenue n'est pas sans conséquences sur les poissons. En effet, le stress engendré peut avoir une influence sur le bien-être de l'animal.

Dans le but de mieux comprendre les besoins de la perche en élevage, une étude sur le stress qu'engendre le confinement souvent observé en aquaculture, et plus particulièrement l'effet de ce stress sur le système immunitaire, était nécessaire. En effet, il a déjà été prouvé qu'un tel stress chronique avait des effets délétères, notamment sur le système immunitaire, ce qui amène une augmentation de la mortalité. Parallèlement à cela, nous avons décidé de voir l'effet supposé bénéfique de la domestication de cette espèce dans les aquacultures.

Avant d'évoquer les résultats obtenus dans ce travail, voici un résumé de l'état actuel des connaissances dans le domaine du stress en aquaculture et de l'effet de celui-ci sur le système immunitaire suivi d'une présentation du matériel et des méthodes qui ont été utilisés dans le cadre de ce travail. Pour terminer, les résultats obtenus seront présentés et discutés.

2. Description générale de la perche

2.1. Taxonomie et distribution géographique

La perche *Perca fluviatilis* fait partie du genre *Perca*, de la famille des *Percidae* (sous famille des *Percinae*), regroupant 3 espèces: *Perca flavescens* originaire d'Amérique du Nord, *Perca schrenki* (Balkhush perch) présente uniquement dans l'Est du Kazakhstan et *Perca fluviatilis* ou perche commune (Eurasian perch) présente dans presque toute l'Eurasie et introduite sur presque tous les continents (cf. figure 2.1).

2.2. Morphologie

La perche commune est une espèce grégaire pouvant vivre jusqu'à 20 ans, mesurer jusqu'à 50 cm (moyenne de 20 à 35 cm) et peser jusqu'à 4 Kg (moyenne de 2 à 3 Kg). Son corps est recouvert de 6 à 9 bandes noires. Elle possède deux nageoires dorsales, dont une est épineuse. Ses nageoires inférieures sont rouge vif (Bruslé, 2001 ; Craig, 2000).

2.3. Aquaculture

Il a été constaté que le caractère grégaire de la perche était un avantage pour son aquaculture. De plus, la perche accepte relativement bien les aliments sous forme de granulés. Il a été déterminé que le meilleur système d'élevage pour la perche est le système intensif en circuit fermé car cette espèce est exigeante du point de vue de la température (croissance optimale entre 18 et 25°C en fonction des stades), de la qualité de l'eau (sensibilité aux eaux turbides) et qu'elle est sensible à différents parasites (Grignard *et al.,* 1996). Il est donc important de contrôler la qualité de l'eau pour avoir un rendement maximum. Or ceci n'est possible que dans les circuits fermés (Fontaine, 2004 ; Kestemont & Mélard, 2000).

De part son caractère grégaire, il a été constaté que la perche supporte de grandes densités d'élevage. En phase de grossissement, elle supporte des densités de plus de 100 kg m^{-3} et plus de 100 individus L^{-1} lors des premiers stades de développement, et ceci sans affecter la croissance.

3. Le stress en aquaculture

Le stress est défini comme étant des conditions de vie réelles ou perçues par un individu telles qu'elles dépassent ses capacités physiologiques à maintenir son homéostasie (Wedemeyer *et al.,* 1990 cité dans Frish & Anderson, 2005).

L'aquaculture intensive moderne impose de maximiser les rendements. Pour cela, il est nécessaire d'augmenter la densité souvent jusqu'au maximum de la tolérance de l'espèce et ceci dans des bassins toujours plus petits ou plus peuplés. Malheureusement, cette augmentation n'est pas sans conséquence sur la santé des poissons et encore moins sur leur bien-être. Chaque espèce de poisson a besoin d'un certain espace vital. Des bassins trop petits conduisent à une augmentation du stress par confinement des individus. De plus, en aquaculture, les poissons sont régulièrement pesés, transportés, triés, etc. Toutes ces manipulations induisent un stress chez les poissons. En milieu naturel, les poissons subissent aussi des stress qui peuvent être liés à la présence de prédateurs, de polluants, de bateaux (Wysocki *et al.,* 2006), à des changements dans l'oxygène dissout, dans la salinité ou la température (Davis, 2004) etc. Les poissons sont donc naturellement préparés pour répondre à certains types de stress mais ceux-ci sont parfois forts différents de ceux rencontrés en conditions d'élevage.

3.1. La réponse au stress et son rôle

Un individu exposé à un stresseur est obligé de le contrer pour survivre. Pour cela, il met en place toute une série de mécanismes physiologiques et biochimiques ainsi qu'une réponse

Tableau 3.1 : Concentrations en catécholamines (nM) ± un écart-type atteintes chez différentes espèces de poissons exposés à différents stress (Gamperl *et al.*, 1994).

Species	Type of stress	Level of catecholamines				Comments	Source
		Epinephrine		Norepinephrine			
		Rest	Stress	Rest	Stress		
Scyliorhinus canicula	2–3 min tail grab	5.9 ± 1.2	96.3 ± 28	14.0 ± 4.6	96.5 ± 38		Butler *et al.* (1986)[C]
Oncorhynchus mykiss	2 min tail grab	27.3 ± 11.3	157	17.7 ± 5.9	16.3	Blood collected by caudal severence	Nakano and Tomlinson (1967)[A]
O. mykiss	3 min tail grab	1.5 ± 0.5	7.9 ± 1.7	1.1 ± 0.3	4.5 ± 2.0	Sampled 5 min post-handling	Ristori and Laurent (1985)[B]
O. mykiss	2–3 min tail grab	1.4 ± 0.5	212 ± 89	10.2 ± 2.4	85 ± 46	Fish held in seawater	Butler *et al.* (1986)[C]
Platichthys stellas	10 min violent chase	19.1 ± 6.5	21.7 ± 4.3	27.5 ± 6.4	29 ± 8.0	Rest sample taken after transfer	Milligan and Wood (1987)[D]
O. mykiss	6 min violent chase	2.2 ± 1.6	29.7 ± 0.3	2.7 ± 1.8	36.4 ± 8.4	Rest sample taken after transfer	Milligan and Wood (1987)[D]
O. mykiss	6 min violent chase	30.5 ± 5.0	358 ± 102	29.7 ± 3.0	445 ± 160		VanDijk and Wood (1988)[D]
O. mykiss	10 min violent chase	2.6	179.7	3.3	51.1	Fish held in fresh water	Tang and Boutilier (1988)[C]
O. mykiss	10 min violent chase	1.9	88.1	1.7	19.5	Fish held in seawater	Tang and Boutilier (1988)[C]
Pollachius pollachius	Handling in swim tunnel	6.5	183 ± 90	11	35 ± 3.5		Axelsson *et al.* (1987)[C]
Labrus mixtus	Handling in swim tunnel	2	178 ± 108	2	68 ± 11.8		Axelsson *et al.* (1987)[C]
Anguilla anguilla	Surgery/cannulation	NR	4.0 ± 1.1	NR	18.9 ± 6.7	Sampled 5 min post-surgery	LeBras (1982)[B]
O. mykiss	Surgery/cannulation	1.4 ± 0.8	4.1	2.2 ± 1.5	3.5	Sampled 6 h post-surgery	Gingerich and Drottar (1989)[D]
O. mykiss	Acute hypoxia	3.9 ± 0.6	98.9 ± 18.2	1.0 ± 0.2	16.3 ± 3.1	P_aO_2 not below 10 Torr	Fievet *et al.* (1990)[C]
O. mykiss	Acute hypoxia	NR	296 ± 5.0	NR	69 ± 1.0	P_aO_2 stabilized below 10 Torr	Fievet *et al.* (1990)[C]
O. mykiss	30 min acute hypoxia	1.9 ± 0.3	280	1.1 ± 0.3	85	P_aO_2 of 14.7 Torr	Perry and Reid (1992)[C]
Anguilla anguilla	30 min acute hypoxia	0.84 ± 0.1	4.5	0.53 ± 0.1	2.8	P_aO_2 of 8.7 Torr	Perry and Reid (1992)[C]
O. mykiss	External hypercapnia	1.0	24.1 ± 12.7	1.8	9.7 ± 4.4		Perry *et al.* (1987)[C]
Gadus morhua	10 min air exposure	29.8 ± 6.8	293 ± 91	13.2 ± 1.8	32.1 ± 7.4	Rest sample 1 h post-cannulation	Wahlquist and Nilsson (1980)[A]
Cyprinus carpio	15 min air exposure	0.5 ± 0.2	16.2 ± 5.5	5.3 ± 3.1	30.7 ± 7.0		Fuchs and Albers (1988)[C]
O. mykiss	Acid infusion	0.9	5.2 ± 1.7	0.6	1.2 ± 0.3	Sampled 5 min post-injection	Boutilier *et al.* (1986)[C]
O. mykiss	Exhausted at 2 BL s^{-1}	1.4 ± 0.5	14.4 ± 3.3	10.2 ± 2.4	22.8 ± 6.1	Fish held in seawater	Butler *et al.* (1986)[C]

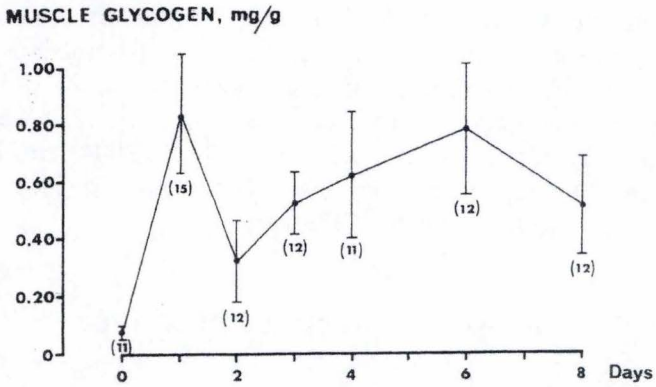


Figure 3.1 : Evolution de la concentration en glycogène ± un écart-type contenus dans des muscles de perches (*Perca fluviatilis*) après capture et durant une période de récupération de 8 jours. Le nombre de poisson est donné entre parenthèses (Haux *et al.*, 1985).

comportementale plus ou moins prononcée selon le type de stress subi. Ces mécanismes assureront le maintien de l'homéostasie chez l'individu stressé, ce qui permettra une survie immédiate. Toutefois, si le stress perdure dans le temps, le prolongement de la réponse peut conduire à des effets délétères (Rotllant *et al.*, 2001 ; Ruane *et al.*, 2002 ; Ortuño *et al.*, 2001).

La réponse au stress varie selon la durée, l'intensité et le type de stresseur. Elle se déroule en plusieurs étapes appelées réponse primaire, secondaire et tertiaire, décrites brièvement si dessous.

3.1.1. Réponse primaire

La première étape de la réponse physiologique au stress comprend la perception du stress qui est suivie d'une réponse de type neuroendocrine et endocrine (Iwama *et al.*, 2004). Cette réponse consiste en une réponse de type adrénergique et en une stimulation de l'axe HPI (Hypothalamus-Hypophyse-Interrénale) (Frisch & Anderson, 2005).

La réponse adrénergique consiste en une libération de catécholamines dans le système sanguin (Tableau 3.1). Les catécholamines servent à des ajustements au niveau respiratoire, métabolique et circulatoire. Ces ajustement facilitent l'apport d'oxygène et la mobilisation des réserves énergétiques en augmentant la glycogénolyse au niveau des muscles (voir figure 3.1) (Gamperl *et al.*, 1994 ; Jentoft *et al.*, 2005), la lipolyse au niveau des tissus adipeux (Ruane *et al.*, 2002) et le rythme cardiaque (effet chronotrope et inotrope). Toutes ces actions ont pour but de préparer l'individu à contrer le stress en lui permettant, si besoin est, de bénéficier d'un surplus d'énergie. La réponse adrénergique est presque aussi rapide que la réponse comportementale de fuite ou de lutte due à un stresseur. Elle est aussi étroitement liée à l'intensité du stresseur. De plus, le type de catécholamines libérées sera fonction du type de stresseur et ceci dans le but de répondre le plus efficacement possible à la demande créée par ce dernier.

La stimulation de l'axe HPI aboutit à la production de glucocorticostéroïdes comme le cortisol. Le cas du cortisol est détaillé ci-dessous.

3.1.2. Réponse secondaire

La réponse secondaire consiste en une série de modifications physiologiques permettant à l'individu d'être plus apte à affronter le stress. Ces réponses physiologiques ont lieu au niveau cardio-vasculaire, respiratoire, osmotique et métabolique et sont dues aux hormones libérées lors de la réponse primaire (Iwama *et al.*, 2004). Ces adaptations permettent, par exemple, un accroissement des capacités respiratoires en augmentant le nombre des globules rouges relâchés par la rate et la concentration en hémoglobine, en modifiant le pH au niveau des organes afin que l'hémoglobine relâche plus facilement ses molécules d'oxygène (effet Bohr), etc. (Gamperl *et al.*, 1994). Toutes ces modifications se mettant en place en quelques heures, permettent à l'individu d'augmenter ses capacités respiratoires pour répondre au stress. Ces adaptations modifient aussi l'osmorégulation.

Enfin, la réponse secondaire a aussi lieu au niveau de l'axe HPI. Ceci conduit à la mobilisation des réserves énergétiques et à la libération de glucose dans le sang en empêchant, par l'intermédiaire de catécholamines, la néoglucogenèse et la synthèse protéique.

3.1.3. Réponse tertiaire

La réponse tertiaire s'observe seulement dans le cas d'un stresseur chronique (Frisch & Anderson, 2005). Elle concerne l'organisme entier et la population (Iwama *et al.,* 2004). Cette réponse consiste surtout en une réduction des capacités reproductrices, immunitaires et/ou de croissance de l'individu (Ruane *et al.,* 1999). En effet, pour contrer et surmonter le stresseur, l'énergie initialement attribuée à ces trois fonctions est détournée et utilisée au sein de la réponse au stress afin d'assurer la survie de l'individu. Cette réponse tertiaire peut se manifester par une inhibition complète des capacités reproductrices des individus dominés maintenus sous stress chronique. Au niveau de la population, la diminution du recrutement et de la productivité peut altérer l'abondance et la diversité des communautés d'espèces (Iwama *et al.,* 2004).

3.2. Les facteurs responsables du stress

En aquaculture intensive, les conditions d'élevage imposées aux poissons par les pisciculteurs peuvent constituer un stress plus ou moins important. Les différentes sources de stress identifiées à ce jour dans les élevages sont décrites ci-dessous.

Chaque espèce requiert une certaine qualité physique et chimique de l'eau nécessaire à son bien-être. La qualité dépend de différents paramètres tels la température, la luminosité, le pH et la teneur en oxygène dissout et en divers déchets (ammonium, nitrites, nitrates) (Conte, 2004). Tous ces paramètres, s'ils ne sont pas respectés, peuvent affecter le bien-être du poisson. En aquaculture intensive, les conditions d'élevage évoluent souvent vers le seuil de tolérance de l'espèce, ce qui peut constituer un stress.

Dans toutes les industries alimentaires animales, le transport et la manipulation sont souvent des activités stressantes pour les animaux (Acerete *et al.,* 2004 ; Jentoft *et al.,* 2005). En aquaculture, le tri en fonction de la taille nécessite souvent une mise hors de l'eau des poissons. Cette mise hors de l'eau se fait à l'aide de filets ou de pompes. Si les filets sont mal utilisés, cela peut induire un stress important chez les poissons du bassin tout en retirant le mucus cutané protecteur. Ceci rend les poissons plus vulnérables aux parasites. Le changement de bassin peut conduire à un stress important, voire mortel, si la différence de température ou de qualité d'eau entre les deux bassins est trop importante et ceci même si le seuil de tolérance de l'espèce n'est pas atteint. Il faut en effet éviter des changements trop abrupts et favoriser les changements graduels (Conte, 2004).

Des liens ont été établis entre le bien-être du poisson et la ressemblance du bassin d'élevage aux conditions environnementales de son milieu de vie. La réaction du poisson selon la couleur du bassin et l'intensité lumineuse a été étudiée (Head & Malison, 2000). Chez le pagre commun (*Pagrus pagrus*), la couleur du poisson peut varier suivant la couleur du bassin. De plus, la couleur du bassin peut influencer la réponse du poisson à un stress de densité (Rotllant *et al.,* 2003).

Dans les bassins d'élevage, les poissons sont maintenus à une densité supérieure à celle du milieu naturel. Cela induit une compétition intense pour la nourriture et l'espace disponible. A l'opposé, du fait de l'élevage monospécifique et du regroupement des poissons par classes de taille dans les bassins, les compétition interspécifique et interclasse sont diminuées, ce qui réduit le stress (Conte, 2004).

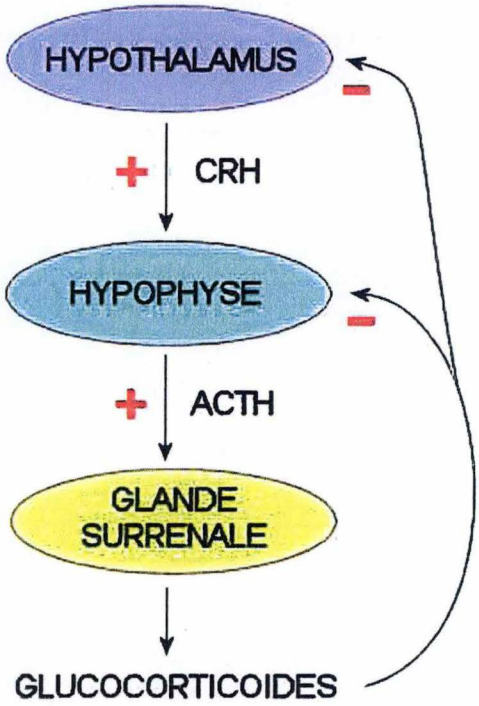


Figure 3.2 : Chaîne permettant la production de glucocorticoïdes comme le cortisol (http://fr.wikipedia.org/wiki/Hormone_corticotrope).

Il est important de distinguer la charge et la densité. La charge se calcule en fonction du renouvellement de l'eau dans les bassins en kg de poissons L^{-1} min^{-1}. La densité représente la quantité de poissons présents dans les bassins. On la calcule donc en kg m^{-3}. Dans ce travail, c'est le stress de confinement qui est étudié. Le confinement est une réduction de l'espace de vie ou de la perception de celui-ci par l'individu. Il constitue, pour les poissons qui y sont exposés, un stress chronique ou aigu en fonction du temps qu'il dure. Les stress aigus sont intenses et courts (une mise hors de l'eau des poissons par exemple) ce qui permet aux poissons de répondre au stress et d'en récupérer. Avec ce type de stress, on peut notamment observer un retour à l'homéostasie. Les stress chroniques, quant à eux, sont souvent moins violents, mais durent plus longtemps, ce qui conduit à des effets plus sévères sur le long terme (Portz *et al.,* 2006). La réponse des individus exposés à ces deux types de stress différents ne sera donc pas la même (Ortuño *et al.,* 2001).

En élevage, les poissons sont souvent exposés à une combinaison de plusieurs facteurs de stress en même temps, ou consécutivement, ce qui rend encore plus compliquée l'interprétation des résultats à cause de l'interaction des stress entre eux. Un stress lié à l'augmentation de la température par exemple, entraînera souvent en même temps un stress d'hypoxie, ou encore, un classement des poissons en fonction de leur taille peut être suivi d'une vaccination (Ortuño *et al.,* 2002).

3.3. Les indicateurs du stress

Il existe de nombreux paramètres permettant de visualiser l'état de stress d'un individu. Ci-dessous, nous allons détailler les indicateurs les plus couramment employés. Nous justifierons également la pertinence et l'intérêt des indicateurs que nous avons choisi lors de notre étude.

3.3.1. Le cortisol

Le cortisol est souvent considéré comme l'indicateur de stress par excellence. En effet, comme le montre Jentoft *et al.* (2005), la concentration en cortisol dans le sang peut augmenter de plus de 10 fois chez la perche commune en cas de stress aigu.

Le cortisol est le corticostéroïde le plus abondant et le plus actif dans le sang. Il est libéré lors de la réponse primaire au stress. Sa structure a été conservée tout au long de l'évolution. Elle est en effet identique chez tous les vertébrés (Gregory & Wood, 1999). Sa sécrétion au niveau de l'interrénale chez les poissons est sous le contrôle d'hormones libérées au niveau de l'axe HPI (hypothalamus-hypophyse-interrénale) : l'ACTH (Adéno Cortico Tropic Hormone) provenant de l'hypophyse et la CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) par l'hypothalamus en cas de stress aigu (Pepels *et al.,* 2004 ; Pottinger & Carrick, 2001). L'ACTH étant elle-même sous contrôle de la CRH (Rotllant *et al.,* 2001) (cf. figure 3.2). L'α-MSH (Alpha melanocyte stimulating hormone), la GH (Growth hormone) et les catécholamines peuvent aussi stimuler directement ou indirectement la sécrétion de cortisol (Rotllant *et al.,* 2003).

Le niveau de cortisol varie de façon diurnale (rythme circadien), et est plus ou moins important en fonction de la saison (rythme saisonnier). Le taux de cortisol augmente fortement en cas de stress aigu. Une fois le stress disparu, le taux de cortisol diminue plus ou moins rapidement grâce à l'action combinée de la diminution de la sécrétion, de l'incorporation de

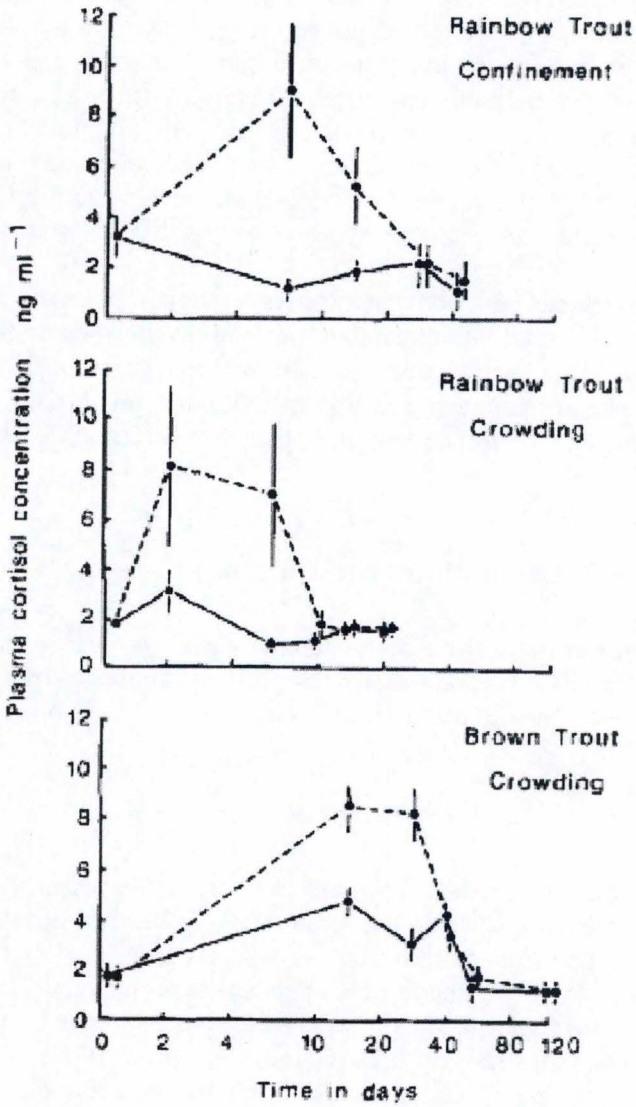


Figure 3.3 : Exemples de réponses du cortisol ± un écart-type de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et de truites fario (*Salmo trutta* L.) à un stress de confinement ou de surpopulation : (--- : poissons stressés et ___ : poissons contrôles) (Pickering & Pottinger, 1989).

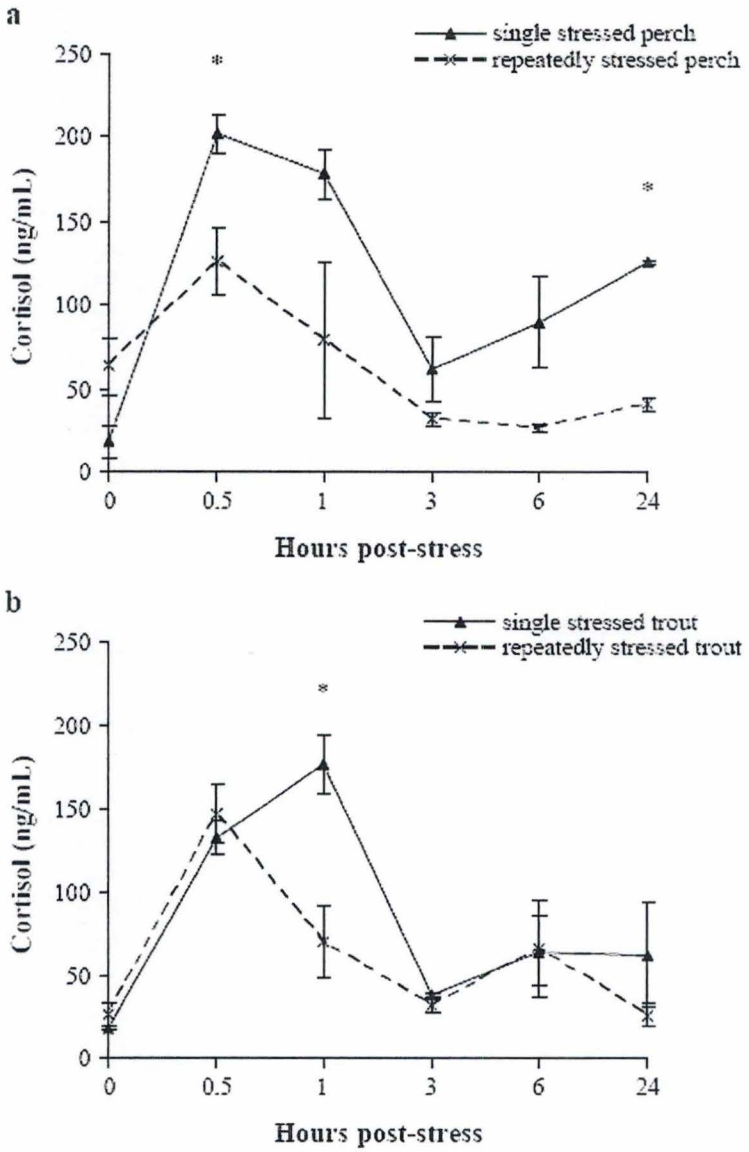


Figure 3.4 : Niveau de cortisol sérique ± un écart-type après un stress répété ou unique chez des perches *Perca fluviatilis* (a) et des truites *Oncorhynchus mykiss* (b). Dosage effectué sur 3 pools de 3 poissons. * : différence significative (P<0,05) (Jentoft *et al.,* 2005).

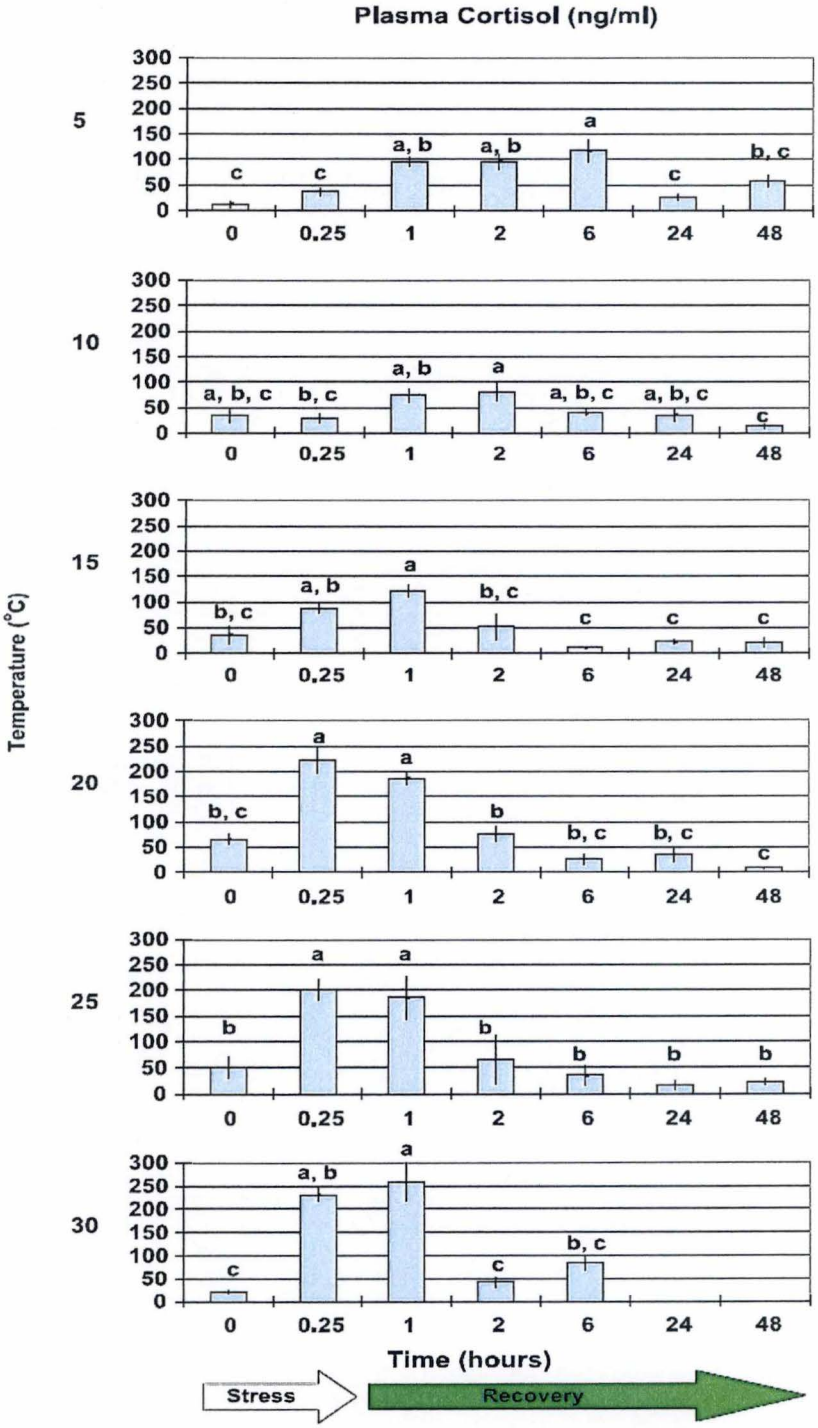


Figure 3.5 : Concentration plasmatique de cortisol durant et après un stress de confinement dans peu d'eau mesurée chez des hybrides de bars rayés (*Morone saxatilis***Morone chrysops*) acclimatés à différentes températures (Davis, 2004).

Tableau 3.2 : Concentrations en cortisol plasmatique (ng/ml) ± un écart-type atteintes chez différentes espèces de poissons après avoir été soumis à une variété de stress (Gamperl *et al.*, 1994).

Species	Type of stress	Level of cortisol		Comments	Source
		Rest	Stress		
Salvelinus fontinalis	Transfer to seawater	28 ± 9	74 ± 14	Sampled 48 h after transfer	Nichols *et al.* (1985)[A]
Oncorhynchus kisutch	Transfer to seawater	2.9	49 ± 13	Sampled 24 h post-exposure	Avella *et al.* (1990)[A]
O. kisutch	Transfer to seawater	8	50	Sampled 24 h post-exposure	Redding *et al.* (1984b)[A]
O. mykiss	Swimming at 5 BL s^{-1} (2 h)	63 ± 26	297 ± 41	Fish not cannulated	Zelnik and Goldspink (1981)[A]
Salmo salar (parr)	Swimming at 3.5 BL s^{-1} (8 h)	48	340		Virtanen and Forsman (1987)[A]
O. mykiss	Exposure to pH 4.8 (4 h)	131 ± 25.7	224 ± 72.7	Cannulated fish confined in 'black box'	Goss and Wood (1988)[A]
O. mykiss	90 s handling and confinement	ND	45.7 ± 5.4	Sampled 15 min post-stress	Barton *et al.* (1980)[A]
Hemitripterus americanus	1 min air exposure, 1 min chase	36.4 ± 6.1	157.4 ± 2	Sampled at 2 h post-stress	Vijayan and Moon (1992)
O. mykiss	3 min handling	11 ± 3	127 ± 14	Sampled 30 min post-stress	Vijayan and Moon (1992)[A]
Salmo trutto	2 min handling	27.5 ± 10.5	130 ± 39	Sampled 2 h post-stress	Pickering *et al.* (1982)[A]
O. mykiss	Disturbed in tank for 5 min	18.2 ± 3.1	107 ± 15.1	Sampled immediately via caudal puncture	Laidley and Leatherland (1988)[A]
O. mykiss	6 min chase to exhaustion	25 ±7.0	135 ± 7.0	Resting sample taken from transferred fish	Milligan and Wood (1987)[A]
O. mykiss	3, 2 min disturbances in swim tunnel	15 ± 4	61 ± 9	Sampled 1 h post-stress	Barton and Schreck (1987)[A]
O. tshawytscha	30 s handling stress	61	182	Sampled 1 h post-stress	Barton *et al.* (1986)[A]
O. tshawytscha	3, 30 s handling stresses	32	476	Sampled 1 h after last stress	Barton *et al.* (1986)[A]
Salmo trutta	net transfer/confinement (1 h)	2	126 ± 10.0	Sampled 1 h post-stress	Pickering and Pottinger (1989)[A]
O. mykiss	net transfer/confinement (1 h)	2	63 ± 9	Sampled 1 h post-stress	Pickering and Pottinger (1989)[A]
O. mykiss	12 h net confinement	2.0 ± 0.8	110 ± 9	Sampled 30 min post-stress	Caldwell Woodward and Strange (1987)[A]
O. mykiss	24 h of confinement	14.3 ± 3.0	55 ± 15		Pottinger (1990)[A]
Platichthys flesus L.	Net confinement for net	10.4	86.6	Sampled immediately	Waring *et al.* (1992)[A]
O. tshawytscha	Severe confinement for 30 min	2	221 ± 23	Sampled 1.5 h post-stress	Strange *et al.* (1978)[B]
O. tshawytscha	Severe confinement for 30 min	32 ± 12	260 ± 20	Sampled immediately	Strange and Schreck (1978)[B]
Sciaenops ocelltus	30 min handling and confinement	> 10	250	Sampled 1 h after stress	Robertson *et al.* (1987)[A]
O. kisutch	Net transfer/confinement (30 min)	6.6 ± 1.1	221 ± 26		Sumpter *et al.* (1986)[A]
O. mykiss	Net transfer/confinement (30 min)	5.4 ± 1.1	100 ± 17.1		Sumpter *et al.* (1986)[A]
O. tshawytscha	Chronic *Saprolegnia* infection	–	95 ± 12.0	Samples taken from resting fish	Sumpter *et al.* (1986)[A]
O. tshawytscha	Net transfer	5.6 ± 4.0	77.2 ± 13.3	Sampled 30 min post-stress	Strange and Schreck (1978)[B]
O. mykiss	Crowding for 6 days	1.9	7.9 ± 3.1		Pickering and Pottinger (1989)[A]
O. mykiss	Transfer to chilled water	ND	82 ± 8.2	Sampled 4 h post-exposure	Barton and Peter (1982)[A]
O. nerka	3 h transport under anaesthesia	25	466		Fagerlund (1967)[C]

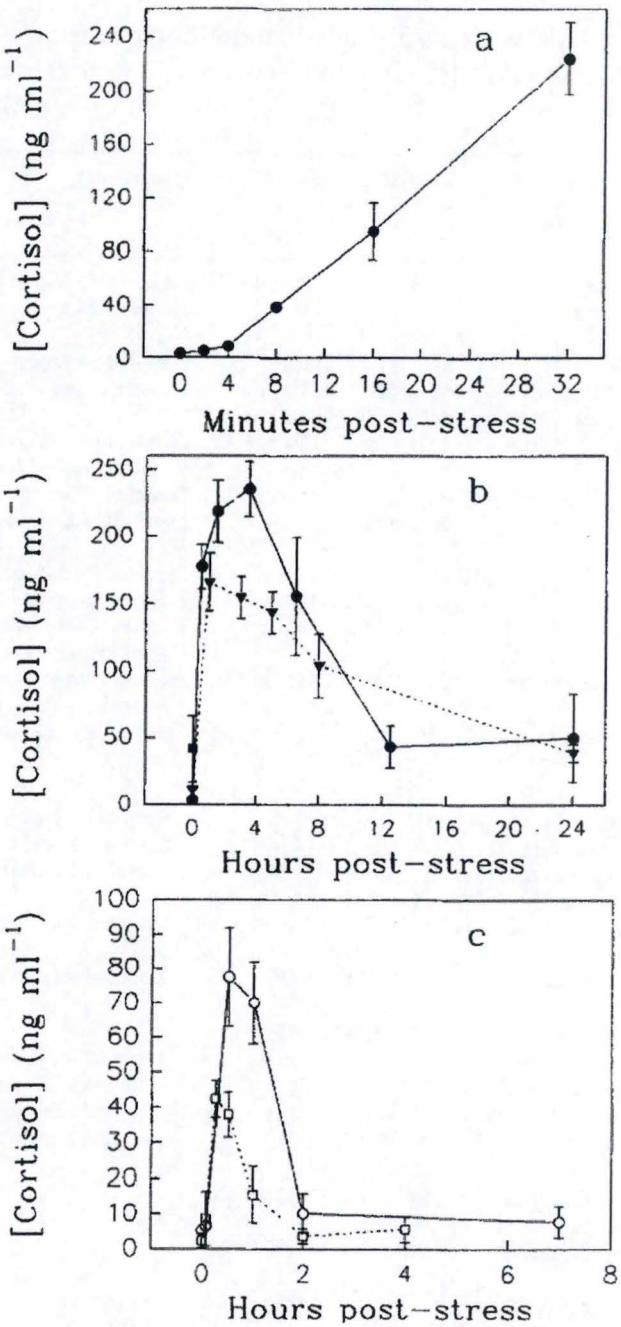


Figure 3.6 : Evolution, au cours du temps, de la concentration plasmatique en cortisol ± un écart-type de différentes espèces de salmonidés soumises à une variété de stress (Gamperl *et al.*, 1994) :

(a) Saumons argentés soumis à un stress de manipulation et de confinement (Sumpter *et al.*, 1986)

(b) (•) Saumons argentés confinés pendant 30min (Strange et *al.*, 1978) ; (triangle) Saumons atlantiques confinés pendant 9min (Waring *et al.*, 1992)

(c) (carré) Truites arc-en-ciel manipulées pendant 90sec et confinées (Barton et *al.*, 1980) ; (o) Saumons chinook transférés dans un nouveau bassin (Strange & Schreck, 1978).

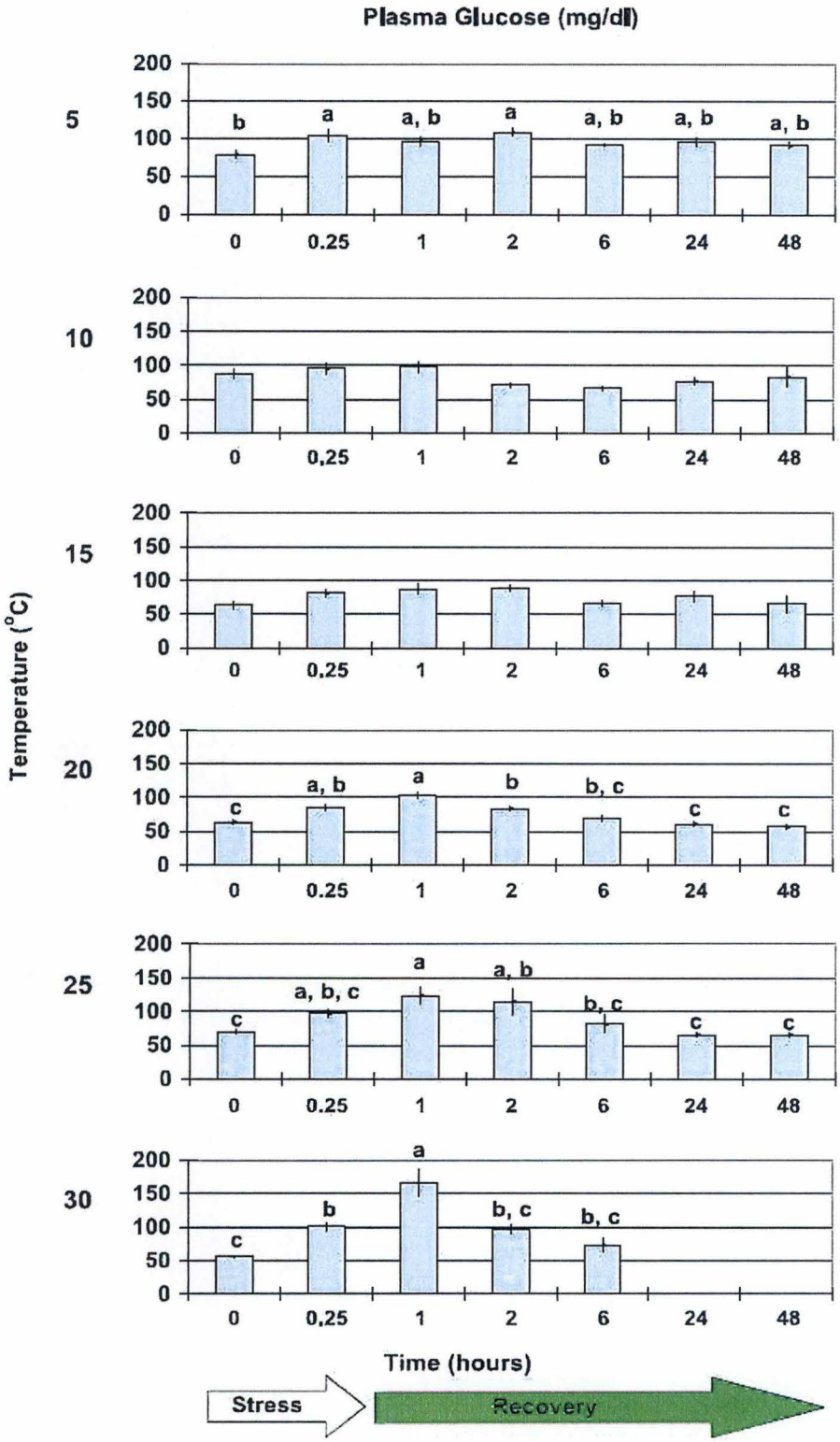


Figure 3.7 : Concentration en glucose plasmatique durant et après un stress de confinement dans peu d'eau mesurée chez des hybrides de bars rayés (*Morone saxatilis*Morone chrysops*) acclimatés à différentes températures (Davis, 2004).

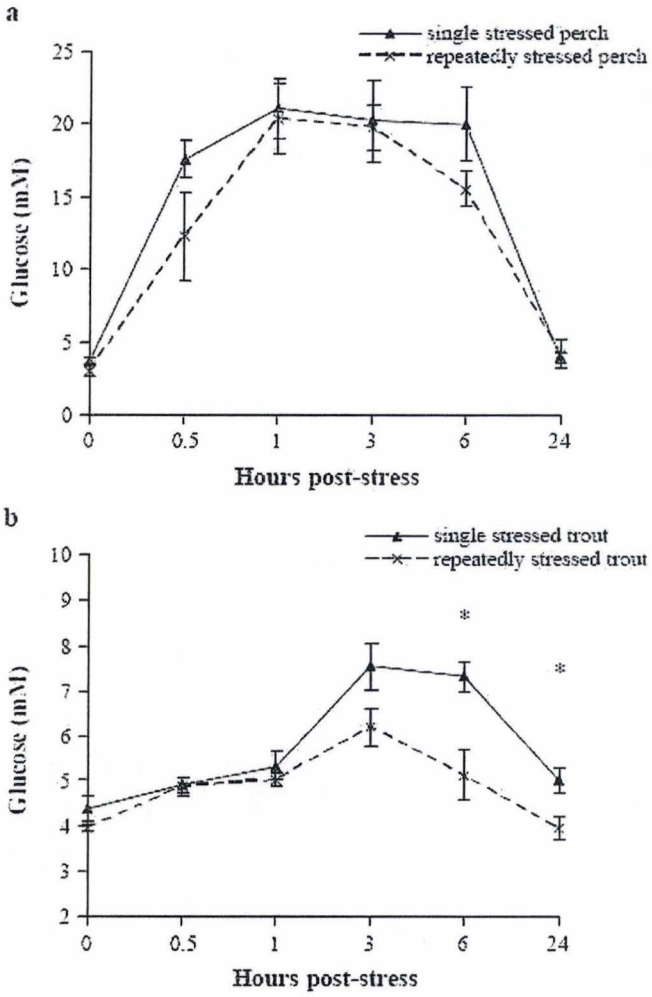


Figure 3.8 : Concentration moyenne du glucose sanguin ± un écart-type après un stress répété ou unique chez des perches *Perca fluviatilis* (a) et des truites *Oncorhynchus mykiss* (b). Dosage effectué sur 4 à 9 poissons. * : différence significative (P<0,05) (Jentoft *et al.*, 2005).

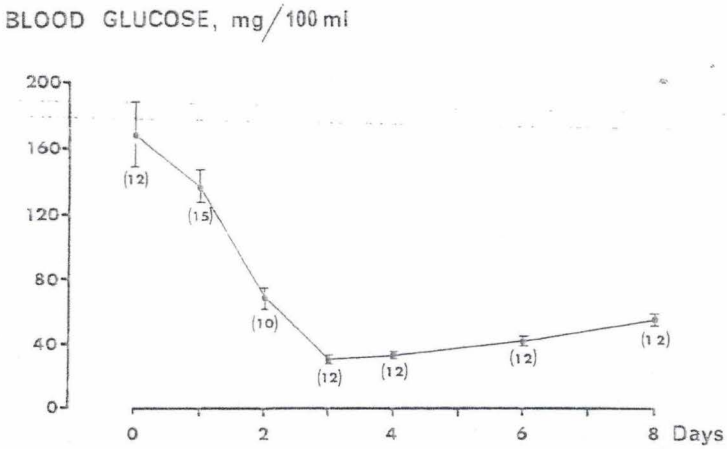


Figure 3.9 : Evolution de la concentration de glucose sanguin ± un écart-type de perches (*Perca fluviatilis*) après une capture et durant une période de récupération de 8 semaines. Nombre de poissons entre parenthèses (Haux *et al.*, 1985).

cortisol par les tissus et de l'excrétion dans la bile notamment (Davis & Small, 2006 ; Portz *et al.*, 2006). En cas de stress chronique, le taux de cortisol circulant reste élevé. Il peut également être élevé chez les individus ayant un rang social inférieur, car ceci agit comme un stress chronique. Même lorsque les poissons sont nourris en abondance, un taux élevé de cortisol affecte la croissance. Ce phénomène est accentué du fait que les poissons ayant un taux élevé de cortisol ont un appétit plus faible (Gregory & Wood, 1999). Si le taux de cortisol reste en permanence élevé, l'organisme s'habitue progressivement et augmente l'efficacité de ses mécanismes de dégradation du cortisol. Le taux de sécrétion du cortisol restera donc tout aussi élevé, mais il sera plus efficacement dégradé, permettant un retour à des valeurs basales du niveau de cortisol circulant. Cette facilitation de retour au niveau basal influencerait bien plus la croissance que le niveau de cortisol en lui-même. En effet, ce serait le temps d'exposition des cellules au cortisol qui serait déterminant bien plus que la quantité de cortisol en elle-même (Weil *et al.*, 2001).

Le cortisol permet le maintien de l'osmorégulation et de la balance énergétique du métabolisme en agissant premièrement au niveau des branchies, du foie et des intestins. Il joue également un rôle dans le maintien de l'homéostasie en mobilisant les réserves énergétiques telles que le glucose, les acides gras et les lipides. C'est d'ailleurs pour son rôle dans la mobilisation des réserves énergétiques qu'il serait libéré lors d'un stress. Sa libération lors d'un stress conduit généralement à des effets positifs sur l'animal, mais peut devenir néfaste à long terme. En effet, le cortisol est connu pour être immunosuppresseur quand il est présent de façon chronique (Davis, 2004 ; Portz *et al.*, 2006).

Le cortisol étant libéré très rapidement et en quantité plus ou moins importante, il est régulièrement dosé dans le cas d'études visant à déterminer l'état de stress du poisson (Acerete *et al.*, 2004 ; Jentoft *et al.*, 2005 ; Auperin *et al.*, 1997 ; Ruane *et al.*, 2002 ; Vazzana *et al.*, 2002). En effet, il permet de connaître la durée et l'intensité du stress (Jentoft *et al.*, 2005). Toutefois, sa concentration peut varier fortement en fonction du type de stresseur (voir figure 3.3), de l'espèce (voir figure 3.3 et 3.4), de la variabilité individuelle, du vécu du poisson (voir figure 3 .4), de la température (cf. figure 3.5 Davis, 2004), de la saison, du milieu environnemental (voir tableau 3.1), de l'état sexuel, du statut nutritionnel et de la durée de l'échantillonnage après le stress (voir figure 3.4, 3.6 et tableau 3.2) (Gamperl *et al.*, 1994). En cas de stress multiples, la réponse au stress en terme de cortisol peut être prolongée (Ortuño *et al.*, 2002).

3.3.2. Le glucose

La libération du glucose dans le sang est une des conséquences de l'augmentation du taux de cortisol sanguin et est due à la sécrétion de catécholamines dans le sang. Le glucose est un des éléments de la réponse secondaire au stress. Il permet à l'animal de disposer de suffisamment d'énergie pour combattre le stress. Il est souvent accompagné d'une augmentation du taux de lactate sanguin résultant des activités musculaires en condition anaérobique (Haux *et al.*, 1985 ; Rotllant *et al.*, 2001 ; Frisch & Aderson, 2005).

Comme dans le cas du cortisol, la libération de glucose dans le sang est fonction de l'espèce étudiée et du vécu du poisson. En effet, comme le montre la figure 3.8, Jentoft *et al.* (2005) ont démontré que la réponse secondaire à un stress de manipulation était beaucoup plus rapide dans le cas de la perche que dans celui de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une espèce de poisson élevée depuis beaucoup plus longtemps que la perche. La perche est donc plus sensible que la truite au stress de manipulation. Il faut aussi tenir compte du fait que la perche utiliserait

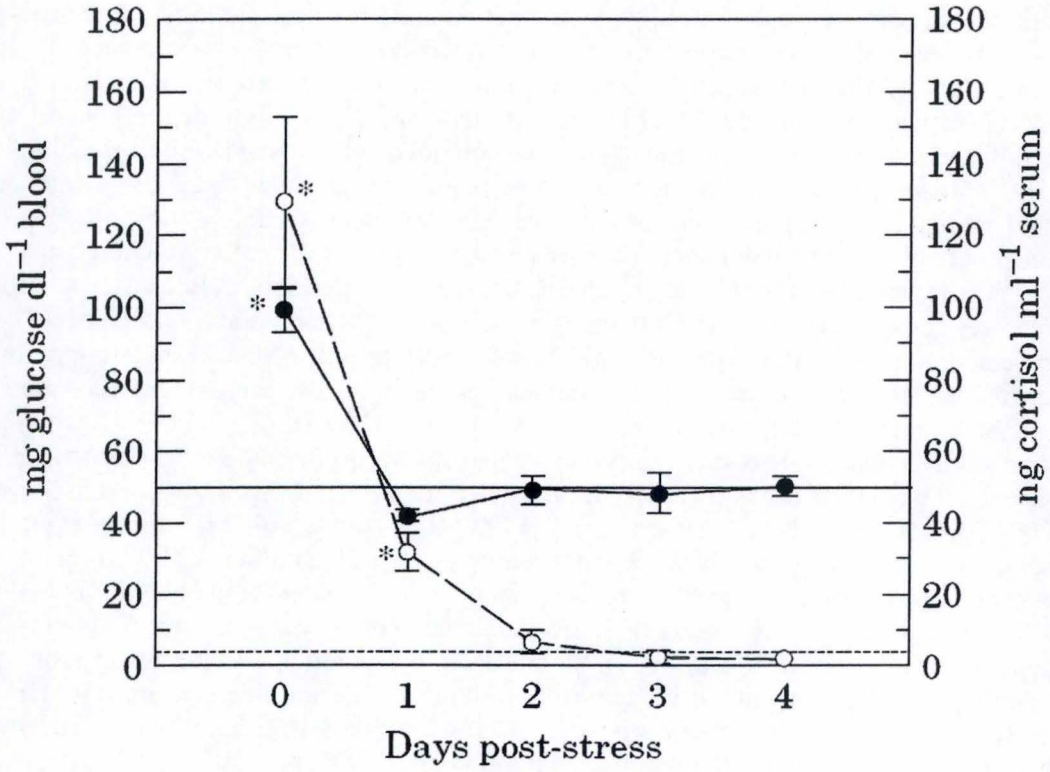


Figure 3.10 : Niveau du glucose (•) et du cortisol (o) sanguin de poissons stressés par une augmentation de la densité (moyenne ± un écart-type) et de contrôles non stressés (moyenne du groupes : barres horizontales) après un stress d'augmentation de densité de 2 heures chez *Sparus aurata* L. * : différence significative entre les contrôles et les stressés (P<0,05) (Ortuño *et al.*, 2001).

plus de sucres que la truite et que la température d'élevage est différente, ce qui influencerait la quantité de glucose libéré en cas de stress (cf. figure 3.7 Davis, 2004).

Comme dans le cas du cortisol, la réponse en glucose à plusieurs stress combinés est additive, si ces stresseurs sont appliqués avec un temps d'attente entre deux stresseurs, sinon la réponse reste la même que celle observée dans le cas d'un stress unique (Ortuño *et al.,* 2002). La mobilisation de ce glucose dans la réponse au stress a une influence sur la croissance car ce sucre ne sera pas alloué au catabolisme. Après la disparition du stress, le poisson retrouve un niveau basal de glucose dans un délai d'un à trois jours (voir figure 3.8, 3.9 et 3.10, Haux *et al.*, 1985 ; Ortuño *et al.,* 2001).

3.3.3. Les ions chlorures

Certains poissons subissant un stress libèrent des ions chlorures (Cl^-) et sodium (Na^+) dans le milieu. Ceci est dû aux catécholamines libérées en cas de stress et qui augmentent la perméabilité des parois cellulaires branchiales à l'eau (Ruane *et al.,* 1999). Cela se traduit donc par une diminution des ions sodium et chlorure dissout dans le sang et une augmentation de l'eau dans les tissus chez les poissons d'eau douce (Haux *et al.*, 1985). Cette libération varie fortement en fonction des espèces, de la température et de la concentration en sels dissout dans le milieu (cf. figure 3.11). Elle n'est donc pas toujours observée (Auperin *et al.,* 1997 sur *Oreochromis niloticus* et Haux *et al.*, 1985 sur *Perca fluviatilis*).

3.3.4. Le taux d'hématocrite

Lors d'un stress, il y a une augmentation du taux d'hématocrite suivie d'une diminution progressive de celui-ci (cf. figure 3.12, Acerete *et al.,* 2004). En effet, par une contraction de la rate se déroulant pendant un stress aigu chez les poissons, un grand nombre de globules rouges sont libérés. Cette libération de globules rouges permet à l'individu, en cas de besoin, de bien oxygéner les tissus pour affronter le stress. Ruane *et al.* (1999) ont observé une augmentation du taux d'hématocrite chez les truites fario ayant subit un stress de confinement court. Mais parallèlement à cela, ils n'ont pas observé d'augmentation du nombre d'érythrocytes. Ils ont par contre remarqué une augmentation du volume corpusculaire moyen des globules rouges.

3.3.5. Les protéines de stress

Au niveau cellulaire, le stress induit la production de protéines dites de stress ou Heat Shock Proteins (HSP) qui ont été très bien conservées au cours de l'évolution. En effet, elles se retrouvent aussi bien dans les plantes que dans les bactéries et les animaux, ce qui suppose qu'elles possèdent un rôle essentiel dans le fonctionnement cellulaire. Il existe toute une série d'HSP nommées en fonction de leur masse moléculaire et groupées en différentes familles : les HSP 25-30, 47, 60, 70, 90, 110 (Wirth *et al.,* 2002). Les HSP 70 participent à la formation de chaînes de polypeptides et à la réparation de protéines dégradées ou dénaturées. Les HSP 90 servent de support aux enzymes, aux récepteurs hormonaux et à certains constituants du cytosquelette. Les HSP de faible poids moléculaire ont, entre autre, un rôle de chaperons

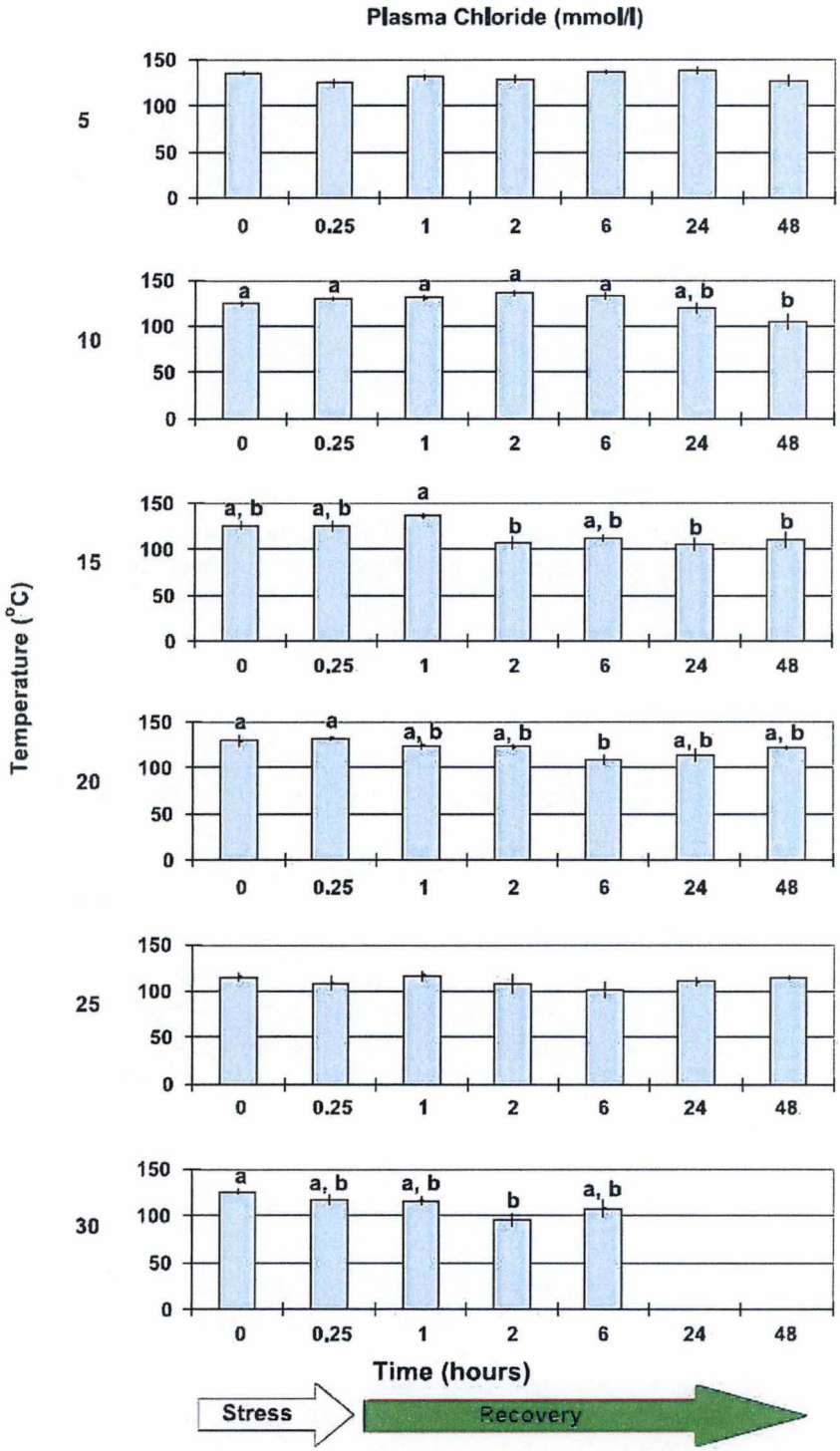


Figure 3.11 : Concentration en chlorure plasmatique d'hybrides de bars rayés (*Morone saxatilis***Morone chrysops*) acclimatés à différentes températures durant et après un stress de confinement dans peu d'eau (Davis, 2004).

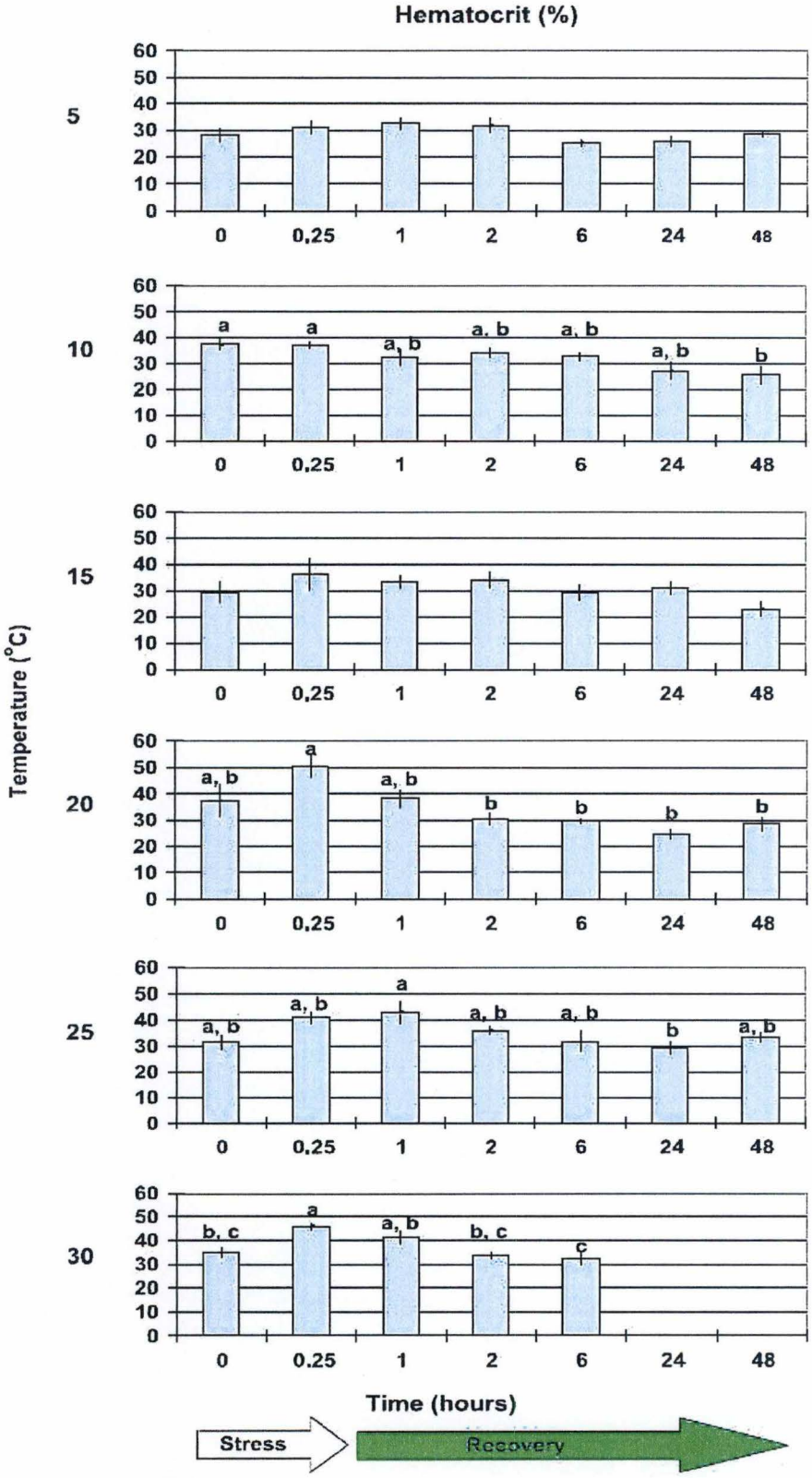


Figure 3.12 : Evolution du taux d'hématocrite durant et après un stress de confinement dans peu d'eau mesurée chez des hybrides de bars rayés (*Morone saxatilis***Morone chrysops*) acclimatés à différentes températures (Davis, 2004).

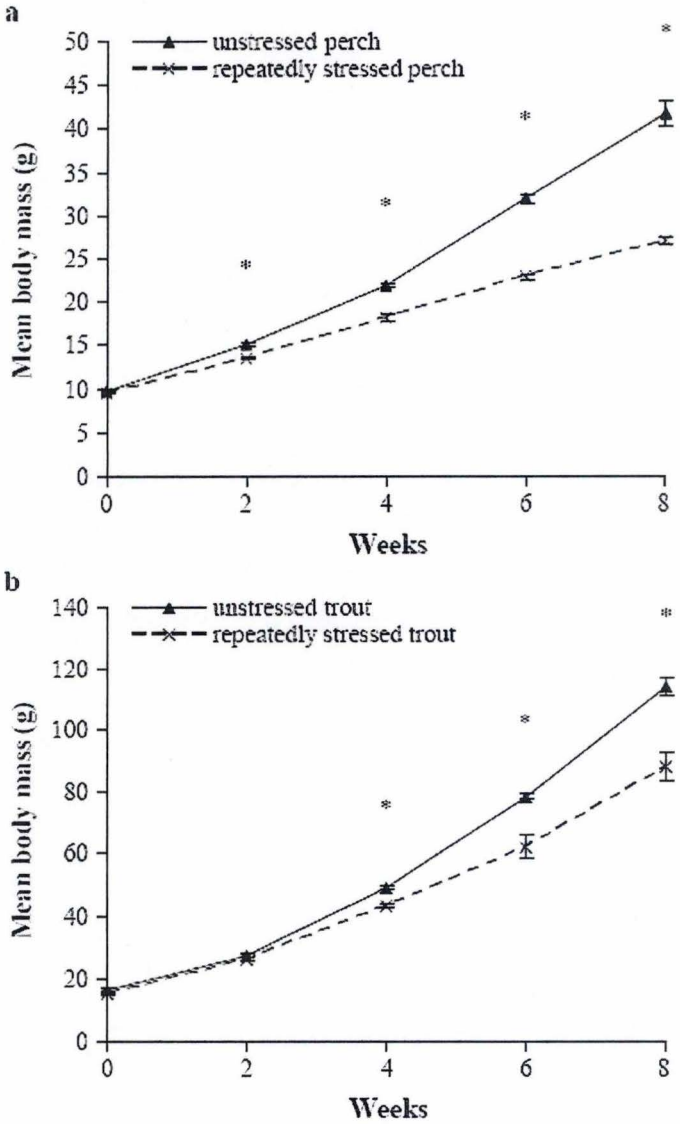


Figure 3.13: Masse moyenne ± un écart-type après un stress répété ou unique mesurée chez des perches (*Perca fluviatilis*) (a) et des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (b). Dosage effectué sur 3 poissons. * : différence significative (Jentoft *et al.,* 2005).

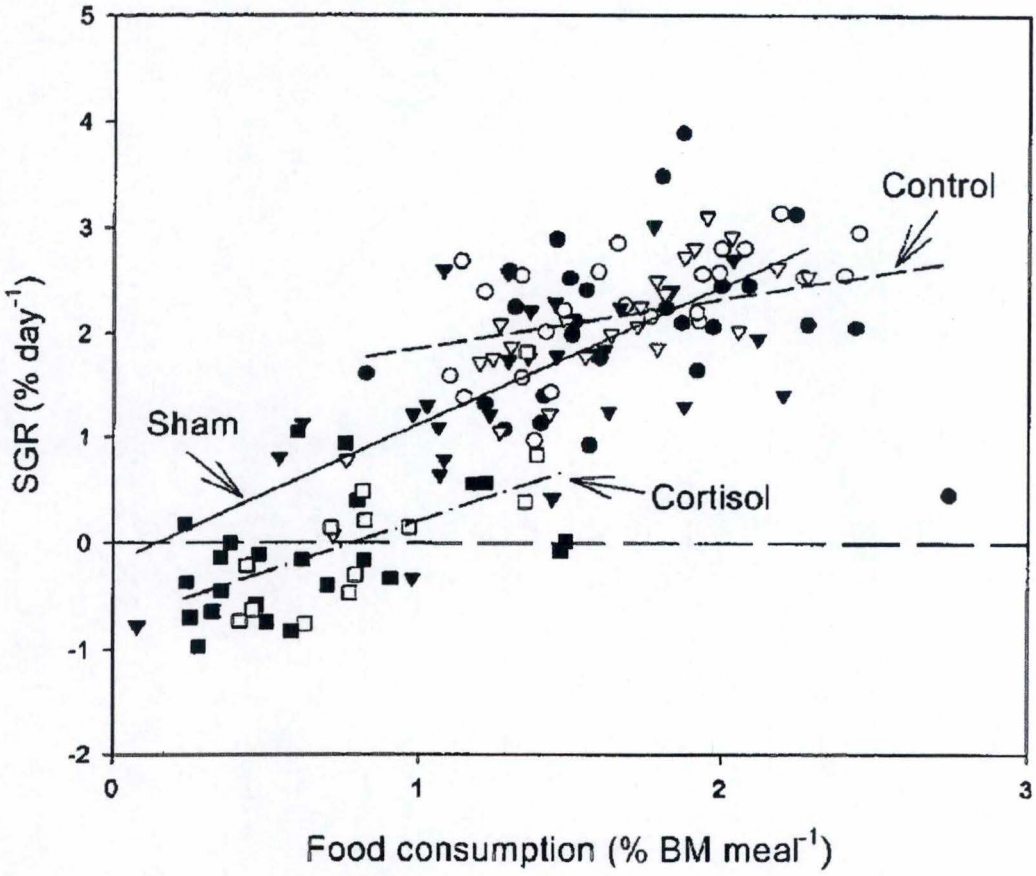


Figure 3.14 : Relation entre la consommation d'aliment (en % de masse du corps par repas) et le taux de croissance spécifique chez des truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) contrôles (rond), injectées avec le solvant de la solution de cortisol (triangles) et injectées avec du cortisol (carré). Les symboles clairs sont des valeurs provenant des bassins où les poissons n'étaient pas mélangés suivant leur traitement contrairement aux valeurs des symboles foncés. Les droites représentent les régressions linéaires (Gregory & Wood, 1999).

moléculaires servant à empêcher l'agrégation irréversible de protéines (Iwama *et al.,* 2004 ; Wirth *et al.,* 2002). Les toxiques tels les métaux lourds, l'éthanol ou les drogues ainsi que la température et beaucoup d'autres stresseurs induisent la synthèse d'HSP. Dini *et al.* (2006) ont démontré que sous l'action d'un stress de confinement de 4h, la quantité d'HSP 70 dans le foie, les branchies et les muscles striés cardiaques du tilapia (*Oreochromis mossambicus*) augmentait, alors qu'elle restait constante dans les muscles striés squelettiques et qu'elle diminuait dans le cerveau.

Les HSP peuvent être utilisées comme biomarqueurs chez des poissons exposés au stress en milieu naturel. D'après Iwama *et al.* (2004), l'usage des HSP comme indicateur de stress est un peu prématuré. En effet, la synthèse d'HSP en cas de stress est fonction des tissus et de la famille d'HSP étudiées, du stresseur, de l'espèce, du stade de développement et de la saison. De plus, dans beaucoup de publications citées, on n'observe pas de variations du niveau d'HSP lors de l'application d'un stress. Enfin, il est préférable de connaître les variations naturelles des HSP sur l'espèce étudiée ainsi que la tolérance de cette espèce avant de les utiliser comme indicateurs de stress.

3.4. Les effets délétères du stress

L'animal répond au stress afin de rétablir son homéostasie. Cependant, cette réponse n'est pas sans conséquences pour l'animal. Le stress induit des changements dans le comportement, notamment la performance de nage, la thermorégulation, la fuite face à un prédateur, etc. Le stress a aussi des effets sur le système immunitaire et reproducteur (Auperin *et al.,* 1997), sur le maintien de la balance ionique (Gamperl *et al.,* 1994) ainsi que sur la croissance comme le montre la figure 3.13 (Jentoft *et al.*, 2005 ; Van Weerd & Komen, 1998). Enfin, la qualité de la chair peut varier suivant l'état de stress du poisson.

La diminution de la croissance chez les poissons stressés serait due à l'effet du cortisol (Gregory & Wood, 1999 ; Van Weerd & Komen, 1998) qui mobilise le glucose au dépens de la croissance, réduirait la quantité de nourriture ingérée par les poissons (voir figure 3.14) et augmenterait l'activité des aminotransférases du foie responsables du catabolisme des protéines au dépend de la croissance. Lorsque qu'ils sont maintenus à haute densité, les poissons consomment leurs réserves de graisses, ce qui diminue leur indice hépato-somatique (IHS). Des poissons stressés ingèrent moins de nourriture, mais la conversion de leur nourriture en tissus est aussi moins efficace.

Le cortisol influence le système reproducteur. En effet, une augmentation de la quantité de cortisol sanguin a comme conséquence une diminution de la quantité d'androgènes et d'oestrogènes chez les poissons stressés. De plus, le cortisol est connu pour diminuer la quantité de protéines liantes servant à protéger les stéroïdes sexuels (Portz *et al.,* 2006). Enfin, l'application d'un stress aigu et chronique à des truites a eu pour effet de réduire la taille des œufs, la quantité de sperme et la survie de la progéniture (Campbell *et al.,* 1992 et 1994 cités dans Portz *et al.,* 2006).

L'influence du stress sur le système immunitaire sera développée ultérieurement.

Encadré 4.1 : Rappel sur les macrophages et leurs rôles :

Les macrophages ou monocytes sont des leucocytes jouant un rôle important dans le système immunitaire inné mais aussi acquis. Leurs fonctions primaires sont de phagocyter et de détruire les pathogènes, de présenter les antigènes aux lymphocytes et de réguler les mécanismes immunitaires par la sécrétion de nombreuses cytokines comme les interleukines-1 et les interférons. Ils libèrent aussi des enzymes lysosomals, des composés de la chaîne du complément et des prostaglandines (Narnaware *et al.,* 1994).

Encadré 4.2 : Rappel sur le lysozyme et son rôle :

Le lysozyme est une enzyme bactéricide présente dans le sang (produit par les neutrophiles sanguins), le mucus, les tissus riches en leucocytes et les ovules, qui hydrolyse le lien β1-4 de la paroi de muréine (peptidoglycan) des bactéries Gram positive surtout car elles sont plus exposées que les Gram négatives. Il apparaît qu'une des deux formes du lysozyme de poisson soit plus bactéricide que celui des vertébrés supérieurs. De plus son activité est affectée par le stress (Magnadóttir, 2006 ; Ellis, 1999 et 2001 ; Røed *et al.,* 2002).

Encadré 4.3 : Rappel sur le complément et son rôle :

La chaîne du complément est constituée de plus de 35 protéines solubles dans le plasma jouant un rôle, même à faible température, dans l'immunité innée et acquise. Le complément est très important dans la défense contre des bactéries gram négative, les champignons et les virus car il est activé en l'absence d'anticorps. De plus, il module l'activité de l'immunité humorale, de la phagocytose, de l'inflammation, de la solubilisation de composés du système immunitaire etc. Le complément peut-être initié par 3 voies différentes : la classique (initiée par un complexe antigène/anticorps), la lectine (initiée par l'interaction entre la lectine et des sucres de la surface des pathogènes) et l'alternative (initiée par la liaison covalente entre C3 et la surface de nombreux microbes). C'est cette dernière qui semble la plus importante chez les poissons. Chez les poissons, contrairement aux mammifères, certains composés du complément comme la C3, sont présents sous de multiples formes. De plus l'activité du complément chez les poissons peut être entre 8 et 10 fois plus élevée que chez les mammifères. Enfin, son activité est indépendante de la température. (Boshra *et al.,* 2006 ; Tort *et al.,* 1996).

Encadré 4.4 : Rappel sur les radicaux superoxydes et leurs rôles :

Les radicaux libres peuvent être issus de l'oxygène ou de l'azote. Leur structure électronique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et les structures cellulaires. Ils servent à détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires comme les macrophages ou les polynucléaires et ont un rôle dans l'apoptose, dans le fonctionnement de certaines enzymes, dans le cycle cellulaire etc., mais lorsque leur régulation est perturbée, ils peuvent amener un stress dit oxydant, c'est-à-dire une accumulation non contrôlée de radicaux oxydants. Leur synthèse est activée en cas de stress dû à une mauvaise manipulation, par l'exercice physique, le froid, en cas de déséquilibre alimentaire, ainsi que toute une série de facteurs tel la présence de toxiques, d'une inflammation ou de rayonnements (Favier, 2003 ; Aurousseau, 2002 ; Basheera *et al.,* 2002) (Cf. figure 4.2).

3.5. Sélection des individus répondant moins au stress

En aquaculture, comme dans tous les systèmes d'élevage, on cherche à maximiser les rendements. Pour cela, des sélections sont réalisées au fur et à mesure des générations pour garder et multiplier les individus ayant la croissance la plus élevée. Malgré ces sélections, les évènements stressants régulièrement subis par les poissons d'élevage constituent un réel problème pour l'optimisation de la croissance et la santé générale des individus. Il serait donc intéressant de pouvoir sélectionner parmi les lots les individus répondant le moins possible au stress afin d'éviter les effets délétères conséquents. Toutefois, il est probable que, par un processus de sélection « naturelle » en captivité, soit sans aucune intervention humaine, les poissons les plus résistants aux stress engendrés par l'aquaculture, survivent et se multiplient d'avantage au cours des générations, menant à des populations captives de plus en plus habituées aux conditions d'élevage. D'une manière générale, on remarque que les animaux s'adaptent à l'élevage par sélection de comportements favorables (accès rapide à l'alimentation, diminution du stress, comportement plus confiant vis-à-vis des interventions extérieures), et qu'il y a par contre une régression sur les caractères utiles dans le milieu naturel mais sans intérêt en élevage (fuite devant les prédateurs, comportement de reproduction). Mais ceci n'a pu être vérifié pour l'agressivité (Vandeputte & Prunet, 2002).

4. Le système immunitaire chez les poissons

L'immunité est très importante chez les poissons d'aquaculture car elle permet le maintien de l'homéostasie. De plus, c'est un important mécanisme physiologique de défense contre les infections. Il existe toute une série de cellules (macrophages, leucocytes, cellules cytotoxiques non-spécifique) et de produits (superoxydes, lysozyme, complément, lysines, agglutinines) qui interviennent dans la réponse immunitaire.

Parmi les éléments de l'immunité, les leucocytes sont sûrement les plus importants. Le terme de leucocytes ou de globules blancs regroupe toute une série de cellules circulatoires dont la majeure partie sont des lymphocytes. Les macrophages et les neutrophiles sont d'autres types de leucocytes et ils constituent la première ligne de défense de l'organisme, ce qui les rend importants en cas d'attaques du système immunitaire.

Il est maintenant acquis que le système immunitaire est divisé en système inné non-spécifique et en système acquis spécifique. Mais des études tendent à prouver que la réponse du système immunitaire inné, en précédant le système immunitaire acquis, détermine la réponse du système immunitaire acquis. Ces systèmes sont donc complémentaires pour garder l'homéostasie (Magnadóttir, 2006).

4.1. Immunité innée

Le système immunitaire inné existe depuis les premiers porifères et a évolué depuis des milliards d'années. C'est la seule défense pour les invertébrés et le mécanisme de défense principal chez les poissons. C'est un moyen de défense rapide et efficace contre les pathogènes et qui se base principalement sur les macrophages (voir encadré 4.1) et les cellules cytotoxiques. De plus, il joue un rôle instructif pour le système immunitaire acquis et pour l'homéostasie. Il est

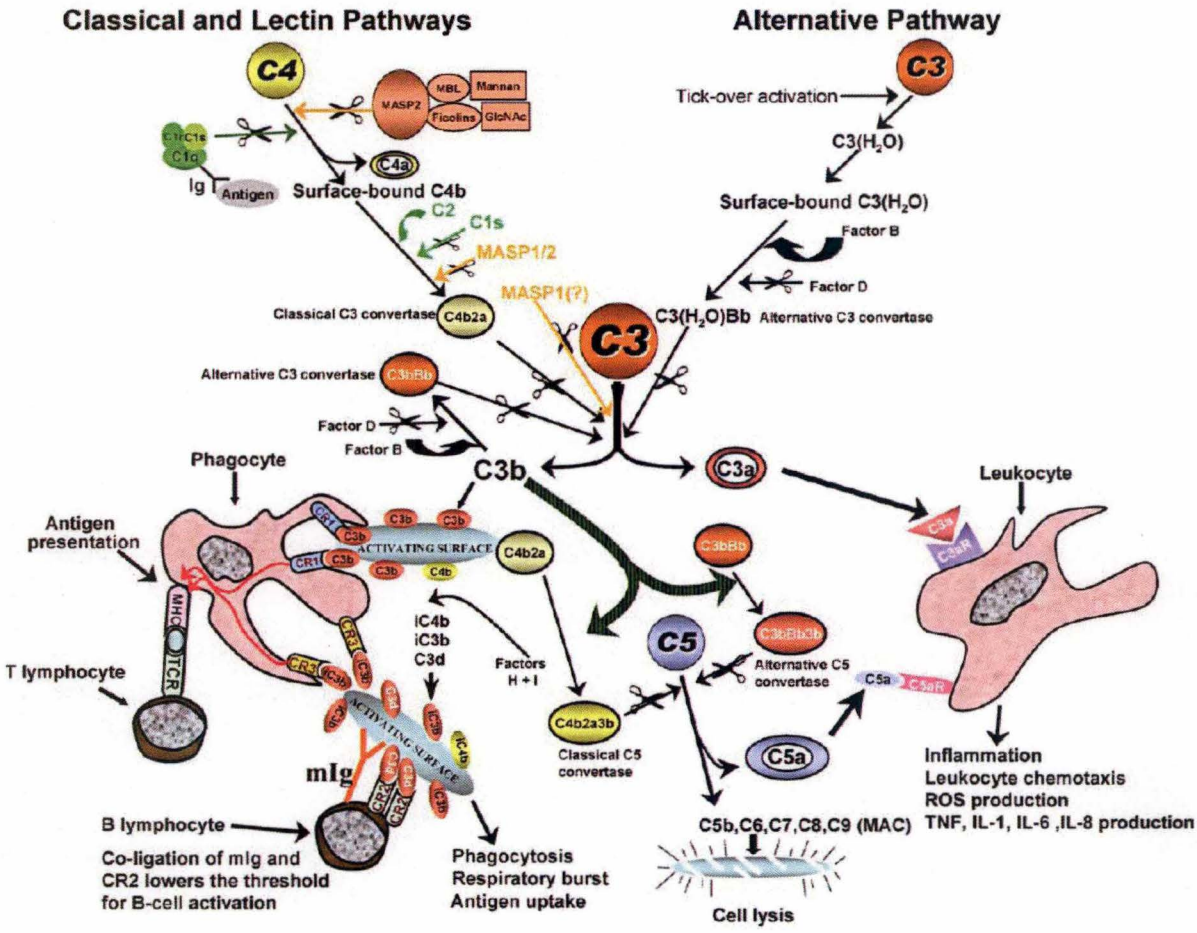


Figure 4.1 : La chaîne d'activation du complément et ses fonctions : L'activation du système du complément à travers les trois chaînes existantes (la classique, l'alternative et la lectine) amène à l'activation de C3 en C3b et C3a. C3b se lie par un lien covalent à la surface de bactéries, de champignons ou de virus par exemple pour l'activer dans le cadre du système du complément. C3b liée peut être dégradée en iC3b par le facteur I en présence du facteur H. C3b et iC3b se lient aux récepteurs du complément (CR1 et CR3) et favorisent la phagocytose, l'explosion respiratoire et le processus d'ingestion de l'antigène. C4 activée dans la chaîne classique ou lectine peut aussi se lier à une surface pour l'activer et favoriser son ingestion. Cependant, le nombre de molécules de C4 liées à une surface est toujours beaucoup plus faible que le nombre de molécules de C3 aussi liées à cette surface. Les antigènes liés de façon covalente à une molécule C3b ou C4b peuvent être traités et présentés aux lymphocytes T. Les antigènes liés à des Ig et à C3d amènent à la « coligation » avec des récepteurs des cellules B (BCR ou mIg) et des récepteurs du complément de type 2 (CR2/CD21) présents sur les cellules B, ce qui diminue le niveau d'activation des cellules B. De plus, C3b et C4b liés à un microorganisme peuvent amener à la formation de complexes d'attaque de membrane (MAC) ce qui conduit à une lyse des cellules. Les anaphylatoxines C5a et C3a générées pendant l'activation du complément jouent un rôle dans le processus inflammatoire (figure provenant de Sunyer *et al.,* 2003 et modifiée par Boshra *et al.,* 2006).

donc tout aussi important chez les vertébrés supérieurs. Le système inné comprend des barrières physiques comme le mucus et l'épiderme de la peau et des branchies, mais aussi cellulaires tels les macrophages, les cellules dendritiques, les granulocytes etc., et contient des composés humoraux tels des inhibiteurs de croissance de microorganismes, des enzymes lytiques comme le lysozyme (voir encadré 4.2) ou la chitinase, la chaîne du complément (voir encadré 4.3 et figure 4.1), des cytokines, des chémokines, des anticorps naturels qui n'ont subit aucun réarrangement, des agglutinines qui facilite l'action d'autres composés du système immunitaire, des précipitines, des peptides antibactériens et des inhibiteurs de protéases empêchant l'action des enzymes protéolytiques des pathogènes (Magnadóttir, 2006 ; Sahoo *et al.*, 2005 ; Ellis, 1999 et 2001, Kumari *et al.*, 2006 ; Vazzana *et al.*, 2002). Enfin, les produits de réductions du NBT obtenus par la réaction avec les superoxydes (radicaux libres) sont d'excellents indicateurs de l'état de santé ou de l'efficacité d'une immunisation chez les poissons (voir encadré 4.4) (Sahoo *et al.*, 2005).

Le système immunitaire inné reconnaît le non-soit grâce des séquences encodées dans les gènes qui permettent de reconnaître les agencements moléculaires qui sont caractéristiques des microbes tels les lipopolysaccharides (LPS) des surfaces des bactéries gram négatives, les peptidoglycans des surfaces bactériennes, le β1,3-glucan des champignons, les ADN bactériens, les ARN double brin viraux ainsi que d'autres molécules qui ne se trouve normalement pas à la surface des cellules des organismes multicellulaires. Cette transmission verticale entre les adultes et les alevins traduit l'évolution de l'adaptation et de la défense de l'espèce à son milieu. Le système immunitaire inné s'active aussi lorsqu'il y a des dommages aux propres tissus dus à une infection ou à la mort cellulaire naturelle. Les lipopolysaccharides peuvent activer la chaîne du complément ce qui induit une lyse de la membrane de la plupart des bactéries non-virulentes car la plupart des bactéries infectant les poissons sont protégées contre ce mécanisme (Magnadóttir, 2006 ; Ellis, 2001).

Chez les mammifères, on a déjà remarqué que l'activation du système immunitaire inné au travers de la stimulation des phagocytes (eux même recrutés par certains composés du complément), de la production de cytokines et de chémokines ainsi que l'activation du complément et de certains récepteurs cellulaires, stimulait les cellules B et T (Lo *et al.* cités dans Magnadóttir, 2006).

Le système immunitaire inné par l'intermédiaire du complément et des anticorps naturels, est aussi connu chez les mammifères pour participer au maintien de l'équilibre moléculaire et cellulaire en participant à l'apoptose, au renouvellement cellulaire et au maintien après une blessure ainsi qu'à la réaction inflammatoire (Magnadóttir, 2006).

4.2. Immunité acquise

Ce système immunitaire est beaucoup plus récent que l'inné. Il existe depuis les vertébrés gnathostomes c'est-à-dire depuis 450 millions d'années. Ce système permet la reconnaissance quasi illimitée d'épitopes d'antigènes grâce aux réarrangements dans les gènes de la super famille des immunoglobulines (Ig), des récepteurs des cellules B et T et des classes de MHC (Major Histocompatibility Complex).

En raison de la nature poïkilotherme des poissons et de leur place dans l'évolution, c'est essentiellement le système immunitaire inné qui est efficace chez ces animaux. Cela se traduit par un répertoire d'anticorps limité ainsi qu'une mémoire et une affinité de maturation faible. La prolifération des lymphocytes est elle aussi faible. La réponse spécifique, chez les poissons, est

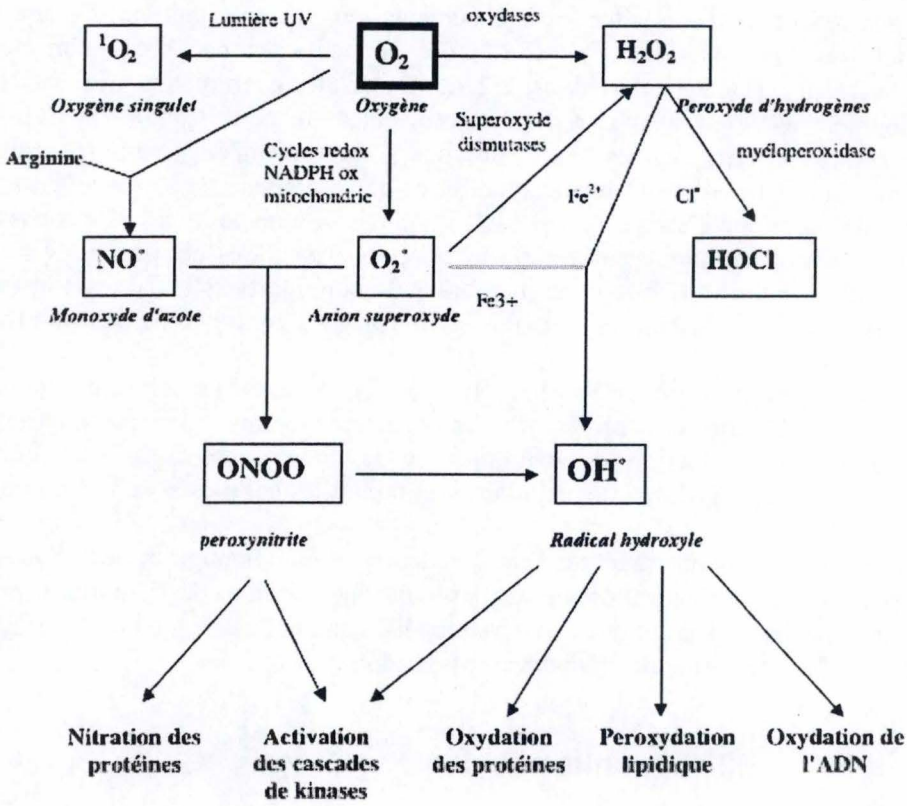


Figure 4.2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

importante seulement si ils ont déjà été immunisés contre le pathogène. Le système immunitaire acquis met parfois plus de 12 semaines (au moins 4 à 6 chez la truite dans des conditions idéales) à se mettre en place alors que le système immunitaire inné est instantané et indépendant de la température, ce qui est intéressant car la plupart des pathogènes peuvent tuer les poissons en quelques jours seulement (Magnadóttir, 2006 ; Ellis, 2001).

Chez les téléostéens, deux types d'Ig ont été découverts : les IgM qui sont similaires aux IgM des mammifères et les IgD découvertes récemment. Les IgM de poissons ne sont pas tout à fait identiques à celles de mammifères, même s'il en existe des formes circulantes et d'autres liées aux membranes. En effet, les IgM de poissons sont tétramériques alors qu'elles sont pentamériques chez les mammifères. De plus, les monomères constitués de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, formant les IgM, ne sont pas unis entre eux de façon covalente contrairement aux monomères des IgM de mammifères. En effet, ces liens sont brisés en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Même si ces molécules sont stables dans des conditions physiologiques, elles le sont beaucoup moins dans des conditions dénaturantes. Ceci conduit à former des tétramères incomplets (Watts *et al.*, 2001 ; Swain *et al.*, 2004 ; Cuesta *et al.*, 2004).

Whittington a découvert en 1993 que la population d'Ig chez la perche pouvait être divisée en 2 groupes de poids moléculaires distincts. Tout d'abord, le groupe le plus abondant des Ig de haut poids moléculaire (de 730 à 800 kDa) qui regroupe les IgM tétramériques. Enfin, le groupe, le moins abondant, des Ig de faible poids moléculaire (150, 185 et 200 kDa). Ce dernier groupe rassemble les monomères du groupe des Ig de hauts poids moléculaires. En effet, les Ig de faible poids moléculaire sont constituées, entre autre, de chaînes lourdes et légères de poids moléculaire identique à celle des Ig de haut poids moléculaire, ce qui suggère que ces Ig ne sont rien d'autre que des monomères des IgM. Mais Watts *et al.* (2001) ont découvert que la fraction d'Ig de faible poids moléculaire chez le thon rouge (*Thunnus maccoyii* Castelnau) n'avait pas d'affinité de liaison pour la protéine A contrairement à la fraction d'IgM. Hors cette interaction entre la protéine A et l'Ig est connue pour ne pas être spécifique, et avoir lieu entre la région Fc (fraction constante) de l'Ig et un hydrate de carbone de la protéine. Cette expérience suggère que même si leur poids moléculaire et leur affinité pour l'antigène sont identiques, les monomères trouvés seuls et les monomères d'IgM ont différence de structure entre eux et sont donc différents.

Contrairement aux mammifères où ce sont les IgG les plus abondantes, les IgM sont connues pour être les immunoglobulines les plus abondantes chez les téléostéens. Les 4 classes d'IgG des mammifères ont une concentration moyenne de 13 mg ml^{-1} alors que les IgM (concentration moyenne d'1,5 mg ml^{-1}) sont seulement les troisièmes Ig les plus abondante après les IgA (concentration moyenne de 3 mg ml^{-1}). La diversité des IgM des poissons est assurée grâce à leurs différentes formes et leur flexibilité structurelle. Suivant l'espèce et les conditions, le taux d'IgM dans le sérum de poissons est compris entre 0,25 et 23,5 mg d'IgM ml^{-1} (Cuesta *et al.*, 2004). Chez la truite arc-en-ciel des concentrations d'Ig sériques totales avoisinant les 3,3 mg ml^{-1} ont été observées (Swain *et al.*, 2004). La quantité d'IgM sanguin, tout comme les autres éléments intervenant dans l'immunité, est connue pour varier très fort entre les individus en fonction de leur taille, de leur âge, des conditions environnementales et de leur statut immunitaire (Cuesta *et al.*, 2004).

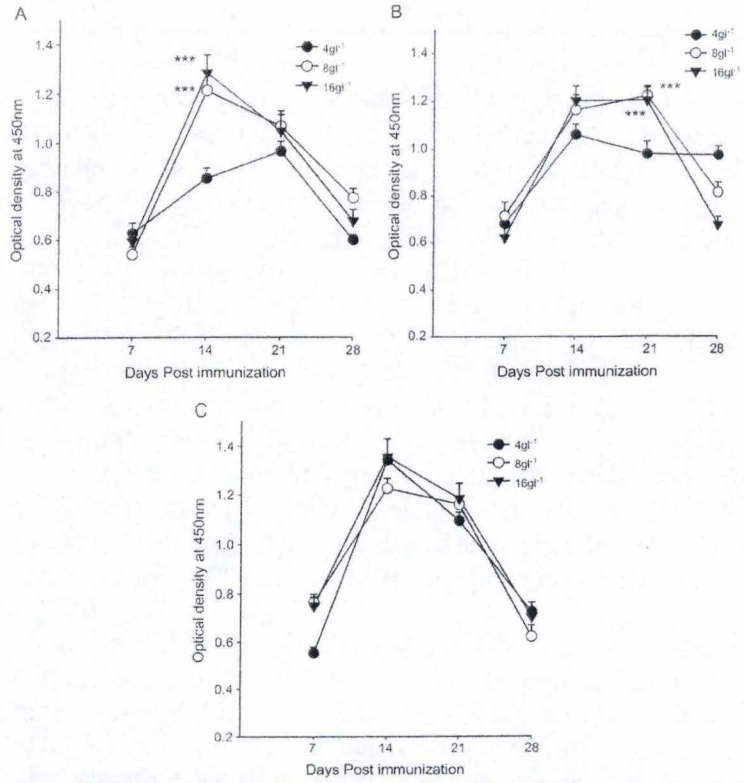


Figure 5.1 : Effet d'un confinement chronique et du sexe-ratio sur la production d'anticorps à une souche d'*Aeromonas hydrophila* tuée évaluée par ELISA chez des tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (valeur moyenne ± un écart-type). (A) Bassins 100% mâle. (B) Bassins 100% femelle. (C) Bassins avec autant de mâles que de femelles. *** : différence significative (P<0,01) (Binuramesh *et al.*, 2005).

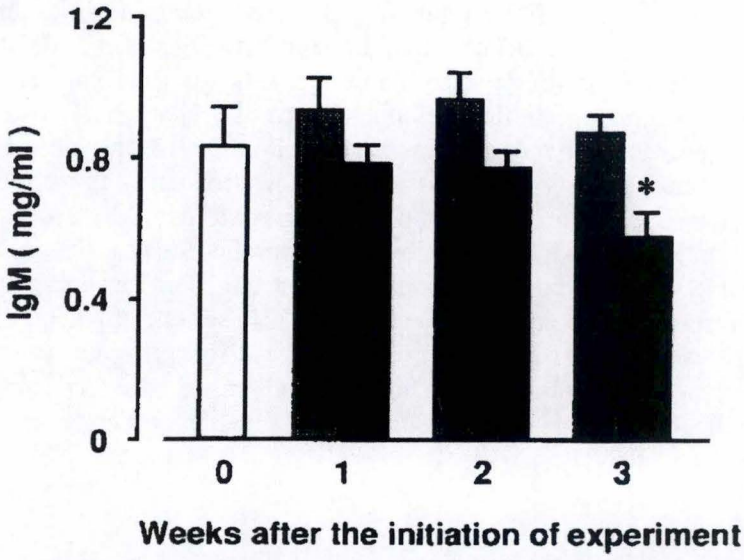


Figure 5.2 : Changement dans la concentration moyenne ± un écart-type d'IgM plasmatique de saumons masou (*Oncorhynchus masou*) nourris avec un supplément de cortisol (barre noir à droite) et contrôles (barre noir plus clair à gauche). ☐ Valeur initiale. Dosage effectué sur 7 poissons. * : Différence significative (Nagae *et al.*, 1994).

5. Influence du stress sur le système immunitaire

Le système immunitaire, et donc la résistance aux maladies, est influencé par beaucoup de facteurs tel les traits génétiques, la saison, la température (surtout chez les poïkilothermes pour le système immunitaire acquis), la pollution, la nourriture, les immunostimulateurs tel le β1-3-glucan, le peptidoglycan, le LPS etc., la vaccination et enfin la manipulation ou les stress de surpopulation (Magnadóttir, 2006). On sait également que le système immunitaire est modulé par toute une série d'hormones comme le cortisol, les hormones de croissances, la prolactine, les hormones de la reproduction, les catécholamines etc. Beaucoup de ces hormones sont libérées en cas de stress, ce qui conduit à une augmentation ou une diminution des capacités immunologiques des cellules immunitaires, mais induit aussi une redistribution de celles-ci dans tout le corps (Harris & Bird, 2000 ; Narnaware & Baker, 1996). En effet, le système immunitaire et endocrine communiquent et coopèrent largement pour former un réseau complexe de régulation qui assure l'homéostasie. Une régulation bidirectionnelle entre le système endocrine et le système immunitaire a été proposé chez les poissons (Weyts *et al.,* 1999).

La réponse du système immunitaire à un stress indique que le type, la durée et l'intensité du stresseur sont les déterminants majeurs de la réponse immunitaire. Dans la plupart des cas, lors d'un stress aigu, on observe une augmentation de la fonction immunitaire à travers le lysozyme, les phagocytes et les cellules cytotoxiques, alors que dans le cas d'un stress chronique ou aigu sévère, on remarque souvent des effets délétères avec un disfonctionnement du système immunitaire au point de vue humoral et cellulaire. L'augmentation du système immunitaire après un stress aigu sert à protéger le poisson contre une infection immédiate survenant pendant la période de stress (Portz *et al.,* 2006 ; Ortuño *et al.,* 2001 ; Vazzana *et al.,* 2002 ; Ruane *et al.,* 1999).

Cette classification des réponses du système immunitaire en fonction du type de stress n'est pas toujours claire du fait que certains stress ne peuvent être classés en aigu ou en chronique. C'est le cas, par exemple, du stress d'une variation intense et brève de densité qui semble posséder des caractéristiques des deux catégories de stress (Ortuño *et al.,* 2001).

5.1. Effet du stress sur le taux d'Ig sériques

Des réductions du taux d'IgM circulant dans le sang ont déjà été observées en cas de stress aigu mais jamais sous l'action d'un stress chronique de type confinement ou forte densité (Cuesta *et al.*, 2004). Nagae *et al.* (1994), par exemple, après avoir traité des truites (*Oncorhynchus masou*) pendant 2 semaines avec du cortisol, ont observé qu'une semaine après la fin du traitement, les truites nourries avec du cortisol avaient un taux d'IgM sanguin significativement plus faible que les truites non traitées (voir figure 5.2). Or, le pic de cortisol est observé une semaine avant la diminution du taux d'IgM. Cette période de latence, aussi observée chez les mammifères, est normale du fait que les Ig sont produites par les lymphocytes. Or, l'effet négatif du cortisol sur la différenciation des lymphocytes immatures peut prendre du temps avant que cela n'affecte les IgM.

De plus, chez les tilapias (*Oreochromis mossambicus* Peters), en fonction du sexe-ratio et de la densité, la production d'anticorps contre une souche d'*Aeromonas hydrophila* tuée est différente (Binuramesh *et al.,* 2005). En effet, pour les populations 100% mâles et 100% femelles, la production d'anticorps est, au bout de respectivement 14 et 21 jours,

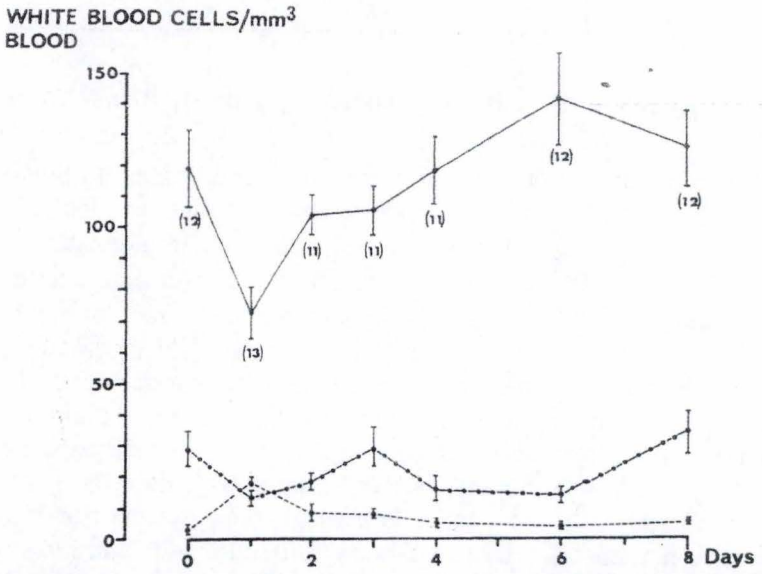


Figure 5.3 : Changement du nombre moyen ± un écart-type de lymphocytes (___), de « spindle cells » (•) et de neutrophiles (---) chez des perches (*Perca fluviatilis*) après une capture et durant une période de récupération de 8 jours. Nombre de poissons donné entre parenthèses (Haux *et al.*, 1985).

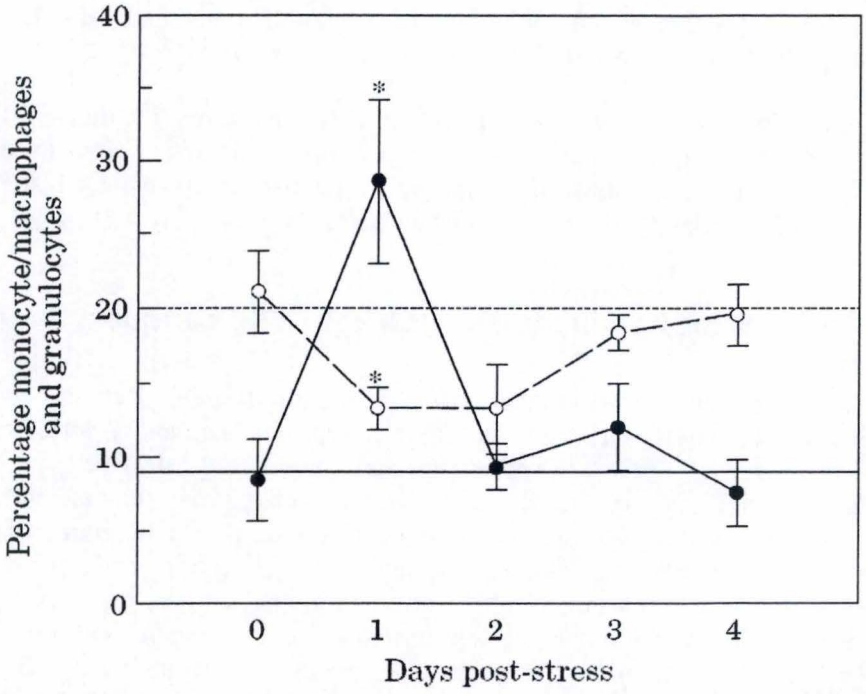


Figure 5.4 : Pourcentage moyen ± un écart-type de monocytes/macrophages et de granulocytes parmi le nombre total de leucocyte dans les reins (rond blanc) et dans le sang (rond noir) de poissons stressés dans une grande densité pendant 2h. Les valeurs moyennes globales de tous les groupes de contrôles sont représentées par les barres horizontales. * : Différence significative (P<0,05) entre les contrôles et les stressés (Ortuño *et al.*, 2001).

significativement plus élevée dans les grandes densités que dans les petites. Alors que la mise en place de la population d'anticorps suit un profil semblable quel que soit le sexe-ratio, dans le cas d'une population 50% mâles et 50% femelles, il n'y a pas de différences significatives dans la production d'anticorps entre les différentes densités au jour 14 et 21. Pour résumer, dans le cas du tilapia, la production d'anticorps est maximale dans les populations monosexe uniquement à fortes densités ou alors dans les populations normales quel que soit la densité (voir figure 5.1). Les auteurs pensent que cette augmentation dans la production d'anticorps peut être mise en parallèle avec l'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps.

Le type de stress influence la quantité d'IgM sanguin. En effet, des daurades (*Sparus aurata* L.) ont été soumises à différents stress (exposition à l'air pendant 2min, surpopulation pendant 1h et exposition à différents anesthésiants pendant 1h) et ont peut voir que l'exposition à l'air et la surpopulation ainsi que la tricaine à 0,19 mM, la benzocaine à 0,21 mM et le phénoxyéthanol à 0,48 mM n'ont aucun effet sur la quantité d'IgM sériques. Par contre, le 2-phénoxyéthanol à 1,6 mM et la quinaldine sulfate à 0,083 mM, tous deux des anesthésiants, ont un effet sur la production d'IgM. Le 2-phénoxyéthanol a diminué de deux fois la quantité d'IgM sériques alors que la quinaldine l'a augmenté de deux fois Cuesta *et al.*, 2004).

5.2. Effet du stress sur le nombre de globules blancs circulants

Les lymphocytes possèdent des récepteurs à corticostéroïdes. Les récepteurs à glucocorticoïdes des lymphocytes et des tissus lymphoïdes changent après un stress chronique ou aigu (Maule & Schreck, 1991 cité dans Tort *et al.*, 1996). Les corticostéroïdes produits lors d'un stress vont donc influencer le nombre ou la distribution des lymphocytes dans les tissus.

Des perches sauvages, après avoir été capturées et gardées pendant 8 jours en captivité afin de voir leur récupération, voient leur nombre de globules blancs diminuer un jour après leur capture. Cette diminution est principalement due aux lymphocytes dont la population diminue de plus de 40 % alors que dans le même temps, la population de neutrophiles augmente (voir figure 5.3). Les prélèvements du premier jour n'ont été fait qu'entre une et trois heures après la capture, ce qui signifie que la diminution du nombre de globules blancs est observée entre 3 et 24h après cette capture. La diminution du nombre de globules blancs observée est due, au moins en partie, à l'action des hormones de l'axe HPI (Haux *et al.*, 1985).

Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), Weyts *et al.* (1998) (cités dans Ruane *et al.*, 2002) ont démontré qu'un traitement *in vitro* au cortisol augmente le taux d'apoptose des lymphocytes B, mais réduit celui des neutrophiles.

Ortuño *et al.* (2001) ont démontré qu'un stress d'augmentation de densité, court mais intense, provoquait une migration des globules blancs du rein vers le sang (voir figure 5.4). Narnaware & Baker (1996) ont observé une diminution de l'activité phagocytaire des macrophages dans la rate et les reins de truites stressées. Cette expérience montre aussi que les macrophages quittent ces organes au profit du système circulatoire sanguin. Cette migration des leucocytes suggère qu'il y a un changement dans l'expression des molécules d'adhésion des cellules du sang et dans le stroma des organes lymphoïdes (rate, rein etc.) (Ruane *et al.*, 2002).

Chez la truite arc-en-ciel, un stress court peut provoquer une diminution du nombre de lymphocytes et de thrombocytes circulants et 3 h après, une augmentation du nombre de granulocytes (Narnaware *et al.*, 1996).

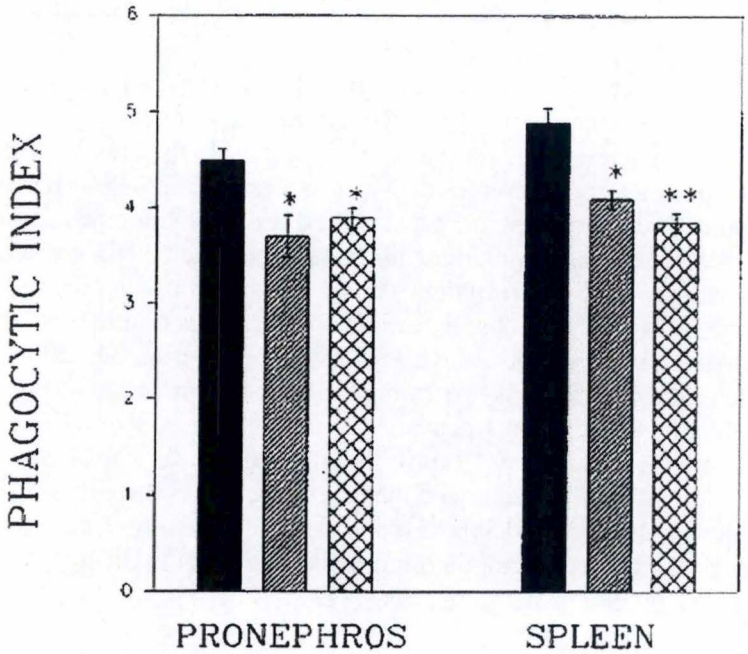


Figure 5.5 : Effet d'un traitement *in vitro* de 3h avec des agents α et β adrénergiques, respectivement la phényléphrine 10^{-5}M (barre doublement hachuré) et l'isoprénaline 10^{-5}M (barre simplement hachuré) sur l'activité phagocytaire de macrophages de rate (SPLEEN) et de reins (PRONEPHROS) de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) comparé à un contrôle (barre noir). * et ** : différence significative de respectivement (P<0,02 et P<0,002) (Narnaware *et al.*, 1994).

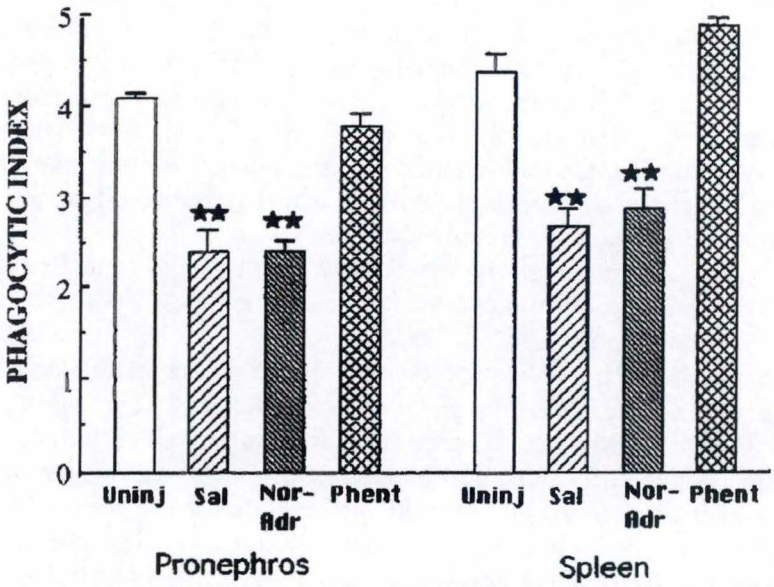


Figure 5.6 : Activité phagocytaire moyenne ± un écart-type de macrophages pris dans des reins et des rate de truites (*Oncorhynchus mykiss*) 3h après injection d'une solution saline (Sal), de noradrénaline (Nor-Adr) de 2,5mg/poisson ou de phentolamine (Phent) de 5mg/poisson. Nombre de poisson entre 4 et 5. ** : différence significative (P<0,01) comparé aux contrôles non injectés ou aux poissons injectés avec la phentolamine (Narnaware & Baker, 1996).

23 et 46 h après un stress de confinement court chez des truites fario et 23 h après ce même stress chez des truites arc-en-ciel, une diminution très significative (P<0,001) du nombre de globules blancs est observée. Cette diminution du nombre de globules blancs circulants est expliquée par la migration des globules blancs du sang vers les organes périphériques dans le but d'augmenter les capacités et la vigilance immunitaires dans le corps tout entier Ruane *et al.*, 1999).

Toutes ces expériences montrent bien que le stress en général a une influence sur le système immunitaire en modulant la quantité de globules blancs circulants et périphériques. Cette modulation est due, au moins en partie, à l'action du cortisol et ceci dans le but de mieux préparer l'individu à affronter un pathogène (Ruane *et al.*, 1999).

5.3. Effet du stress sur l'activité phagocytaire

L'activité phagocytaire est aussi influencée par le stress. En effet, cette activité mesurée dans le rein de daurades diminue après un stress d'augmentation de la densité. Cette diminution s'explique par la migration des cellules phagocytaires (les macrophages/monocytes et les granulocytes) du rein vers le sang après un stress aigu et par la diminution du nombre de bactéries phagocytées par ces cellules. En effet, des tests *in vitro* ont déjà démontré que des composés adrénergiques ont, entre autre, pour effet de diminuer les capacités phagocytaires des macrophages alors que le cortisol à 80 ng ml^{-1} ajouté sur des macrophages était complètement détruit au bout de 3 h sans avoir d'effet sur la phagocytose (voir figure 5.5) (Ortuño *et al.*, 2001 ; Narnaware *et al.*, 1994).

Chez la truite arc-en-ciel aussi l'activité phagocytaire des macrophages de la rate et des reins est influencée par le stress. En effet, elle diminue significativement (P<0.01) 3 h après injection d'une solution saline. Mais cette diminution est annulée par l'injection d'une concentration physiologique de cortisol qui empêche la migration des macrophages en inhibant la libération de catécholamines par le système nerveux sympathique (voir figure 5.6). De plus, le cortisol affecte directement l'expression des molécules d'adhésion des cellules immunitaires (Narnaware & Baker, 1996).

L'activité des cellules phagocytaires de reins de carpes est sensible à une augmentation de la densité d'élevage car elle diminue de façon significative au bout de 7 jours chez des carpes vivant ce type de stress (voir figure 5.7, Yin *et al.*, 1995). Yin *et al.* (1995) propose que cette diminution d'activité phagocytaire soit le résultat de l'action des corticostéroïdes libérés pendant le stress.

L'activité phagocytaire semble être régulée par des hormones tel le cortisol et les catécholamines. Les phagocytes possèdent en effet des récepteurs pour ces hormones qui peuvent modifier l'adhésion des macrophages. Les études ci-dessus, excepté l'hypothèse de Yin *et al.* (1995), mettent en évidence que le cortisol, à des concentrations physiologique, a pour effet d'empêcher la migration de ces phagocytes hors des organes lymphoïdes.

Les caractéristiques du bassin sont aussi très importantes. En effet, comme il a été décrit dans la partie sur le stress, la couleur du bassin peut avoir une influence sur le stress chez les poissons. Harris & Bird (1998) ont acclimaté des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à des bassins noirs et blancs. Ils n'ont pas remarqué de différences dans le taux de phagocytose des macrophages et des neutrophiles des reins des poissons provenant des différents bassins. Par contre, après injection *in vitro* d'α-MSH et de MCH (Melanin Concentring Hormone) à ces phagocytes, ils ont démontré que l'indice de phagocytose augmentait, mais l'effet ne s'observe,

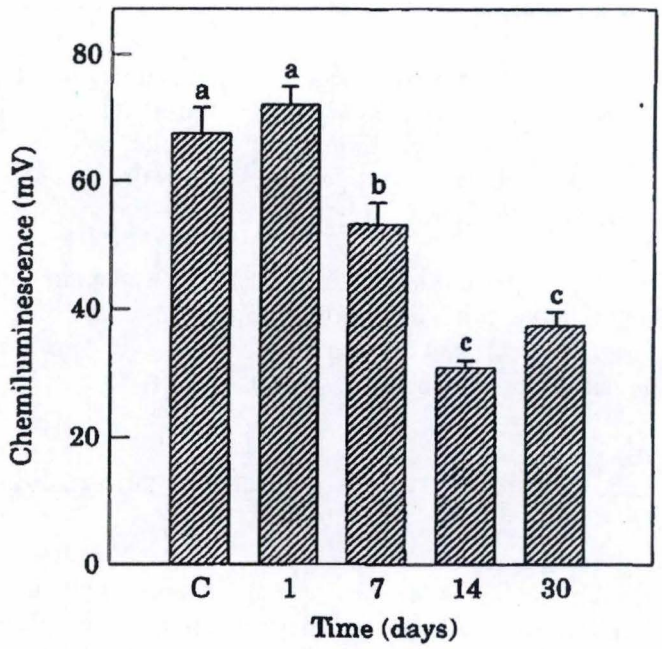


Figure 5.7 : Activité phagocytaire moyenne ± un écart-type des cellules de reins de carpes (*Cyprinus carpio* L.) pendant un stress de confinement de 1, 7, 14 et 30 jours. C : Contrôles non stressés. Nombre de poisson : 10. Les lettres indiques une différence significative (P<0,05) (Yin *et al.*, 1995).

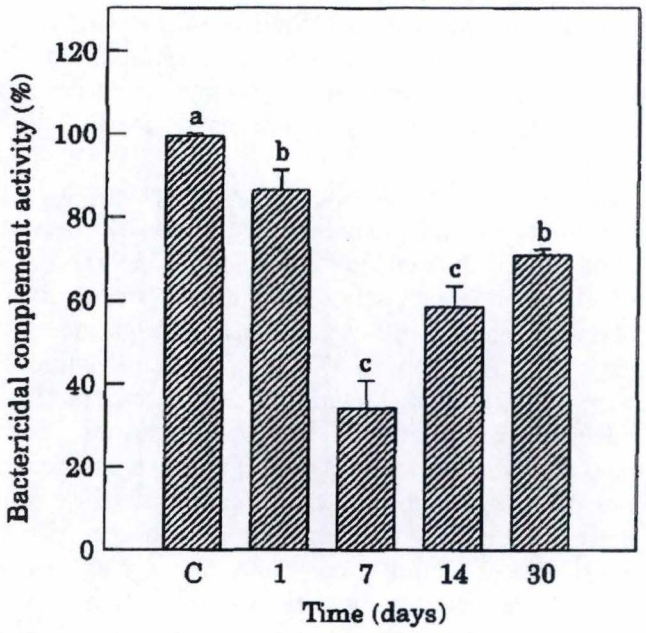


Figure 5.8 : Activité bactéricide moyenne ± un écart-type du système du complément de carpes (*Cyprinus carpio* L.) pendant un stress de confinement de 1, 7, 14 et 30 jours. C : Contrôles non stressés. Nombre de poisson : 10. Les lettres indiques une différence significative (P<0,05) (Yin *et al.*, 1995).

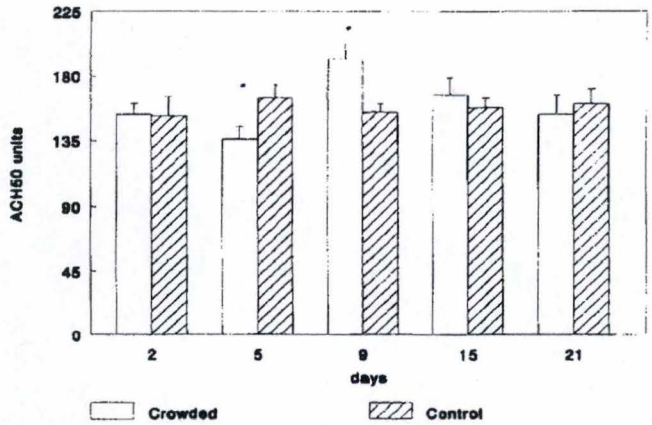


Figure 5.9 : Activité moyenne ± un écart-type du complément (exprimée en unité d'ACH 50 ml^{-1}) de daurades (*Sparus aurata*) soumises (hachuré) ou non (blanc) à un stress d'augmentation de densité. * : différence significative (P<0,05) (Tort *et al.*, 1996).

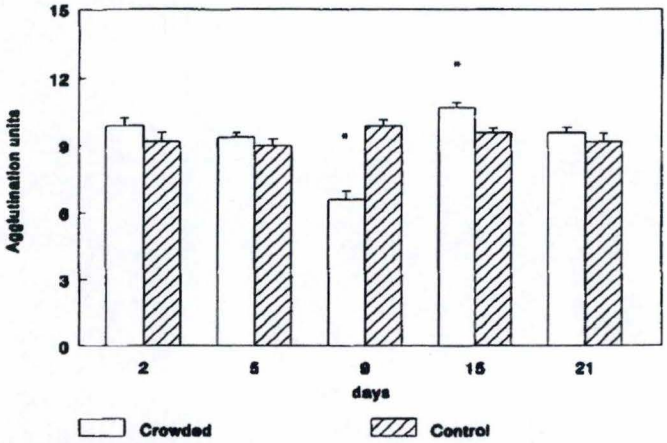


Figure 5.10 : Titre d'agglutination moyen ± un écart-type du sérum de daurades (*Sparus aurata*) soumises (hachuré) ou non (blanc) à un stress d'augmentation de densité. * : différence significative (P<0,05) (Tort *et al.*, 1996).

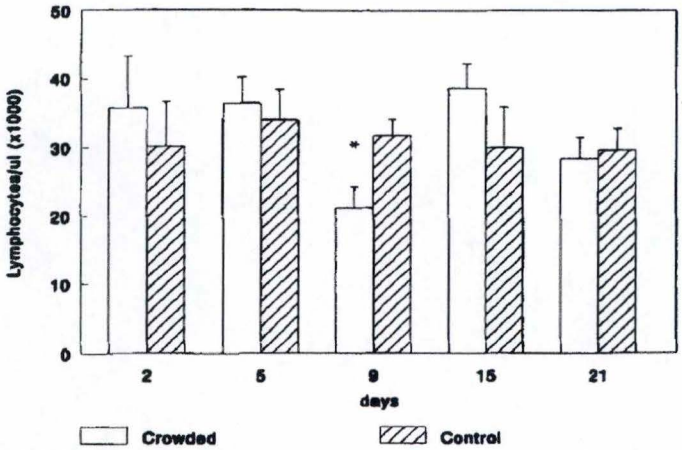


Figure 5.11 : Nombre moyen ± un écart-type de lymphocytes circulants ml^{-1} de daurades (*Sparus aurata*) soumises (hachuré) ou non (blanc) à un stress d'augmentation de densité. * : différence significative (P<0,05) (Tort *et al.*, 1996).

dans le cas du MCH et que pour une seule dose. Or, des poissons soumis à différents stress dans des bassins de couleurs différentes, vont libérer des hormones différentes en fonction de la couleur du bassin : de l'α-MSH dans le cas de bassins noirs et du MCH dans le cas de bassin blanc (Green & Baker, 1991 cités dans Harris & Bird, 1998). La couleur du bassin est donc importante quand on veut voir l'effet d'un stress sur le système immunitaire.

5.4. Effet du stress sur l'activité cytotoxique des leucocytes

Chez le tilapia, la β-endorphine, qui est un intermédiaire de l'axe HPI, inhibe l'activité des leucocytes des reins (Faisal *et al.*, 1989 cités dans Ruane *et al.*, 1999).

Vazzana *et al.* (2002) ont soumis des bars (*Dicentrarchus labrax*) à différentes densités dans un même bassin de 400 m^3. Trois densités différentes ont été choisies : 10, 30 et 60Kg m^{-3}. Les poissons maintenus à 30 kg m^{-3} circulent librement dans le bassin, alors que les poissons maintenus aux autres densités sont confinés dans des cages se trouvant à l'intérieur de ce même bassin. Les poissons maintenus à faible (10 kg m^{-3}) et forte (60 kg m^{-3}) densité, et qui sont en plus confinés dans des cages, ont plus de glucose et de cortisol dans le sang que ceux circulant librement dans le grand bassin et gardés à une densité normale de 30 kg m^{-3}. Le taux supérieur de cortisol et de glucose sanguin indique un stress chez les poissons. Ce stress a une influence sur l'activité cytotoxique des leucocytes piroténeaux en diminuant leur activité, mais aucune différence n'a été observée dans le cas de l'activité d'explosion respiratoire.

5.5. Effet du stress sur l'activité du complément

Plusieurs études ont déjà démontré que l'activité du complément est influencée par le stress. L'influence du stress sur l'activité du complément varie très fort en fonction de la nature du stress, de l'individu et du temps s'écoulant entre le stress et la mesure de l'activité du complément (Ortuño *et al.*, 2002). Voici donc le résultat de quelques études de différents stress sur l'activité du complément.

Au bout de 7 jours de haute de densité, des carpes voient l'activité de leur système du complément très fortement diminuer. La densité élevée empêche un retour à des valeurs observées avant le début de l'expérience jusqu'à 30 jours après le début de celle-ci (voir figure 5.8, Yin *et al.*, 1995). Tort *et al.* (1996) ont par contre démontré que le stress engendré par une augmentation de densité d'élevage de daurades diminuait l'activité du complément au bout de 5 jours, mais qu'il y avait une surcompensation de cette activité au bout de 9 jours, avant de retourner à une activité basale (voir figure 5.9). Cette surcompensation a amené les auteurs à proposer une régulation bidirectionnelle entre le système endocrine et le système immunitaire. De plus, la diminution de l'activité du complément se produit au bout de 5 jours d'expérience, alors qu'il faut 9 jours pour voir apparaître une diminution dans l'activité d'agglutination ou du nombre de lymphocytes (voir figure 5.10 et 5.11). L'activité du complément est exprimée sous forme d'unité d'ACH_{50}, c'est-à-dire le titre où 50 % de l'hémolyse d'érythrocytes de lapin due à l'activité de la chaîne alternative du complément a eu lieu.

Toujours chez des daurades, Ortuño *et al.* (2001) ont démontré que l'activité du complément diminue significativement deux jours après un stress d'augmentation de la densité de

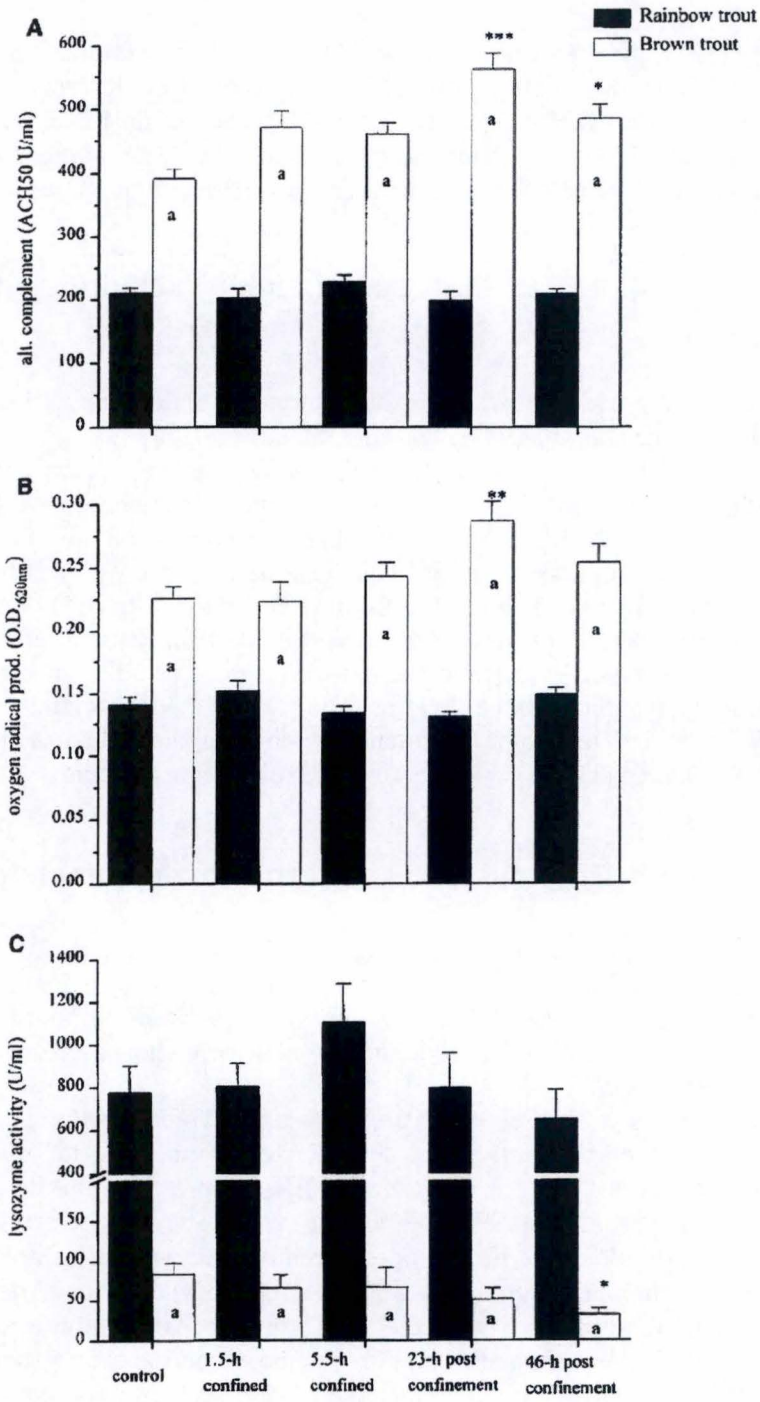


Figure 5.12 : Effet du confinement dans un filet sur les fonction du système immunitaire inné de truites fario (blanc) et arc-en-ciel (noir) : (A) activité du complément, (B) production de radicaux superoxydes et (C) activité du lysozyme. Valeur moyenne ± un écart-type calculé sur 10 poissons. *, ** et *** : différences significatives de respectivement (P<0,05, P<0,01 et P<0,001) comparé au contrôles (Ruane *et al.*, 1999). (Ruane *et al.*, 1999)

2 heures. Par contre, le troisième et quatrième jour après l'application du stress, l'activité du complément est supérieure à celle des contrôles. Ce phénomène de surcompensation avant le rétablissement de l'équilibre, comme dans l'expérience de Tort et al. (1996), est fréquemment observé dans les processus biologiques.

Rotllant *et al.* (1997) ont démontré que stresser des pagres (*Pagrus pagrus*) en augmentant leur densité d'élevage, provoquent, déjà 2 jours après la mise en charge, une diminution significative de l'activité hémolytique de la chaîne alternative du complément (ACH_{50}). Contrairement à l'expérience de Tort *et al.* (1996) et d'Ortuño *et al.* (2001), aucune surcompensation n'a été observée au bout de quelques jours.

Ortuño *et al.* (2002) ont appliqué différents stress à des daurades. Ils ont exprimé l'activité du complément sous forme d'unité d'ACH_{50}. Ils ont remarqué que les stress de surpopulation et d'exposition à un anesthésiant étaient responsables de la diminution de l'activité du complément. L'exposition à l'air et la perturbation physique ne provoquent aucune perturbation chez les poissons. Cette expérience démontre bien que tous les stress n'ont pas d'effets délétères.

Les expériences citées ci-dessus montrent que l'activité du complément peut diminuer en cas de stress, mais on ne connaît pas les composants de la chaîne du complément qui sont les plus touchés par le stress. De plus, l'interaction entre le système neuroendocrine et le système immunitaire amenant à la diminution de l'activité du complément n'est pas encore bien élucidée (Boshra *et al.*, 2006).

Ruane *et al.* (1999) ont démontré que l'influence d'un stress de confinement court sur l'activité de la chaîne alternative du complément était fonction de l'espèce étudiée. En effet, comme le montre la figure 5.12, 23 h après l'application de ce stress, l'activité du complément augmente de manière significative ($P<0,001$) chez les truites fario alors qu'elle reste constante chez les truites arc-en-ciel.

5.6. Effet du stress sur la production des radicaux superoxydes

Les radicaux libres sont produits dans les macrophages et dans les neutrophiles. La quantité de radicaux libres est donc directement liée au nombre de macrophages et de neutrophiles. Ruane *et al.* (2002) n'ont observé aucune augmentation ou diminution du nombre de radicaux libres dans le sang de carpes soumises à un stress de densité pendant 87 heures. Mais si un stress de confinement dans un filet pendant une heure est additionné au stress de densité, alors la production de radicaux libres augmente de façon significative.

L'activité d'explosion respiratoire doit être modulée par d'autres hormones que le cortisol. En effet, l'injection *in vivo* ou *in vitro* de cortisol n'a aucune action sur l'activité d'explosion respiratoire des neutrophiles (Weyts *et al.*, 1998 cités dans Binuramesh *et al.* 2005).

Ortuño *et al.* (2002) ont observé que parmi les 4 stress appliqués aux daurades (voir § 5.5.), il n'y a que les stress d'hypoxie et d'exposition à l'air qui ont provoqué une diminution de l'activité de l'explosion respiratoire. Celle-ci étant directement liée à la présence d'oxygène, il est normal que le nombre de radicaux diminue dans le cas de l'hypoxie. L'exposition à l'air ne provoque aucune libération de cortisol ou de glucose, ce qui encore une fois suppose l'intervention d'autres médiateurs amenant à la diminution de l'activité des radicaux superoxydes. De plus, la perturbation physique provoque une augmentation du cortisol et du glucose sanguin mais ne perturbe pas l'activité de l'explosion respiratoire.

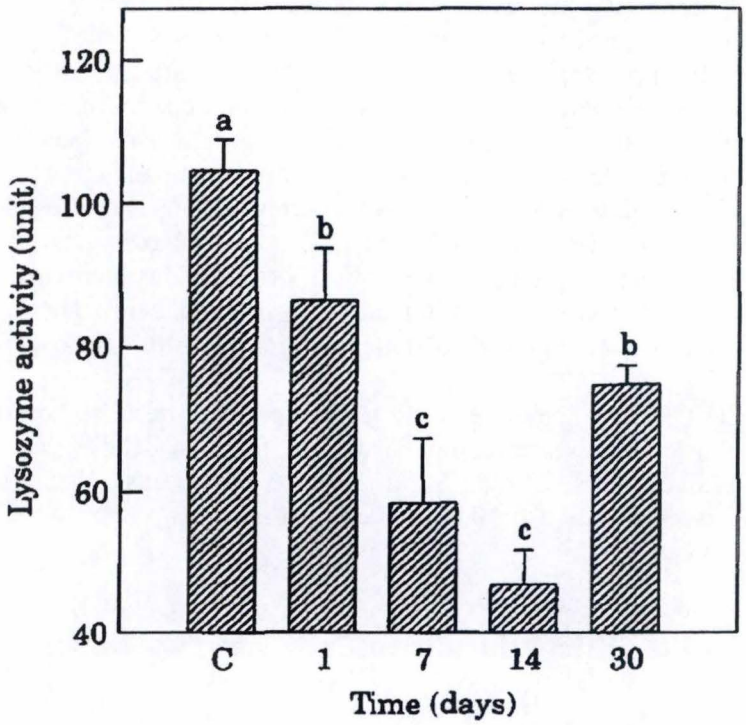


Figure 5.13 : Activité moyenne ± un écart-type du lysozyme sérique de carpes (*Cyprinus carpio* L.) pendant un stress de confinement de 1, 7, 14 et 30 jours. C : Contrôles non stressés. Nombre de poisson : 10. Les lettres indiques une différence significative (P<0,05) (Yin *et al.*, 1995).

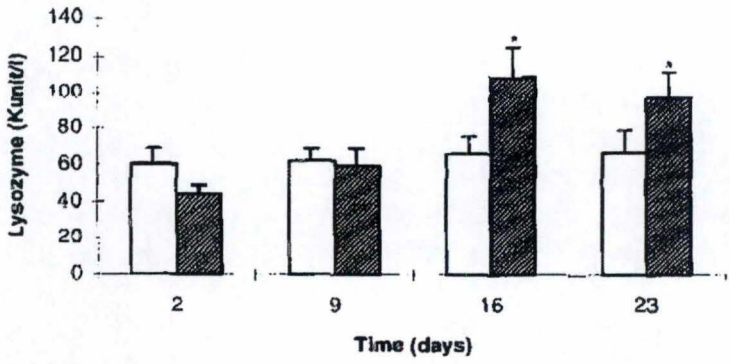


Figure 5.14 : Valeurs moyennes de l'activité du lysozyme sérique ± un écart-type mesurées chez des pagres (*Pagrus pagrus*) contrôles (barres blanches) et en surpopulation (barres hachurées) en fonction du temps. * : différence significative (P<0,05) (Rotllant *et al.,* 1997).

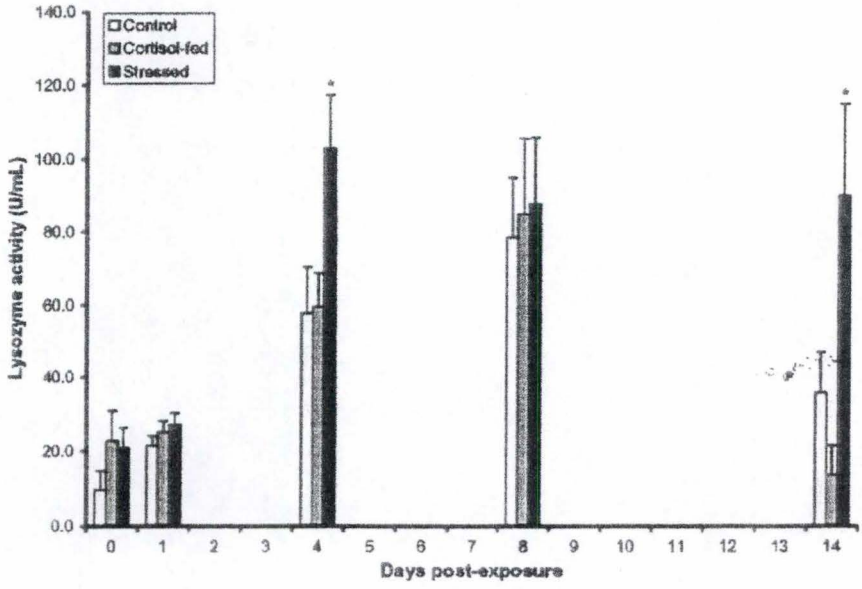


Figure 5.15 : Activité du lysozyme plasmatique de poissons-chats américains (*Ictalurus punctatus*) exposés à une souche virulente d'*Edwardsiella ictaluri* après avoir été nourris avec du cortisol (gris), stressés pendant 30min dans un faible niveau d'eau le jour de l'exposition à la bactérie (noir) ou ne pas avoir été manipulés (blanc) (Small & Bilodeau, 2005).

Ruane *et al.* (1999), après avoir observé que la production de radicaux superoxydes chez des truites fario augmentait 23 h après avoir subit un stress de confinement, alors qu'elle ne varie pas chez des truites arc-en-ciel stressées de la même façon (voir figure 5.12), proposent que la production de radicaux superoxydes soit régulée par l'ACTH car celle-ci provoque une augmentation de la production de ces radicaux dans des leucocytes de reins de truites arc-en-ciel.

5.7. Effet du stress sur l'activité du lysozyme

En fonction de certaines conditions, comme la durée du stress, la quantité de lysozyme sanguin va, soit augmenter, soit diminuer. Binuramesh *et al.* (2005) ont démontré que chez des tilapias soumis à différents sexe-ratios, l'activité de leur lysozyme sanguin ne suit pas la même évolution dans le temps en fonction du sexe-ratio. Cette activité varie en fonction des relations sociales différentes établies entre des groupes de sexe-ratio différents.

La réponse du lysozyme au stress sera fonction de l'espèce, mais aussi de l'acclimatation de celle-ci à l'aquaculture. En effet, Ruane *et al.* (1999) ont démontré que 46 h après un stress de confinement court, l'activité du lysozyme sanguin diminue de manière significative ($P<0,05$) chez des truites fario alors qu'elle ne varie pas de façon significative chez des truites arc-en-ciel (voir figure 5.12). Cette diminution de l'activité du lysozyme sanguin s'observe aussi suite à un stress chronique chez des carpes (voir figure 5.13, Yin *et al.*, 1995) mais aussi chez des pagres 16 jours après une augmentation de leur densité d'élevage. Cette augmentation d'activité du lysozyme chez les pagres est observée au même moment que la diminution d'activité d'autres facteurs immunitaires comme le complément et l'agglutination (voir figure 5.14, Rotllant *et al.*, 1997).

Demers & Bayne (1997) ont prélevé le sang de truites arc-en-ciel et les ont ensuite laissées pendant 10 minutes, soit dans un petit bassin (les « tests »), soit dans l'anesthésiant (les « contrôles »), avant de les prélever à nouveau. Ils ont remarqué que les « tests » avaient une activité du lysozyme sanguin supérieure à celle des poissons contrôles. Ce stress est considéré comme un stress aigu, ce qui amène souvent à une augmentation des capacités immunitaires. Or, les truites, sont des poissons d'eaux froides, ce qui ralentit les mécanismes physiologiques. L'augmentation de l'activité du lysozyme sanguin est donc sûrement due à des ARN_m préexistants rapidement traduits.

Small & Bilodeau (2005) ont stressé des poissons-chats américains (*Ictalurus punctatus*) en les laissant pendant 30min dans un niveau d'eau faible. Ils ont ensuite exposé ces poissons à une bactérie, *Edwardsiella ictaluri,* provoquant une forte mortalité dans les élevages de poissons-chats. Ils ont aussi voulu voir l'effet d'un traitement au cortisol sur la résistance à cette même bactérie. Pour ce faire, ils ont nourri des poissons avec des aliments enrichis en cortisol et les ont ensuite exposés à la bactérie. Ils ont démontré qu'au bout de 4 et 14 jours après le stress et l'injection de la souche bactérienne, l'activité du lysozyme sanguin était significativement plus grande ($P<0,05$) chez les poissons stressés que chez les contrôles et les poissons nourris avec du cortisol (voir figure 5.15).

5.8. Effet du stress sur la résistance aux pathogènes

Effectuer un challenge test (contaminer des poissons avec une bactérie) permet de prendre en compte toute une série de facteurs que l'on n'a pas dosé ou de voir l'intégration de tous ces

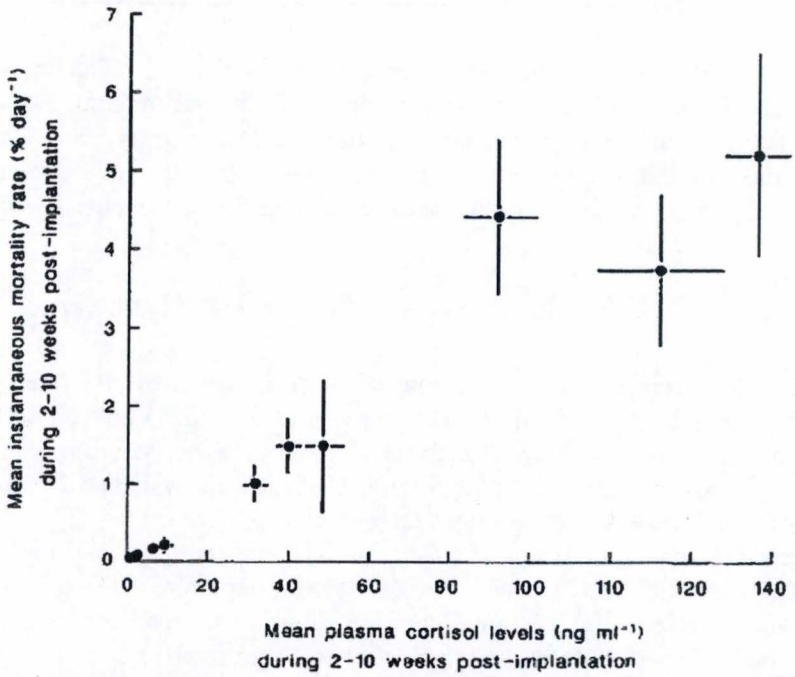


Figure 5.16 : Corrélation entre la dose moyenne de cortisol plasmatique de truites fario (*Salmo trutta* L.) avec un implant de cortisol et la mortalité instantanée moyenne (Pickering & Pottinger, 1989).

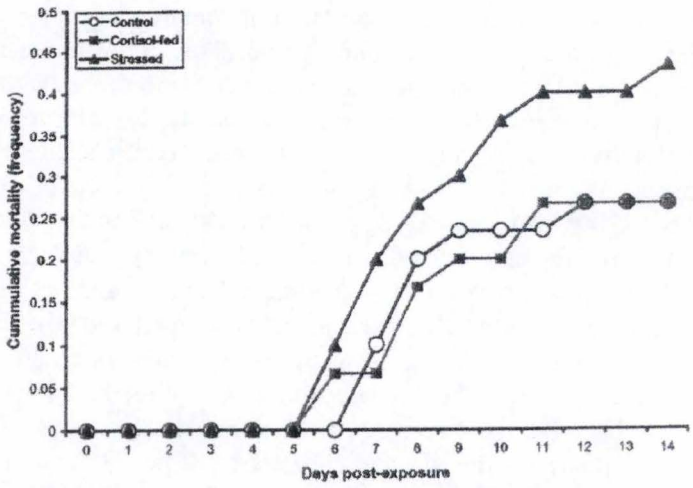


Figure 5.17 : Mortalité cumulative de poissons-chats américains (*Ictalurus punctatus*) exposés à une souche virulente d'*Edwardsiella ictaluri* après avoir été nourris avec du cortisol (carré noir), stressés pendant 30min dans un faible niveau d'eau le jour de l'exposition à la bactérie (triangle noir) ou ne pas avoir été manipulés (rond blanc) (Small & Bilodeau, 2005).

facteurs entre eux. En effet, il arrive que le fait de stresser des poissons fasse augmenter la capacité immunologique de certains paramètres. Mais, une fois ces poissons confrontés à une souche bactérienne virulente, on observe qu'ils sont plus sensibles que les mêmes poissons non stressés (Binuramesh *et al.*, 2005).

Chez des truites fario auxquelles un implant de cortisol a été ajouté, il existe une corrélation entre la dose de cortisol mesurée sur des poissons en bonne santé entre 2 et 10 semaines après l'implantation, et la mortalité dans les bassins pendant cette même période (voir figure 5.16, Pickering & Pottinger, 1989).

Small & Bilodeau (2005) ont démontré que des poissons-chats américains laissés pendant 30min dans un faible niveau d'eau et ensuite exposés à une bactérie mortelle, *Edwardsiella ictaluri,* ont une mortalité plus élevée que des poissons non stressés ou nourris avec une nourriture enrichie en cortisol. Ils ont aussi démontré que quel que soit le traitement, la mortalité a commencé au bout de 6 jours après l'injection de la bactérie. Les poissons traités avec du cortisol et les contrôles non stressés ont une mortalité cumulée au bout de 14 jours significativement plus faible ($P<0,05$) que les poissons stressés (voir figure 5.17). Cette expérience démontre bien que le cortisol seul n'est pas forcément délétère.

Chez le tilapia, des bassins monosexe induisent aux poissons un stress plus grand que des bassins composés de 50% de mâles et de 50% de femelles. De plus, le fait d'avoir des populations monosexe dans les bassins peut même retarder le retour à des niveaux basaux en cortisol lors d'un stress chronique à cause du maintien de la domination sociale. Enfin, les poissons venant de bassins monosexe mâle sont moins résistants aux attaques bactériennes que ceux provenant de bassins contenant autant de mâles que de femelles (Binuramesh *et al.*, 2005). Or, l'aquaculture de la perche tend à devenir monosexe du fait que les femelles croissent plus vite que les mâles. Il faut donc tenir compte du sexe-ratio dans les réponses observées.

5.9. Effet du stress sur les protéines sériques

Chez les mammifères, il est prouvé que des hormones de stress comme le cortisol ou les catécholamines modulent l'expression de plusieurs cytokines comme le TNF-α. Or, ces cytokines augmentent la synthèse de facteurs du complément, particulièrement le TNF-α qui est un activateur du complément. Comme les hormones de stress sont homologues entre les poissons et les mammifères et que des cytokines comme le TNF-α sont aussi présentes chez les poissons, on peut supposer que le stress aura une influence sur l'expression de ces protéines (Ortuño *et al.*, 2002).

Yin *et al.* (1995) ont démontré que l'application d'un stress de densité à des carpes (*Cyprinus carpio* L.) diminuait, au bout d'un jour, significativement ($P<0.05$) la quantité de protéines se trouvant dans le sérum. Sept jours après le début de l'expérience, la quantité de protéines était encore plus basse que le jour suivant le début du stress. Le sérum de poisson contient de nombreuses protéines intervenant dans le système immunitaire. C'est le cas du lysozyme ou des facteurs du complément par exemple. Moyner (1993) (cité dans Yin *et al.*, 1995) a prouvé que le pattern de protéines du sérum de saumons atlantiques (*Salmo salar*) exposés à *Aeromonas salmonicida* changeait. Il est donc intéressant de connaître les mécanismes conduisant à des changements d'activité et de quantité des protéines dans le sérum afin de mieux comprendre les mécanismes rendant les infections plus probables lors de stress (voir figure 5.18).

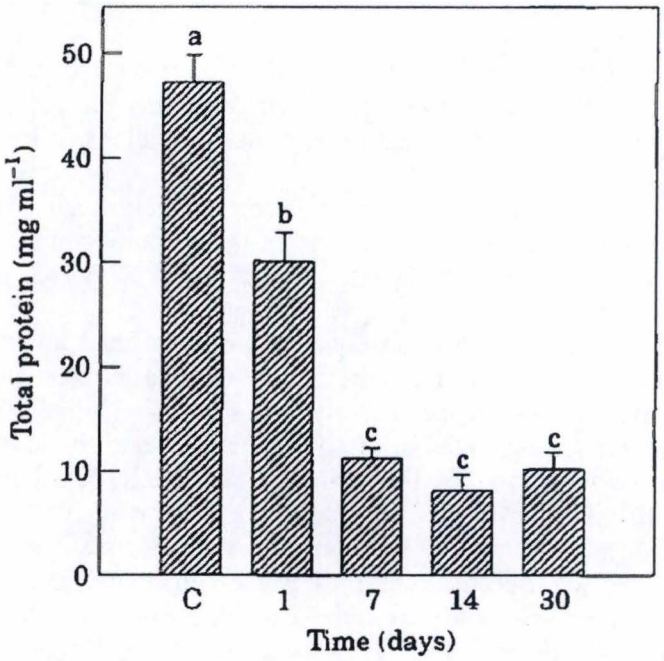


Figure 5.18 : Concentration moyenne ± un écart-type de protéines plasmatiques totales de carpes (*Cyprinus carpio* L.) pendant un stress de confinement de 1, 7, 14 et 30 jours. C : Contrôles non stressés. Nombre de poisson : 10. Les lettres indiques une différence significative (P<0,05) (Yin *et al.,* 1995).

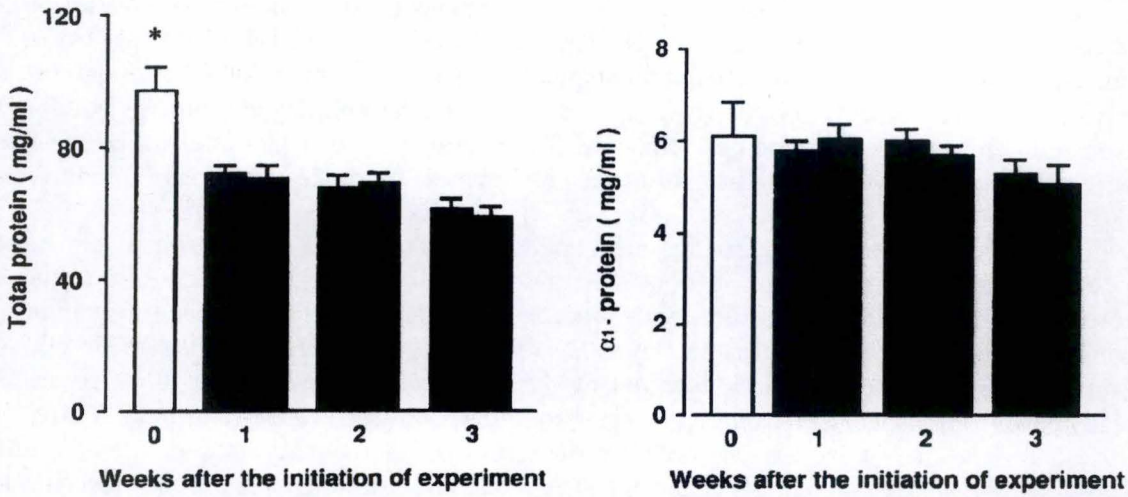


Figure 5.19: Changement dans la quantité moyenne ± un écart-type de protéines (graphique de gauche) et d'α_1-protéine (graphique de droite) plasmatique chez des saumons masou (*Oncorhynchus masou*) nourris avec un supplément de cortisol (barre noir à droite) et contrôles (barre noir plus clair à gauche). ▭ Valeur initiale. Dosage effectué sur 7 poissons. * : Différence significative (Nagae *et al.,* 1994).

Par contre, Nagae *et al.* (1994) n'ont pas observé de variations significatives dans la quantité de protéines dans le sérum après avoir nourris des truites (*Oncorhynchus masou*) avec du cortisol. La quantité d'α1-protéine, une des protéines les plus importantes dans le sérum, n'a pas non plus été affectée (voir figure 5.19).

6. Etat des connaissances en protéomique chez les poissons

La protéomique est une technique récente qui est beaucoup utilisée chez les mammifères dans les recherches au niveau cellulaire. Mais il s'avère que cette technique est intéressante pour l'étude des modifications provoquées au niveau de l'organisme par des perturbations environnementales.

6.1. Facteurs induisant un changement dans les protéines

Le stress, comme beaucoup de facteurs, peut amener les protéomes d'un organisme à se modifier. Voici quelques descriptions de modifications de protéomes provoquées par des stress.

La réponse en phase aiguë est définie comme étant une réponse physiologique rapide induite et orchestrée par une blessure, une infection, un traumatisme ou un stress. Chez les vertébrés homéothermes, cette réponse en phase aiguë est marquée par des réactions locales et systématiques comme l'activation du complément, la production d'hormones adénocorticotropes ou encore la production par le foie de protéines de phase aiguë dans le plasma. Beaucoup de ces protéines voient leur nombre croître par une augmentation de leur expression et de leur sécrétion. La concentration d'autres en revanche diminue, ce qui serait dû à une réduction de l'expression plutôt qu'à une utilisation de celles-ci. Ces protéines ont des fonctions variées comme la défense ou l'adaptation de l'hôte à une infection, le transport ou encore des fonctions antimicrobiennes. Du fait de leur nature ectotherme, les poissons ne peuvent pas se baser sur une réponse rapide du système immunitaire acquis pour se défendre. Pour ce faire, ils utilisent donc principalement le système immunitaire inné et la réponse en phase aiguë. Ceci montre bien l'importance de ces protéines dans le système immunitaire. D'ailleurs, les poissons téléostéens ont beaucoup de protéines homologues avec celles des mammifères ; que ce soient des protéines du système du complément (C3, C4 et facteur B par exemple), des transferrines ou des CRP (C-Réactive Protein) (Russel *et al.*, 2006).

La réponse cellulaire à un stress est une réaction à toute forme de modification macromoléculaire dans la cellule. Cette réponse cellulaire, très conservée, a lieu quand les conditions environnementales sont telles qu'elles perturbent l'homéostasie cellulaire surtout au niveau de l'intégrité des protéines et de l'ADN. Pour éviter cela, la cellule produit des protéines plus ou moins conservées ou cours de l'évolution. Certaines de ces protéines, très conservées, ont des fonctions très importantes dans toutes les cellules. Beaucoup de stress environnementaux causent des changements délétères dans la conformation des protéines ainsi que sur l'ADN. C'est le cas par exemple des stress osmotiques, thermiques, de radiations, d'hypoxie etc. La réponse cellulaire au stress permet aussi la stabilisation d'autres molécules de la cellule comme les structures de lipides des membranes ou les ARN. Si le stress est trop grand pour les capacités de

la cellule à maintenir son homéostasie, la réponse de celle-ci peut être l'apoptose chez des eucaryotes multicellulaires (Kültz, 2003).

7. Objectif de cette étude

Dans le cadre du développement de l'aquaculture de la perche (*Perca fluviatilis*), nous avons étudié les effets de la domestication sur les réponses physiologiques et immunologiques à un stress chronique de confinement. On suppose en effet qu'une acclimatation à l'aquaculture se déroule au cours des générations, même sans aucune sélection artificielle. On pense donc qu'une une sélection naturelle a lieu au sein même des bassins. Cette acclimatation éventuelle irait dans le sens d'une réponse physiologique et immunologique moins importante aux différents stress engendrés par l'aquaculture. Pour évaluer les réponses physiologiques et immunologiques, nous avons dosé différents paramètres : le cortisol et le glucose sanguin pour la réponse physiologique. L'activité du lysozyme sérique, la production de radicaux superoxydes et la quantité de protéines et d'Ig sériques pour la réponse immunitaire. Parallèlement à ces dosages, une approche préliminaire en protéomique sur le sérum a également été mise au point et utilisée.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous allons détailler le matériel, les techniques et méthodes qui ont été utilisés dans le cadre de la réalisation de cette étude.

1. Les poissons et l'expérience

Les perches utilisées dans le cadre de cette expérience ont été produites et élevées au Centre de Formation et de Recherches en Aquaculture (CEFRA) de l'Université de Liège situé à Tihange. Le stock est constitué de deux générations distinctes : des juvéniles F1 issus de géniteurs sauvages et des juvéniles F4 issus de géniteurs élevés en captivité depuis trois générations. Les F1 et les F4 utilisés dans cette expérience ont une même origine. Dans les deux cas, les pontes utilisées afin d'obtenir les stocks de poissons F1 et F4 sont des mélanges de pontes originaire de la Meuse et du lac de Robertville. Avant la mise en charge des poissons, leur masse moyenne était de 124 ± 39 g et leur longueur moyenne de 203 ± 20 mm. Dans les deux cas, la population est issue de la reproduction naturelle et aucune sélection de taille ou de sexe n'a été faite. La population est théoriquement constituée de 50 % de mâles et de 50 % de femelles. Le nourrissage a été déterminé en fonction de la biomasse des bassins. Il avait eu lieu tous les matins et était à base de granulés de marque Skretting de granulométrie P2.

Le type de stress Pour confiner des poissons, deux techniques existent à ce jour : soit on réduit la taille du bassin à l'aide de filet, ce qui diminue l'espace de vie du poisson sans diminuer la perception que le poisson a de celui-ci, soit on met les poissons dans des bassins de taille plus modeste. C'est cette deuxième technique qui a été retenue dans le cadre de cette expérience.

Avant le début de l'expérience, les poissons ont été acclimatés durant 13 jours dans des grands bassins servant aux poissons « contrôles ». Deux bassins contenant 200 poissons par génération, ce qui donne 400 poissons par génération et 800 poissons en tout. Au début de l'expérience, juste après le premier prélèvement, les poissons ont été répartis dans les différents bassins, à savoir, pour chaque génération, 3 petits bassins en duplicat contenant chacun 13 poissons. Le restant des poissons (400-6*13) a été repartis de manière équitable dans 2 grands bassins. Chaque petit bassin et son duplicat ne servent que pour un seul prélèvement. Les poissons contrôles non confinés ont été prélevés à chaque date dans les mêmes grands bassins.

Les bassins, de forme sub-carrée dans les deux cas, servant aux poissons « contrôles » non confinés ont une surface de 4m². Les bassins servant au confinement des poissons ont une surface de 0,25 m². Dans les deux cas, la hauteur d'eau est de 25 cm et les bassins sont de couleur grise, ceci dans le but d'éviter l'effet hauteur de la colonne d'eau et couleur du bassin sur le stress. Les grands bassins ont donc un volume de 1m³ et les petits de 62,5 L. Le taux de renouvellement de l'eau est de 3600 L h^{-1} dans les grands bassins et de 720 L h^{-1} dans les petits. Ce taux de renouvellement permet d'avoir une quantité d'oxygène dissout comprise entre minimum 6,8 et maximum 9,4 mg d'O_2 L^{-1} avec une moyenne de 7,76 ± 0,38 mg d'O_2 L^{-1} pour les grands bassins. Pour les petits bassins, la quantité d'oxygène dissout est comprise entre 6,4 et 8,9 mg d'O_2 L^{-1} avec une moyenne de 7,5 ± 0,67 mg d'O_2 L^{-1}.

Les poissons sont restés tout au long de l'expérience dans le même circuit fermé dont la température est régulée et identique dans tous les bassins. La température a été maintenue relativement constante tout au long de l'expérience (22,7 ± 0,74°C). La photopériode était la

photopériode naturelle. Elle était donc croissante tout au long de l'expérience qui s'est déroulée de début mars (mise en charge le 8 mars 2007) à début mai. Une température élevée constante inhibe la reproduction chez les perches femelles et donc l'influence potentielle de cette reproduction sur le stress et l'immunité (Pottinger & Carrick, 1999).

2. Echantillonnage

Un prélèvement de sang et d'organes a été réalisé avant la mise en charge des bassins afin de connaître l'état initial des poissons. Ensuite, trois prélèvements ont été effectués au J7, 28 et 55. Tous les prélèvements ont été effectués entre 9 et 11 h du matin afin d'éviter l'effet de la variation diurnale du taux de cortisol. A chaque prélèvement, 5 poissons ont été pris dans chacun des 4 grands bassins et 10 poissons dans 4 petits bassins (2 bassins de chaque taille par génération). Ce qui donne 60 poissons par prélèvement (30 F1 et 30 F4). Le prélèvement avant la mise en charge était constitué de 5 poissons par bassin, donc 20 poissons (10 F1 et 10 F4). Sur toute l'expérience, ce sont donc 200 poissons qui ont été prélevés.

2.1. Prélèvement du sang

Pour être prélevés, les poissons ont été sortis de leur bassin à l'aide d'une épuisette et mis dans une bassine de 30 l contenant 0,3 ml de 2-Phénoxyéthanol (éthylène glycol monophényl éther) (Sigma) par litre d'eau afin de les anesthésier. Au bout de ±2 minutes, le sang des poissons a été prélevé dans la veine caudale à l'aide de seringues. Si le prélèvement n'a pas été effectué dans les 5min après la capture du poisson, le sang du poisson ne servira pas pour le dosage du cortisol car cette hormone est libérée dans le sang au bout de 5min chez la perche (cf. résultats Marotte 2006 non publiés). C'est aussi pour cette raison que nous avons préféré déléguer une personne par poisson comme le préconise Auperin *et al.* (1997) plutôt qu'un préleveur unique. Après le prélèvement de minimum 1 ml de sang par poisson, le sang a été mis dans des eppendorfs numérotés et laissés sur glace à 4°C. Après qu'un caillot se soit formé dans chaque eppendorf, nous avons centrifugé à 9000 RPM (Tour Par Minute) pendant 5 min. Nous avons ensuite récupéré le sérum (le surnageant) que nous avons aliquoté en différentes quantités pour les différents dosages :

- 60 µl pour le dosage du cortisol
- 40 µl pour le dosage du glucose
- 60 µl pour le dosage du lysozyme
- 40 µl pour le dosage des protéines et des immunoglobulines
- 20µl pour la protéomique

2.2. Prélèvement des organes

Après le prélèvement du sang, les poissons ont été immédiatement euthanasiés par rupture de la colonne vertébrale et de la moelle épinière. Afin d'éviter toute dégradation et modification post-mortem des organes et de leur contenu, les poissons ont été disséqués en trois séries par prélèvement. Les organes ont donc toujours été prélevés en moins de 20 minutes. Les poissons

ont aussi été pesés et mesurés. Leur foie et leur rate ont été prélevés et pesés. Après prélèvement, les foies ont été plongés dans l'azote liquide et les rates ont été gardées sur glace à 4°C dans un milieu de culture L-15 comme décrit ci-dessous dans le dosage des radicaux superoxydes.

3. Dosages des différents indicateurs

Le but de cette expérience n'étant pas l'étude des indicateurs de stress chez la perche, d'autres expériences s'étant déjà focalisées sur cet aspect (Acerete *et al.,* 2004 ; Jentoft *et al.,* 2005 ; Haux *et al.*, 1985), nous avons sélectionné les deux indicateurs de stress les plus usités, à savoir le cortisol et le glucose. Ces indicateurs sont connus pour varier en cas de stress chronique ou aigu et permettent d'observer la mise en place des réponses primaire et secondaire au stress et donc de connaître l'état de stress des poissons. Nous n'avons pas dosé les chlorures car ils ne varient pas toujours en cas de stress chronique (Yin *et al.,* 1995) ni même le taux d'hématocrite car ce n'est pas un indicateur bien connu et parce qu'il ne varie pas toujours de la même manière suivant le stress ou l'espèce de poissons étudié.

Pour évaluer l'état du système immunitaire inné et acquis, nous avons dosé l'activité du lysozyme, la production de radicaux superoxydes par les macrophages de la rate ainsi que la quantité de protéines et d'immunoglobulines contenues dans le sérum. Le lysozyme sérique et les radicaux superoxydes des macrophages sont des composants du système immunitaire inné qui sont connus pour voir leur activité ou leur production varier sous l'action de stress. La quantité de protéines sériques est un indicateur du système immunitaire du fait que le sérum contient de nombreuses protéines intervenant dans l'immunité (Yin *et al.,* 1995). Les immunoglobulines, quant à elles, sont un des maillons les plus important de l'immunité acquise.

Nous avons également calculé trois indices intégrateurs :

- L'ISS (Indice Spléno Somatique) qui est le rapport de la masse de la rate (Mr) sur la masse totale (Mt) de l'individu multiplié par 100 [$Mr\ Mt^{-1}*100$].
- L'IHS (Indice Hépato Somatique) qui est le rapport de la masse du foie (Mh) sur la masse totale (Mt) de l'individu multiplié par 100 [$Mh\ Mt^{-1}*100$].
- Le SGR (Taux de croissance spécifique) pour un temps défini s'exprime en % j^{-1} et est défini comme étant la soustraction du logarithme népérien (Ln) de la masse initiale (Mi) à celui de la masse finale (Mf), le tout divisé par la différence de temps (ΔT) entre les deux prélèvements multiplié par 100 [$(Ln\ Mf-Ln\ Mi)\ \Delta T^{-1}*100$].

3.1. Le cortisol

Le cortisol est une hormone connue et régulièrement dosée. Il existe des kits prêts à l'emploi pour le doser. Nous avons utilisé le kit « Spectria ® » de la société Orion Diagnostica qui permet de doser le cortisol par radioimmunoassay (RIA). Le principe de ce test est une compétition pour un anticorps fixé dans un tube, entre une solution de cortisol marqué à l'iode 125 de concentration connue et une solution de cortisol froid de concentration inconnue (les échantillons). La concentration de cortisol présent dans les échantillons après incubation sera inversement proportionnelle à la quantité de cortisol marqué fixé sur les anticorps. Afin de déterminer la concentration de cortisol, une courbe standard a été effectuée à partir de solutions de concentrations croissantes en cortisol.

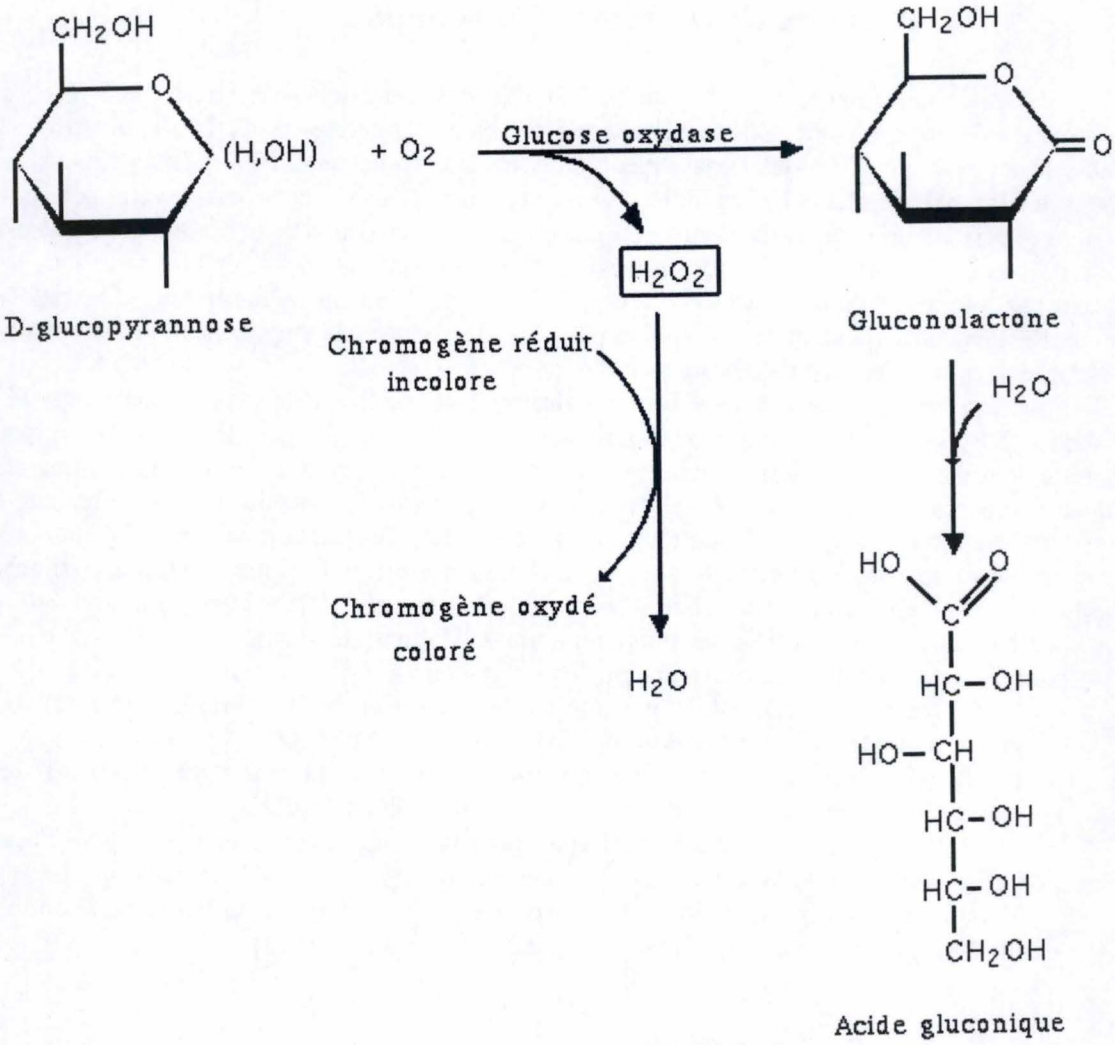


Schéma 1: Chaîne de réaction permettant le dosage du glucose par méthode enzymatique (http://fr.wikipedia.org/wiki/Glucose).

Le dosage s'effectue par l'ajout de 500µl de la solution contenant le cortisol marqué à 20 µl de sérum en duplicat dans les tubes contenant les anticorps. On laisse les tubes incuber pendant 2 heures à 37°C dans un bain marie. Après cela, les tubes sont vidés et rincés avec un ml d'eau distillée. Enfin les tubes sont à nouveau vidés et séchés puis lus pendant au moins une minute à l'aide d'un compteur d'ionisation gamma.

3.2. Le glucose

Le glucose contenu dans le sérum a été dosé par dosage enzymatique. Ce dosage se déroule en deux étapes principales et est fait en duplicat. La première étape consiste en une déprotéinisation du sérum à l'aide d'acide perchlorique à 0,33 M. La seconde étape se déroule après une centrifugation de 10 minutes à 3000 RPM et consiste à rajouter à 25 µl de surnageant, 2 ml d'une solution réactionnelle constituée d'un litre de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 dans laquelle on a dilué 4000 unités de glucose oxydase (Sigma), 294 unités de peroxydase (Sigma) et 250mg d'ABTS (2.2' – Azino-di-(3-éthyl-Benzthiazolin-sulfonat(6)) (Fluka). Cette solution est ensuite incubée au bain marie à 38°C pendant 15 minutes pour permettre à la glucose oxydase d'oxyder le glucose en acide gluconique et en eau oxygénée (H_2O_2). Cette H_2O_2 sera transformée par la peroxydase en chromogène réduit dont l'absorbance pourra être lue au spectrophotomètre à 436 nm (cf. schéma 1). Une droite standard a également été réalisée à partir d'une solution ayant une concentration connue de glucose plus ou moins diluée.

3.3. Le lysozyme

Le lysozyme est une enzyme s'attaquant aux bactéries en agissant sur la paroi de muréine. Ce sont donc principalement les bactéries gram positive qui sont visées par cette enzyme. Sa concentration a été dosée à l'aide de bactéries Gram positive du genre *Micrococcus*.

Nous avons déposé 20µl de sérum en duplicat et par échantillon dans une plaque multi-puits. Nous avons également effectué une courbe standard à l'aide d'une solution de lysozyme d'œufs de poule (Sigma, 46400 unités mg^{-1}) diluée en série dans du tampon de Na_2PO_4 0,05 M à pH 6.2. La courbe standard s'étend de 300 à 1000 unités ml^{-1} de tampon Na_2PO_4. A chacun des échantillons et des points de la courbe standard, nous avons ajouté 130 µl d'une solution de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) à 0,6 mg ml^{-1} de tampon Na_2PO_4 0,05 à pH 6,2. Une première lecture de l'absorbance au spectrophotomètre (λ = 450 nm) a été réalisée 5 minutes après l'ajout de la solution, puis toutes les 5 minutes pendant 40 minutes. Le but de la manipulation étant d'observer un éclaircissement de la solution au cours du temps suite à l'action lytique du lysozyme sur les bactéries. Grâce à la courbe standard, l'activité du lysozyme présent dans le sérum a été exprimée en équivalent d'unité de lysozyme d'œufs de poules par millilitre de sérum.

3.4. Les radicaux superoxydes ou dosage NBT

A l'aide d'une technique décrite par Couso et ses collaborateurs (2003) et que nous avons légèrement modifiée, nous avons dosé les radicaux superoxydes ou radicaux libres produits par

les macrophages de la rate. Pour cela, les rates des poissons ont été prélevées et directement mise dans du milieu de culture L-15 ou leibovitz (sigma) (14,2 g L^{-1} d'eau distillée) dans des eppendorfs maintenus sur glace. Nous les avons ensuite homogénéisées en les coupant en petits morceaux que nous avons fait passer à travers un tamis moléculaire à l'aide d'un piston de seringue. Par après, nous avons effectué deux centrifugations à 0,6rcf pendant 5 minutes chacune suivie d'un rinçage avec 500 µl de L-15, afin d'éliminer les restants de graisses et de ne garder que les cellules. Après cela, nous avons prélevé 100 µl en duplicat de chacun des échantillons. Les 300 µl restants pour chaque échantillon ont été mis en commun afin de faire une courbe standard. Les cellules ont ensuite incubé pendant 30 minutes. Ensuite, pour les échantillons, nous avons centrifugé, éliminé le surnageant et remis en suspension le culot à l'aide de 100 µl de solution de NBT (NitroBlueTetrazonium) (2 mg de NBT ml^{-1} de PBS). Pour la courbe standard, les échantillons ont été centrifugés et leur culot a été remis en suspension à l'aide de 100 µl d'une solution de NBT de concentration croissante. Nous avons enfin laissé la solution incuber une heure afin que le NBT soit réduit en formazan par les radicaux superoxydes se trouvant dans les macrophages. Après ce temps d'incubation, nous avons centrifugé les eppendorfs, éliminé le surnageant et ajouté tour à tour sur le culot du méthanol, du KOH 2 M et du N-diméthyl-formamide (Sigma). Ces produits servent respectivement à arrêter la réaction, lyser les cellules et lyser les parois afin de libérer le formazan formé dans les cellules. La solution ainsi formée a été centrifugée, le surnageant formé a été récupéré et lu au spectrophotomètre à 550nm.

3.5. Dosage des protéines

Les protéines du sérum ont été dosées par la technique élaborée par Bradford (1976). Cette technique, très sensible, est basée sur l'adsorption du bleu de Coomassie G250 sur les protéines en milieu acide. Après s'être adsorbé sur les protéines, le pic d'adsorption du bleu de Coomassie G250 passe du rouge au bleu, ce qui permet le dosage des protéines au spectrophotomètre à 595 nm[1]. Il existe des kits prêts à l'emploi permettant un dosage rapide. C'est le kit Bio-Rad Protein Assay de la société Bio-Rad qui a été utilisé[2].

Pour effectuer ce dosage, il faut faire des tests afin d'établir la dilution et la quantité de sérum nécessaire qui permettra d'avoir la quantité de protéines se trouvant dans la droite d'étalonnage. Dans notre cas, 5 µl de sérum dilué 10 fois est idéal. Il suffit ensuite de prendre la solution de Bio-Rad Protein Assay, de la diluée 5 fois dans de l'eau, et d'ajouter 2 ml au 5 µl de sérum dilué 10 fois. Après mélange et 2 minutes d'incubation, la solution est lue au spectrophotomètre à 595 nm. La quantité de protéine est calculée par l'intermédiaire d'une droite d'étalonnage effectuée à l'aide une quantité connue de BSA (Albumine Sérique Bovine). Ce dosage est effectué en triplicat afin de diminuer le risque d'erreur de lecture et de manipulation.

3.6. Dosage des immunoglobulines totales

Le dosage des immunoglobulines (Ig) totales est basé sur une technique décrite par Siwicki & Anderson (1993) (cités dans Dautremepuits *et al.,* 2004) et validée par Rotllant *et al.* (1997).

[1] http://www.chimie-biochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/prodosage.html
[2] http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/biorad_assay.pdf

Composition de la solution de réhydratation des strips :

- urée 7M (Plus One)
- tiourée 2M (Plus One)
- CHAPS 2% (Plus One)
- Bleu de bromophénol : une pointe
- IPG (Immobilized pH Gradient) soit 4-7, soit 3-11 en fonction de le gradient de pH auquel on veut séparer les protéines : 5µl/ml
- DTT : 2,8mg/ml (Plus One)

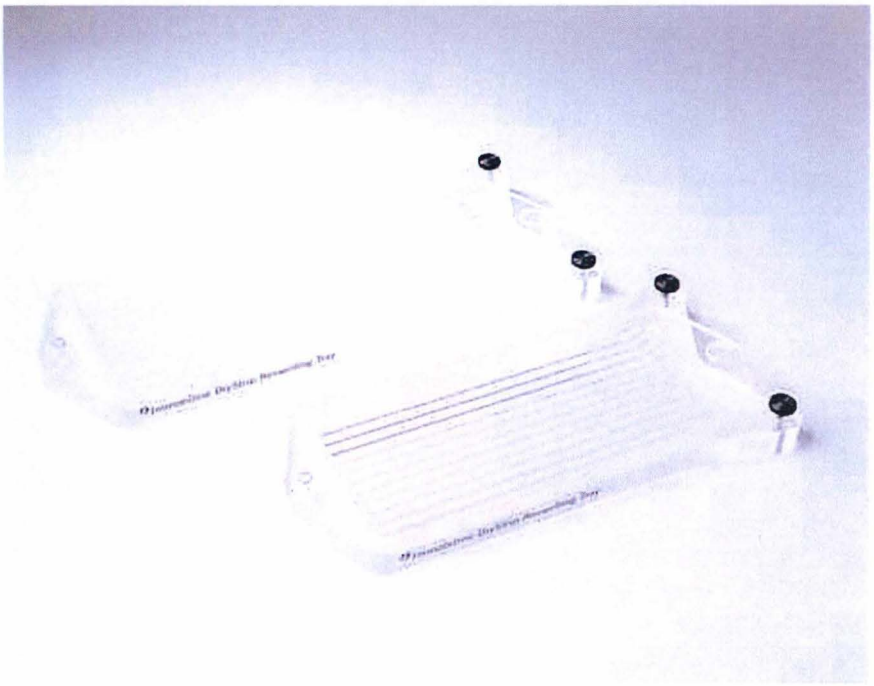


Photo 1 : Le reswelling tray (http://www5.gelifesciences.com/Images/highres/RESWELL2-01.jpg).

Ce dosage consiste à faire la différence entre la quantité de protéines se trouvant dans le sérum, avant et après précipitation des grosses protéines de ce sérum, dont la majeure partie sont des Ig, en présence de polyéthylène glycol (PEG).

Nous avons tout d'abord pris 20 µl du sérum que nous avons dilué dans une quantité équivalente d'une solution de PEG 10000 12 %. Après avoir vortexé la solution, nous l'avons laissée pendant 2 heures sous agitation. Après ce temps d'incubation, nous avons centrifugé les échantillons à 1000 G pendant 10min. Nous avons enfin dosé la quantité de protéines se trouvant dans le surnageant à l'aide de la technique Bradford décrite ci-dessus. En soustrayant la quantité de protéines mesurée après précipitation dans la solution de PEG à celle mesurée directement sur le sérum, nous avons pu calculer la quantité d'Ig se trouvant dans le sérum.

4. Analyse statistique des résultats des dosages

Les résultats ont été traités, calculés et mis sous forme de tableaux et de graphiques par Excel® (Microsoft®). Les analyses statistiques ont été faites à l'aide de Statistica® (StatSoft®). Elles ont consisté en un test de Kolmogorov-Smirnov afin de voir si la population suivait une distribution normale. Cette condition est obligatoire afin de pouvoir vérifier l'homogénéité des variances grâce au test de Bartlett, d'Hartley et de Cochran. Cette homogénéité des variances est elle-même obligatoire pour pouvoir effectuer une analyse des variances (ANOVA) permettant de voir les effets des différents facteurs sur les différentes variables. Nous avons étudié les facteurs « temps », « confinement » et « génération » et les interactions entre ceux-ci. Nous avons donc effectué une ANOVA 3. Dans le cas où une différence significative ($P<0,05$) est observée et afin de constater à quel niveau les différences sont significatives, nous avons appliqué le test post-hoc qui paraissait le plus adapté[3], c'est-à-dire un test de Tukey HSD (Honestly Significative Difference) un test de Tukey adapté dans le cas ou le nombre d'unités expérimentales n'est pas identique.

Les prélèvements initiaux effectués avant la mise en charge des poissons n'ont pas été utilisés dans les analyses statistiques globales. En effet, ces valeurs témoignent de l'état des poissons avant le début de l'expérience. Il ne s'agit donc pas d'un prélèvement J0 obtenu dans les conditions de confinement chronique tel que nous l'avons appliqué dans notre étude. Nous avons toutefois effectué, sur ce set de données initiales, une analyse comparable à celle expliquée ci-dessus, afin de voir si une différence entre les générations existait avant le début de l'expérience. Le facteur « temps » n'étant pas nécessaire et le facteur « confinement » n'existant pas, c'est donc une ANOVA 1 qui a été utilisée.

[3] http://www.ulg.ac.be/cogsci/COURS/STAT0033/COURSpdf/STAT0033%20Chapitre14.pdf

Composition de la solution de lyse 2D:

- Urée 7M (Plus One)
- Thiourée 2M (Plus One)
- DTT 1% (Plus One)
- CHAPS 4% (Plus One)
- IPG 2% soit 4-7 soit 3-11 en fonction du gradient de pH pour la séparation.

Photo 2 : L'IPGphor (http://www.xyproteomics.org/xycms/images/ipgphor2.jpg).

Composition des gels d'acrylamide :

	12,5%		14 %
	6 gels 24 cm	**3 gels 24cm**	**6 gels 24 cm**
• Acryl./bis 30% (Bio-Rad)	188 ml	146 ml	210 ml
• Tris 1.5M pH 8.8 (Plus One)	113 ml	88 ml	113 ml
• H_2O	142 ml	111 ml	118 ml
• SDS 10% (5gr/50ml) (Plus one)	4,5 ml	3,5 ml	4,5 ml
• Temed pur	148,5 **µl**	115,5 **µl**	148,5 **µl**
• APS 10% (100mg/ml)	2,25 ml	1,75 ml	2,25 ml

Composition de la solution d'équilibration :

• Tris HCl 1.5M pH8.8	2,35ml	4,7	1,34
• Urée	25,22gr	50,44	14,4
• Glycérol 87%	24,15ml	48,3	13,8
• SDS	1,4gr	2,8	0,8
• H_2O pour arriver à	70ml	140ml	40ml
	70ml	140ml	40 ml

5. La protéomique

5.1. Avantage de la protéomique

La protéomique est une technique qui permet la mise en évidence des variations observées dans un protéome particulier suite par exemple, à différents stress environnementaux. Le protéome est défini comme étant l' « ensemble » des protéines exprimées dans un organe, un type cellulaire ou un tissu particulier, sous une condition et à un moment donné.

L'adaptation ou acclimatation d'animaux à leur environnement, résulte, entre autre, de changements dans l'expression des gènes. Ces changements induisent, au niveau de l'acclimatation, des réponses biochimiques, physiologiques et comportementales. Ces changements sont aussi probablement fortement impliqués dans le processus d'adaptation.

La protéomique est une technique très intéressante car elle se focalise sur les protéines. Or ce sont les protéines qui donnent la fonction et non les gènes. De plus, il existe beaucoup plus de protéines que de gènes à cause des modifications post-traductionnelles et post-transcriptionnelles. De ce fait, la synthèse de protéines n'est pas corrélée avec celle d'ARN_m. Enfin, tous les gènes ne sont pas exprimés dans tous les tissus ou toutes les cellules. Certaines protéines ne sont exprimées que dans certains organes sous certaines conditions.

Contrairement aux dosages d'indicateurs ciblés, la protéomique est une approche sans à priori. Cette technique a donc l'avantage de pouvoir mettre en évidence d'autres indicateurs auquel on n'avait peut-être pas pensé.

5.2. Description des manipulations

Le but de la protéomique est de séparer des protéines d'un tissu, d'un organe, d'une cellule entière ou d'une fraction de celle-ci suivant 2 dimensions. La première séparation s'effectue en fonction du point isoélectrique ou de la charge de la protéine et la deuxième en fonction du poids moléculaire. Afin de repérer les spots de protéines séparés, les gels doivent être colorés. Dans cette étude, la coloration utilisée est le ruthénium. Il est en effet très avantageux de par son prix, contrairement au 2D-Dige et de par sa linéarité (contrairement à l'argent). Son seul désavantage étant le temps de réalisation.

Pour effectuer cette expérience, de nombreux tests avec des colorations à l'argent ont été effectués. Nous avons essayé en changeant le pourcentage d'acrylamide, la composition du tampon (Tp) d'électrophorèse (Tp glycine ou tricine) ou encore le gradient de pH servant de séparation pour la première dimension.

Nous avons décidé de réaliser la protéomique sur le sérum. Celui-ci drainant les organes du système immunitaire et permettant la circulation de protéines intervenant dans le système immunitaire, il est intéressant de l'étudier.

La première migration s'effectue sur des strips. Ce sont de petites bandes de plastique recouvertes de gel qu'il faut réhydrater. Ces gels forment un gradient de pH de 4-7 ou de 3-11. Pour réhydrater ces strips, il faut les laisser entre 15 et 20 h dans la solution de réhydratation (composition voir verso), à raison de 450 µl par strips. La réhydratation s'effectue dans un reswelling tray (voir photo 1).

Photo 3 : Cuvette d'électrophorèse 2D
(http://www5.gelifesciences.com/Images/highres/ED6%201_cmyk.jpg).

Composition des différents Tp d'électrophorèse :

- **Tampon glycine :**
  - **Pour la cuve inférieure :**

- Tris (Plus One) 30,2g
- Glycine (Plus One) 144 g
- SDS (Plus One) 10g
- H_2O porté à 10L

  - **Pour la cuve supérieure :**

- Tris (Plus One) 30,2g
- Glycine (Plus One) 144 g
- SDS (Plus One) 20g
- H_2O porté à 10L

- **Tampon tricine :**
  - **Pour la cuve inférieure :**

- Tris (Plus One) 100mM
- Tricine (Plus One) 100mM
- SDS (Plus One) 0,1%
- pH 8,25

  - **Pour la cuve supérieure**

- Tris (Plus One) 0,1%
- pH 8,9

Composition des bains pour la coloration au ruthénium :

- **Fixation** : 30% éthanol et 10% acide acétique
- **Rinçage** : 3 X 30 min dans éthanol 20%
- **Coloration** : pendant 6h dans 1µM RuBP (50µl dans 1 L d'**eau**)
- **Equilibration** : 2 X 10 min le gel dans H_2O
- On peut faire un premier scan
- **Décoloration** : pendant 15 h dans 40% éthanol / 10% acide acétique sous agitation
- **Equilibration** : 2 X 10 min le gel dans H_2O
- Scan

Composition des bains pour la coloration à l'argent :

- **Fixation** : 30min. (Enlève les ampholytes qui peuvent abîmer le gel lors du staining). Sous hotte ou couvrir.

o Éthanol	120ml	720ml
o Ac. Acétique	30ml	180ml
o Eau	150ml	900ml
	300ml	1800ml

- **Incubation** : 1h ou toute la nuit (à 4°C). Sous hotte ou couvrir. On peut laisser les gels max 3 jours.

o Éthanol	100ml	600ml
o Na acétate.$3H_2O$	21.7g	130,2g
o $Na_2S_2O_3.5H_2O$	0.64g	3,84g
o H_2O	200ml	1200ml
o Glutaraldéhyde (50%) en dernier	0.807ml	4,84ml
	300 ml	1800ml

- **Rinçage** : 3 X 10min H_2O ou toute la nuit pour enlever le bruit de fond
- **Coloration** : 30min. Garder la sol à l'abri de la lumière.

o Nitrate d'Ag	0.3g	1,8g
o Formaldéhyde (37%) en dernier	100µl	600µl
o H_2O	300ml	1800ml
	300ml	1800ml

- **Rinçage** : 2 X 1min dans H_2O ultra pure
- **Developing** : 1 min ensuite à vue (environ 8min).

o Na_2CO_3	8.75g	55g
o Formaldéhyde (37%) en dernier	70µl	440µl
o H_2O	350ml	2200ml
	350ml	2200ml

- **Stop**: 10min

o EDTA	4.4g	26,4g
o H_2O	300ml	1800ml
	300ml	1800ml

- **Rinçage** : 3 X 5min dans H_2O

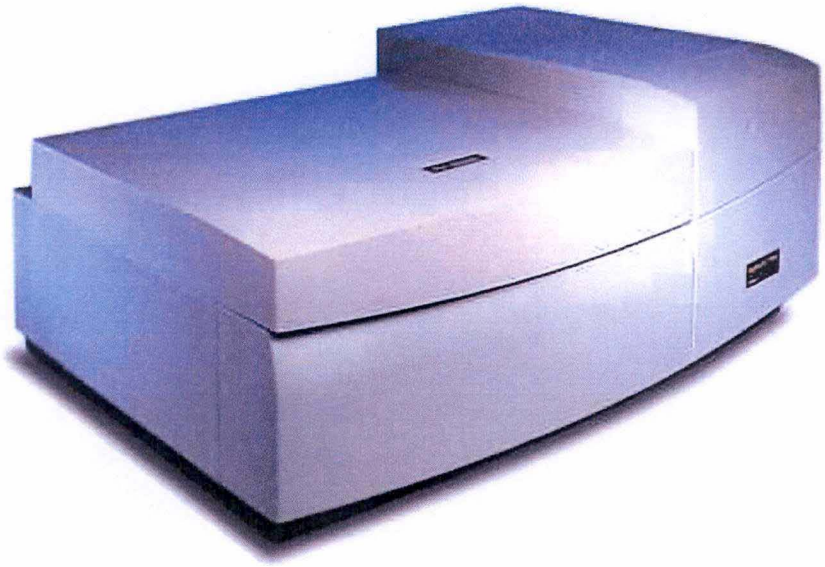


Photo 4 : Scanner en fluorescence « Typhoon »
(http://www5.gelifesciences.com/Images/highres/TTrio.jpg).

Le sérum ne peut pas être utilisé directement pour charger les strips. Il doit d'abord être dilué 6 fois dans une solution de lyse 2D (composition voir verso). Pour les tests, le sérum utilisé était du sérum de perche en stock. Le sérum utilisé pour les gels analytiques, est en fait constitué d'un pool de sérum de 2 poissons provenant d'un même bassin pris au hasard. C'est le sérum provenant des poissons prélevés au J7 qui a été utilisé. Par bassin, nous avons effectué 2 gels, soit 2 pools de 2 poissons. Ce sont donc 16 gels « analytiques » qui ont été réalisés en plus des 8 gels « tests ».

Une fois le sérum dilué dans la solution de lyse, nous avons effectué un dosage des protéines par la méthode Bradford (1976) décrite ci-dessus. Pour une coloration à l'argent, il est nécessaire de charger les strips avec 75 mg de protéines contre 150 mg pour une coloration au ruthénium.

Une fois la réhydratation des strips terminée, il faut les disposer dans l'IPGphor (voir photo 2) afin de réaliser la première migration. Cette première migration consiste à faire passer de l'électricité dans les strips plongés dans de l'huile, afin que les protéines se repartissent sur celui-ci en fonction de leur point isoélectrique. Après avoir correctement disposé les électrodes et chargés les strips avec la quantité de protéines adéquate, la première dimension peut-être lancée. C'est un programme automatique en quatre étapes :

- 300V pendant 3 h
- une montée jusqu'à 1000V pendant 6 h
- une montée jusqu'à 8000V pendant 3 h
- 8000V pendant 6 h

Une fois la première migration achevée, les strips doivent être retiré de l'huile. Ils peuvent être utilisés directement pour la seconde migration ou gardés à - 80°C.

La seconde migration s'effectue sur des gels coulés entres des plaques en verre. Dans le cas de la coloration au ruthénium, une des plaques entre lesquelles le gel est coulé doit être blanche et recouverte d'une solution de bind-silane (8 ml d'éthanol, 200 µl d'acide acétique glacial, 10 µl de bind-silane, 1,8 ml d'eau) afin que le gel y adhère après l'avoir démoulé. Les gels, dont la composition est donnée au verso de la page précédente, peuvent contenir plus ou moins d'acrylamide ce qui permet la séparation des protéines ayant un poids moléculaire plus ou moins élevé. Concrètement, au plus il y a d'acrylamide dans le gel, au plus les mailles formées par l'acrylamide dans le gel sont petites, et au plus les protéines ont du mal à y pénétrer. Nous avons essayé des gels avec 5, 12,5, 14 et 16 % d'acrylamide.

Avant de commencer la seconde migration, les protéines doivent être dénaturées dans une solution d'équilibration (SE) (composition voir verso) afin de les charger avec le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour permettre la migration en fonction de la masse de la protéine. Pour ce faire, chaque strip est disposé pendant 15 min dans le reswelling tray rempli avec 450 µl par strip de SE à laquelle on a additionné 100 mg de DTT (dithiothreitol) ml^{-1}. Ensuite, chaque strip est disposé, toujours dans le reswelling tray pendant 15 min dans 450 µl de SE à laquelle on a ajouté 25 mg d'iodoacétamyde ml^{-1}. La SE avec le DTT sert à dénaturer les protéines en brisant les ponts disulfures alors que la SE avec l'iodoacétamyde sert à maintenir les ponts disulfures brisés.

La migration pour la deuxième dimension est réalisée dans une cuvette d'électrophorèse spécifique pour les grands gels (voir photo 3). Cette étape consiste à établir une différence de potentiel entre deux cuves remplies avec du Tp d'électrophorèse (voir composition verso) et reliées entre elle par les gels. Le courant est donc obligé de passé par les gels en entraînant avec lui les protéines chargées de SDS.

Après la dénaturation des protéines, on rince les strips dans du Tp d'électrophorèse servant à remplir la cuve du haut, on glisse les strips au dessus des gels et on scelle le tout à l'aide d'une solution d'agarose (250 ml de Tp d'électrophorèse et 1,25 g d'agarose). On peut ensuite lancer la migration. Soit pendant toute la nuit avec du courant à 3 W par gel à 15°C soit pendant plus ou moins 8h avec du courant à 15 W par gel à 18°C.

Après que le front de migration, visible par le bleu de bromophénol contenu dans la solution d'agarose et dans les strips, soit arrivé au bout du gel, on peut arrêter la migration. On peut ensuite démouler les gels. Dans le cas de la coloration à l'argent, on démoule complètement le gel sans laisser de plaques en verres, alors que pour la coloration au ruthénium, le gel reste collé à la plaque blanche couverte avec la solution de bind-silane. Suivant la coloration, il y aura différents bains à faire (voir verso pour les différents bains). Après les bains, on peut scanner les gels avec un simple scanner dans le cas des gels à l'argent et avec un scanner en fluorescence (PMT = 550) pour la coloration au ruthénium (voir photo 4).

Les gels sont ensuite analysés à l'aide du programme Image Master ™ 2D Platinum v 6.0. Pour cela, il faut importer les gels dans le programme, ensuite les calibrer, par après repérer les spots (Smooth = 3, Minimum Area = 40 et Saliency = 75) et enfin matcher les gels, d'abord à l'intérieur d'une classe puis entre les classes.

Résultats

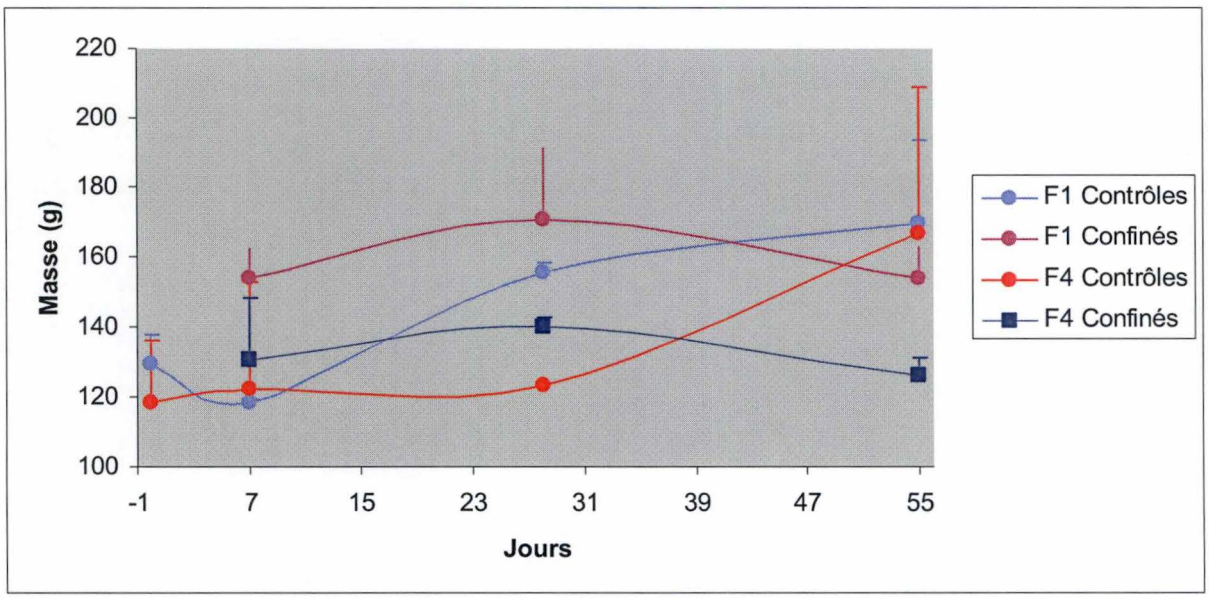
Résultats

Nous allons maintenant décrire les résultats que nous avons obtenus, mais commençons tout d'abord par quelques petits rappels sur le déroulement de l'expérience. Deux séries de perches, en captivité depuis une ou quatre générations, ont été réparties dans deux séries de bassins de tailles différentes. Pendant 55 jours, ces poissons ont été suivis et, régulièrement, des prélèvements ont été effectués afin de pouvoir évaluer l'état physiologique et immunitaire des poissons se trouvant dans les bassins. Afin de déterminer la qualité de l'eau, des prélèvements ont également été effectués périodiquement. Aucune mortalité anormale n'a été constatée dans les bassins pendant l'expérience, si ce n'est pour l'un des bassins des F1 confinés au J55 où 8 des 13 poissons du bassin sont morts. Enfin, les poissons étant maintenus en circuit fermé contrôlé, la qualité, la température et l'oxygénation de l'eau sont restées optimales tout au long de l'expérience.

1. Les paramètres mesurés sur les poissons

La mesure de la masse des poissons aux différents prélèvements nous a permis de calculer le taux de croissance spécifique (SGR). En plus de la masse totale, la mesure de celle du foie et de la rate nous a permis de calculer deux indices : l'IHS (Indice Hépato Somatique) et l'ISS (Indice Spléno Somatique).

1.1. La masse moyenne des poissons



Graphique 1 : Evolution de la masse (g) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type).

Tableau 1 : Résultats de l'ANOVA 3 effectuée sur les données de mesure de la masse moyenne des perches (1-TEMPS : Temps, 2-CONF : Confinement, 3-GEN : Génération, 12 : Interaction entre les Temps et le confinement, 13 : Interaction entre le temps et la génération etc.).

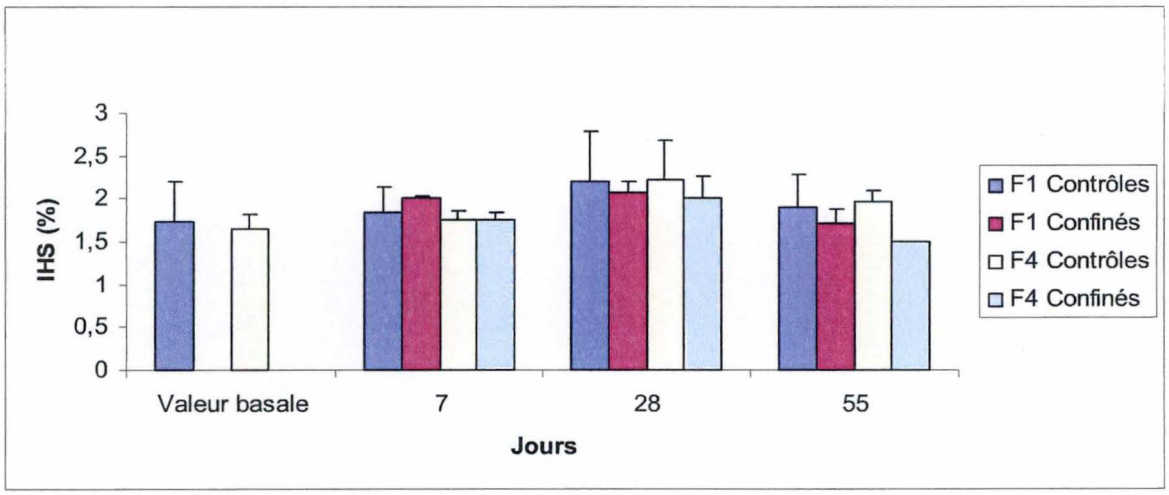
Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	1.093,129	12,000	403,207	2,711	0,107
2	1,000	57,347	12,000	403,207	0,142	0,713
3	1,000	2.122,991	12,000	403,207	5,265	0,041
12	2,000	1.497,490	12,000	403,207	3,714	0,056
13	2,000	249,010	12,000	403,207	0,618	0,556
23	1,000	423,671	12,000	403,207	1,051	0,326
123	2,000	132,452	12,000	403,207	0,328	0,726

Ce graphique montre trois effets importants :

- Lors du prélèvement avant le début de l'expérience, ce qui correspond aux valeurs basales sur le graphique 1, la masse moyenne des F1 était supérieure mais pas significativement (P>0,05) différente de celle des F4. Par contre, tout au long de l'expérience, et quel que soit le confinement, la masse moyenne des F1 est restée significativement (P<0,05) supérieure à celle des F4.
- Contrairement aux F4 contrôles qui ne suivent pas du tout la même dynamique et dont la croissance n'est visible qu'au J55, on observe une croissance des F1 contrôles dès les prélèvements du J28. En effet, entre le début de l'expérience et le J28, les F4 contrôles semblent ne pas avoir grandit, alors pour la même période, la croissance des F1 contrôles est bien visible.
- Les poissons confinés, que ce soit les F1 ou les F4, ont une tendance à voir leur masse diminuer au J55 alors que les contrôles voient la leur continuer à augmenter. Même si aucun effet significatif n'a été démontré, le graphique semble mettre en évidence que les poissons F1 et F4 confinés n'ont pas grandit pendant l'expérience. Le SGR calculé pour les 55 jours de l'expérience, semble être différent entre les poissons contrôles et leurs homologues confinés. Il est en effet de 0,309 % j^{-1} pour les F1 confinés, 0,111 pour les F4 confinés, 0,487 pour les F1 contrôles et 0,622 pour les F4 contrôles, mais aucune différence significative (P>0,05) n'a été mise en évidence. Si l'expérience avait duré plus longtemps, peut-être que cet effet serait significatif. A tous les prélèvements effectués avant le J55, même si l'effet n'est pas significatif, les poissons confinés étaient plus gros que leurs homologues non confinés.

L'ANOVA 3 effectuée sur les mesures de masse moyenne des perches révèle qu'il y a un effet significatif (P<0,05) global de la génération au cours des prélèvements (voir tableau 1). La masse moyenne des F1 (153,54 g) est en effet supérieure à celle des F4 (134,73 g) tout au long de l'expérience. Après avoir fait un test de Tukey sur l'ensemble des données, on ne peut distinguer aucune classe différente des autres (voir graphique 1).

1.2. L'IHS (Indice Hépato Somatique)



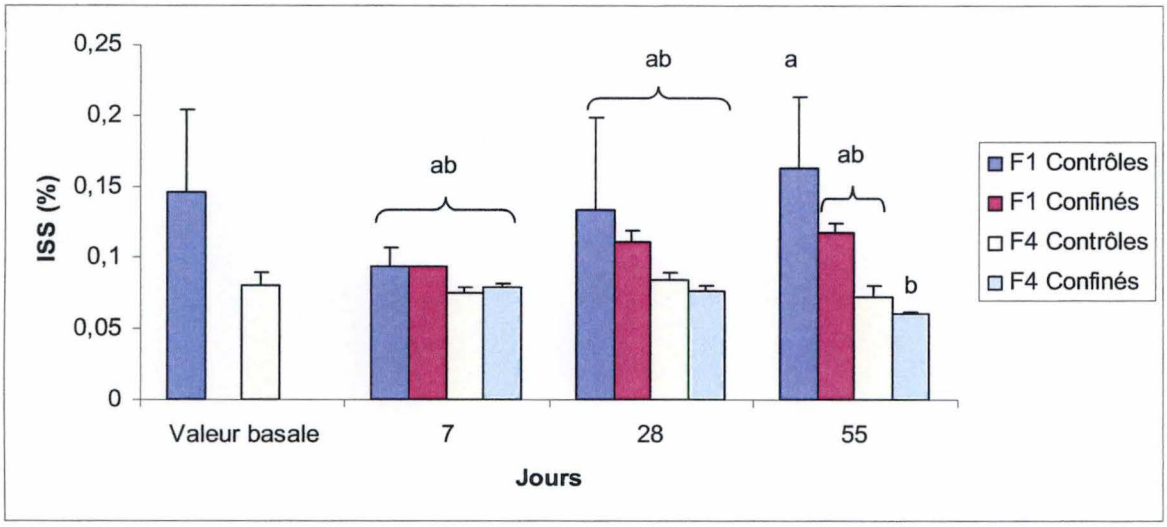
Graphique 2 : Evolution de l'IHS (%) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type).

Le graphique montre bien que l'IHS varie très peu quel que soient le confinement ou la génération. Toutes les valeurs sont comprises entre minimum 1,5 % qui est la valeur mesurée pour les F4 confiné du J55 et maximum 2,2 % qui la valeur mesurée pour les F4 contrôles du J28.

Au J28 et 55 contrairement au J7, les poissons confinés ont un IHS moins élevé que celui de leurs homologues contrôles. La plus grande différence en fonction du confinement est observé pour les F4 au J55. L'IHS moyen des F4 du J55 est 1,49 ± 0,006 % chez les poissons confinés alors qu'il est de 1,96 ± 0,128 % chez les poissons non confinés.

L'ANOVA 3 ne révèle aucun effet significatif du temps, du confinement ou de la génération. Nous n'avons pas effectué d'analyse post-hoc (voir graphique 2).

1.3. L'ISS (Indice Spléno Somatique)



Graphique 3 : Evolution de l'ISS (%) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type). Les groupes de poissons n'ayant pas de lettres en commun sont significativement différents entre eux (différence significative déterminée par un test post-hoc de Tukey quand P<0,05).

Avant le début de l'expérience, ce qui correspond aux valeurs basales sur le graphique 3, on remarque une forte différence entre l'ISS des F1 et des F4. Les F4 ayant un ISS de 0,081 ± 0,009 %, ce qui est presque 2 fois plus faible que celui des F1 qui est de 0,16 ± 0,058 %. Ce phénomène, même si il est moins marqué au J7, reste valable tout au long de l'expérience. Une différence significative est d'ailleurs observée entre les mesures d'ISS moyen des F1 et des F4 de toute l'expérience, les F4 ayant un ISS moyen (0,075 %) significativement plus faible que celui des F1 (0,119 %).

Au J7, on observe que l'ISS moyen des F1 contrôles diminue, comparé aux valeurs basales mesurées avant le début de l'expérience. Ces valeurs d'ISS pour les F1 contrôles évoluent, au cours des prélèvements suivant (J28 et 55) vers un niveau comparable à celui mesuré avant le début de l'expérience. Quand on regarde les mesures d'ISS chez les F1, confinés ou non, on

Tableau 2 : Résultats de l'ANOVA 3 effectuée sur les données de l'ISS moyen (Idem tableau 1).

Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	0,000	12,000	0,000	1,287	0,312
2	1,000	0,000	12,000	0,000	2,005	0,182
3	1,000	0,000	12,000	0,000	19,886	0,001
12	2,000	0,000	12,000	0,000	0,834	0,458
13	2,000	0,000	12,000	0,000	2,796	0,101
23	1,000	0,000	12,000	0,000	0,843	0,377
123	2,000	0,000	12,000	0,000	0,198	0,823

Tableau 3 : Résultats partiels (uniquement pour le J-55) du test de Tukey effectué sur l'ISS (Idem tableau 1).

Tukey HSD test; variable ISS (analyse.sta)				
Probabilities for Post Hoc Tests				
INTERACTION: 1 x 2 x 3				
	{9}	{10}	{11}	{12}
	0,117	0,061	0,163	0,072
55 C F1 {9}		0,506	0,737	0,762
55 C F4 {10}	0,506		0,033	1,000
55 NC F1 {11}	0,737	0,033		0,068
55 NC F4 {12}	0,762	1,000	0,068	

observe une globalement diminution de ces valeurs au J7. Lors des prélèvements suivants par contre, on remarque un retour à des niveaux comparables à ceux observés lors du prélèvement effectué avant le début de l'expérience.

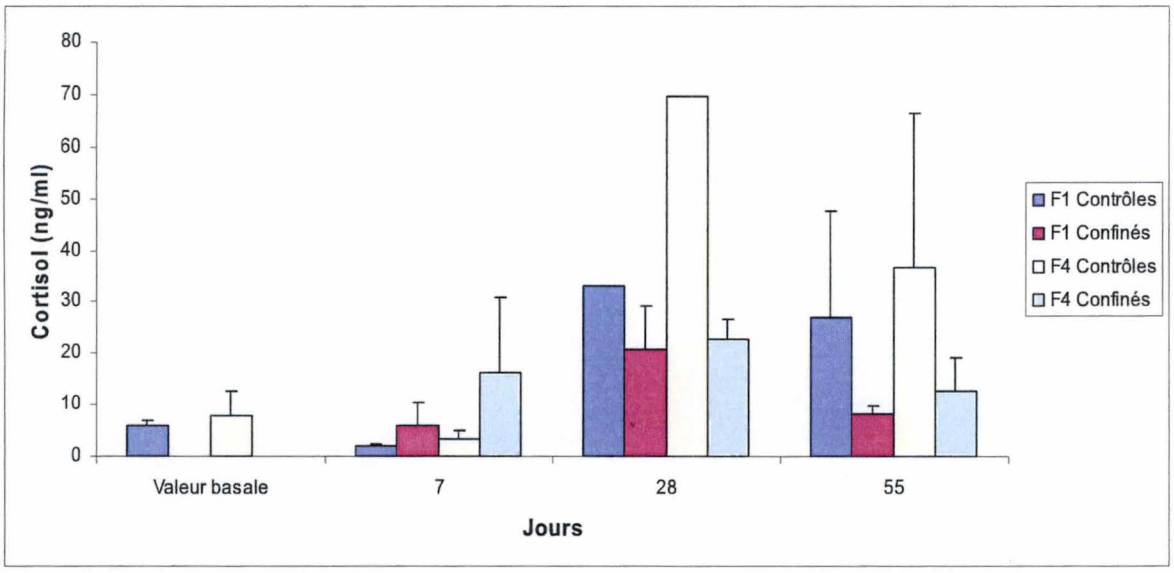
Au J28 et 55, on remarque que l'ISS des poissons confinés, quel que soit leur génération, est plus faible que celui des poissons contrôles non confinés.

Sur le graphique 3, on observe que l'ISS semble des F4 stable au cours du temps, alors que celui des F1 semble varier très fortement lors des différents prélèvements.

L'ANOVA 3 effectuée sur les valeurs moyennes calculées pour l'ISS montre qu'il y a un effet très hautement significatif ($P<0,001$) de la génération (voir tableau 2). Les F1 ayant un ISS significativement plus élevé que celui des F4. Ceci confirme bien ce qu'on observe globalement sur le graphique 3. Le test post-hoc de Tukey effectué en prenant en compte tous les facteurs, révèle une différence significative entre les F1 contrôles et les F4 confinés au J55, aucune autre différence significative n'étant observée (voir tableau 3 et graphique 3).

2. Les indicateurs de stress

2.1. Le cortisol sanguin



Graphique 4 : Evolution du taux cortisol sanguin (ng ml^{-1}) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type).

On remarque que le cortisol est un indicateur très instable et fort variable d'un individu à l'autre. Dans beaucoup de bassins, au moins un poisson a un taux de cortisol sanguin beaucoup plus élevé que la moyenne. Cette forte variabilité individuelle peut camoufler un effet global.

Avant le début de l'expérience, on remarque que les F4 ont un taux de cortisol sérique légèrement supérieur à celui des F1, mais on remarque aussi que l'écart type, chez les F4, est beaucoup plus grand. En effet, les poissons d'un des bassins de F4 avaient une cortisolémie

Tableau 4 : Résultats de l'ANOVA 3 effectuée sur les valeurs moyennes du taux de cortisol sanguin (Idem tableau 1).

Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	1.421,850	10,000	170,364	8,346	0,007
2	1,000	1.035,136	10,000	170,364	6,076	0,033
3	1,000	587,397	10,000	170,364	3,448	0,093
12	2,000	706,109	10,000	170,364	4,145	0,049
13	2,000	82,908	10,000	170,364	0,487	0,629
23	1,000	136,796	10,000	170,364	0,803	0,391
123	2,000	197,272	10,000	170,364	1,158	0,353

Tableau 5 : Résultats du test de Tukey effectué pour le temps sur le taux de cortisol moyen.

Unequal N HSD; variable CORTISOL (analyse sans j-0.sta)			
Probabilities for Post Hoc Tests			
MAIN EFFECT: TEMPS			
	{1}	{2}	{3}
	6,825	36,492	21,032
7 .... {1}		0,007	0,124
28 .... {2}	0,007		0,150
55 .... {3}	0,124	0,150	

Tableau 6 : Résultats du test de Tukey effectué pour voir l'effet combiné du temps et du confinement sur le taux de cortisol moyen (Idem tableau 1).

Unequal N HSD; variable CORTISOL (analyse sans j-0.sta)						
Probabilities for Post Hoc Tests						
INTERACTION: 1 x 2						
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	10,992	2,658	21,701	51,283	10,375	31,688
7 C .... {1}		0,937	0,845	0,090	1,000	0,299
7 NC .... {2}	0,937		0,375	0,034	0,954	0,082
28 C .... {3}	0,845	0,375		0,290	0,815	0,878
28 NC .... {4}	0,090	0,034	0,290		0,084	0,671
55 C .... {5}	1,000	0,954	0,815	0,084		0,274
55 NC .... {6}	0,299	0,082	0,878	0,671	0,274	

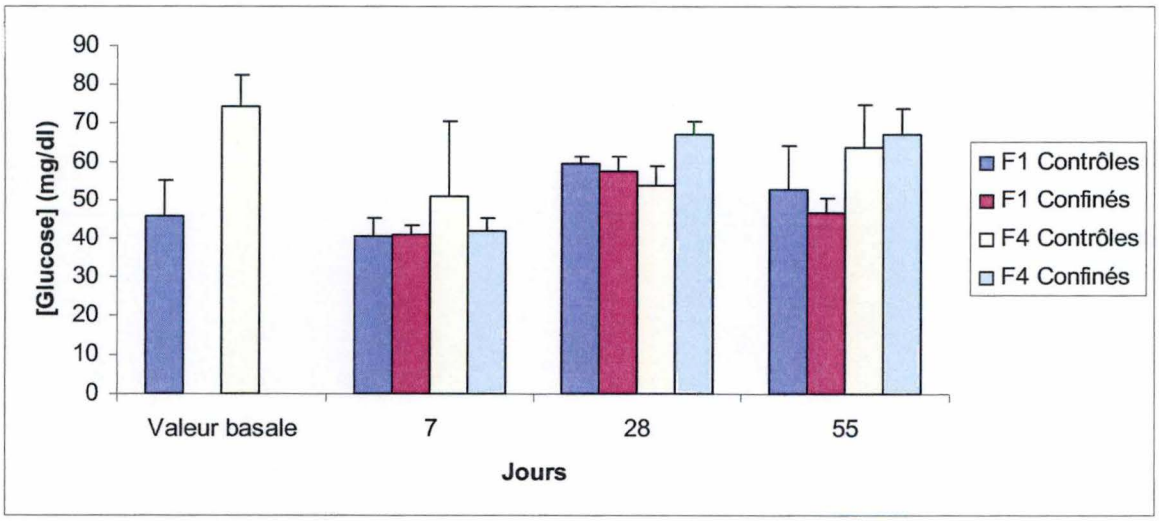
sérique moyenne de 11,20 ± 6,60 ng ml^{-1} contre 4,57 ± 6,19 ng ml^{-1} pour son réplicat, alors que pour les F1, la cortisolémie était de 5,37 ± 5,97 ng ml^{-1} pour le premier réplicat et de 6,44 ± 3,73 ng ml^{-1} pour le deuxième.

Au J7, l'effet du confinement est visible pour les deux générations. Effectivement, on observe que les poissons confinés ont un taux de cortisol supérieur à celui des non confinés. Cette tendance n'est plus observée lors des prélèvements suivants. Au J7, pour les F4 confinés, on observe un grand écart-type. Ceci est dû à une grande différence entre les mesures moyennes des deux bassins. Un des bassins ayant une moyenne de 26,43 ± 13,72 ng ml^{-1} alors que celle de son réplicat est de 6,03 ± 2,85 ng ml^{-1}.

Au J28 et 55, les valeurs de cortisolémie des poissons confinés sont anormalement très élevée, ce qui conduit à voir un effet significatif entre les poissons confinés et non confinés.

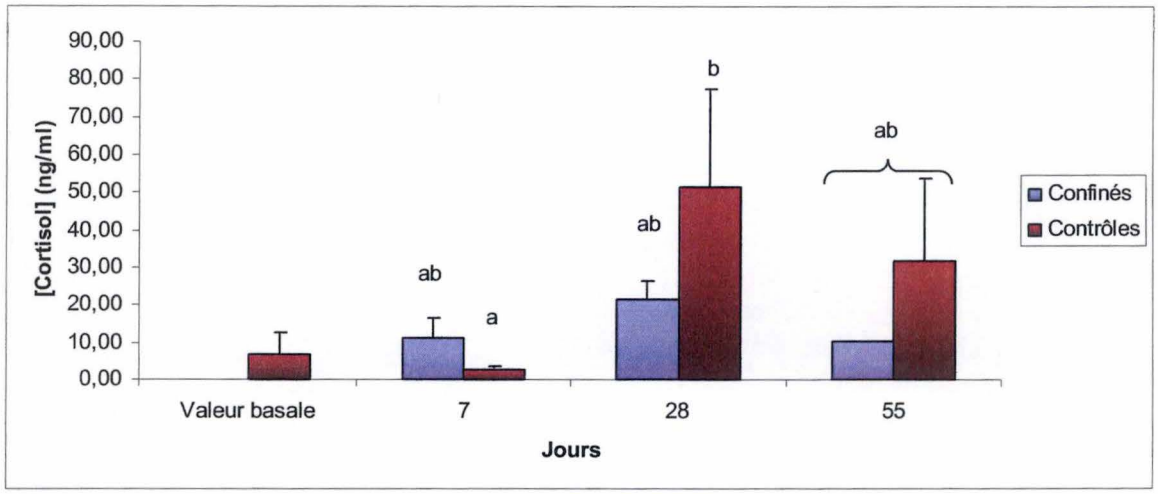
L'ANOVA 3 réalisée sur les mesures du cortisol sanguin révèle un effet significatif du temps, du confinement ainsi qu'un effet croisé entre ces deux mêmes paramètres (voir tableau 4). Le test de Tukey adapté pour un nombre d'échantillons (N) inégal, réalisé pour voir l'effet du temps, montre que ce sont les valeurs des J7 et 28 qui sont significativement différentes ($P<0,05$) entre elles (voir tableau 5). Les valeurs du J7 étant plus basses que celle du J28. Un test post-hoc de Tukey pour N inégal effectué en ne prenant en compte que le temps et le confinement a été fait (voir tableau 6). On remarque que seuls les valeurs de cortisol sanguin des poissons contrôles du J28, sont significativement plus élevées, de celles mesurées chez les poissons contrôles prélevés au J7 (voir graphique 5). L'analyse post-hoc de Tukey pour N inégal effectuée en prenant en compte tous les paramètres ne révèle aucune différence significative entre les différents groupes (voir graphique 4).

2.2. Le glucose sanguin ou glycémie



Graphique 6 : Evolution de la glycémie (mg dl^{-1}) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type).

On remarque que la glycémie est un indicateur de stress beaucoup plus stable que le taux de cortisol sanguin. En effet, les écart-types observés dans le dosage du glucose sont beaucoup



Graphique 5 : Effet au cours des prélèvements du confinement des poissons sur la quantité de cortisol sérique ± un écart-type (Idem graphique 3).

Tableau 7 : Résultats de l'ANOVA 3 réalisée sur les mesures de glycémie moyenne (Idem tableau 1).

Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	596,482	12,000	64,901	9,191	0,004
2	1,000	0,095	12,000	64,901	0,001	0,970
3	1,000	354,682	12,000	64,901	5,465	0,038
12	2,000	51,668	12,000	64,901	0,796	0,474
13	2,000	98,750	12,000	64,901	1,522	0,258
23	1,000	39,506	12,000	64,901	0,609	0,450
123	2,000	84,796	12,000	64,901	1,307	0,307

Tableau 8 : Résultats du test de Tukey réalisé sur les mesures de glycémie moyenne en ne considérant que l'effet temps.

Tukey HSD test; variable GLUCOSE (analyse.sta)			
Probabilities for Post Hoc Tests			
MAIN EFFECT: TEMPS			
	{1}	{2}	{3}
	43,687	59,549	57,532
7 .... {1}		0,005	0,013
28 .... {2}	0,005		0,872
55 .... {3}	0,013	0,872	

moins importants que ceux observés dans le dosage du cortisol. Ceci traduit une variation individuelle plus faible.

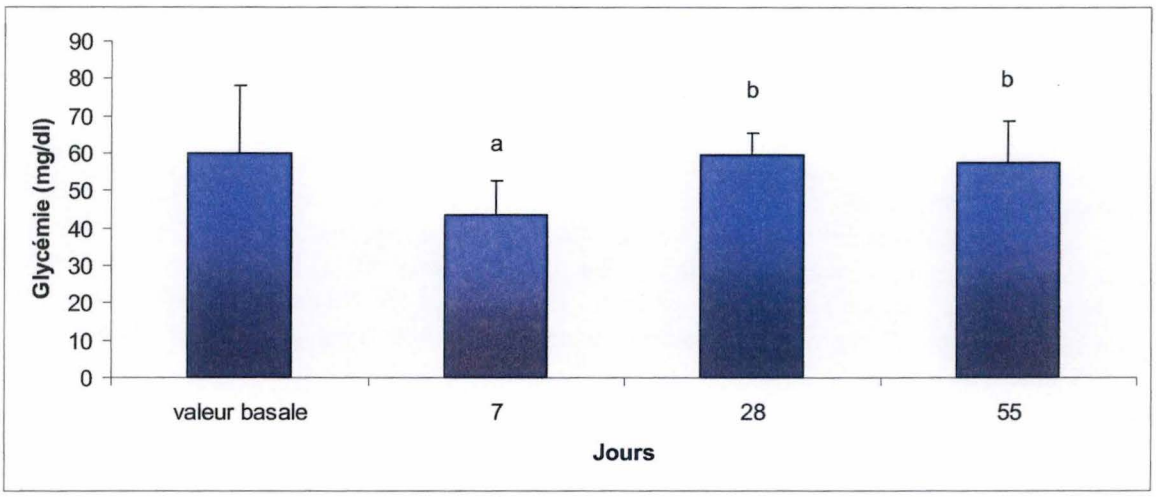
Sur le graphique 6, on observe que la glycémie, quel que soit le traitement, augmente globalement à partir du J7 jusqu'au J55.

Lors des prélèvements initiaux, on remarque que la glycémie des F4 est plus élevée que celle les F1, cette différence n'est toutefois pas significative ($P>0,05$). Par contre, au J7, 28 et 55, la glycémie des F1 et des F4 sont relativement proches. La différence observée entre les F1 et les F4 avant le début de l'expérience n'est donc plus observée si ce n'est une légère tendance au J55.

Quand on regarde les F4, à partir du J7, on se rend compte que la glycémie augmente légèrement jusqu'au J55. Chez les F1, elle augmente jusqu'au J28 et diminue ensuite au J55.

En ce qui concerne les F1 confinés, on peut voir que la glycémie est la plus élevée au J28. Elle est en effet de $57,6 \pm 3,9$ mg dl^{-1} contre $41,0 \pm 2,2$ mg dl^{-1} au J7 et $46,6 \pm 3,9$ mg dl^{-1} au J55. Si on regarde les valeurs des F1 confinés et non confinés au J28 et 55, nous dirions que le confinement semble induire une diminution de la glycémie. Chez les poissons F4 par contre, il semble que le confinement a pour effet d'augmenter la glycémie au J28 et dans une moindre mesure au J55.

L'ANOVA 3 révèle deux effets pour les mesures de la glycémie : tout d'abord un effet du temps et enfin un effet de la génération (voir tableau 7). Un test post-hoc de Tukey incluant les trois facteurs a donc été effectué, mais sans révéler de différences significatives. Par contre, le test post-hoc de Tukey effectué pour le facteur génération, met en évidence que la glycémie moyenne de tous les F1 de l'expérience (49,74 mg dl^{-1}) est significativement plus faible que celle des F4 (57,43 mg dl^{-1}). Un autre test de Tukey effectué pour voir uniquement l'effet du facteur temps, permet de mettre en évidence que les mesures de glycémie effectuées sur tous les poissons au J7 sont significativement inférieures à celles obtenues pour tous les poissons au J28 et 55 (voir tableau 8 et graphique 7).



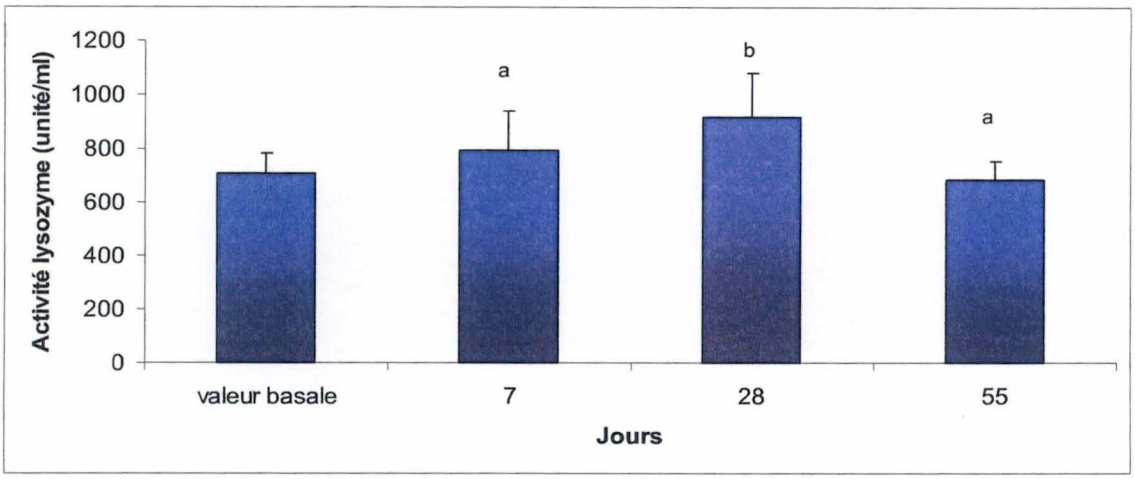
Graphique 7 : Evolution de la glycémie moyenne de tous les poissons ± un écart-type au cours des prélèvements (Idem graphique 3).

Tableau 9 : Résultats de l'ANOVA 3 réalisée sur les mesures d'activité du lysozyme sérique moyenne (Idem tableau 1).

Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	105.463,844	12,000	8.338,621	12,648	0,001
2	1,000	8.261,088	12,000	8.338,621	0,991	0,339
3	1,000	9.608,835	12,000	8.338,621	1,152	0,304
12	2,000	81.000,438	12,000	8.338,621	9,714	0,003
13	2,000	14.929,894	12,000	8.338,621	1,790	0,209
23	1,000	20.775,275	12,000	8.338,621	2,491	0,140
123	2,000	16.910,475	12,000	8.338,621	2,028	0,174

Tableau 10 : Résultats du test post-hoc de Tukey pour le facteur temps sur les données d'activités moyennes du lysozyme sérique.

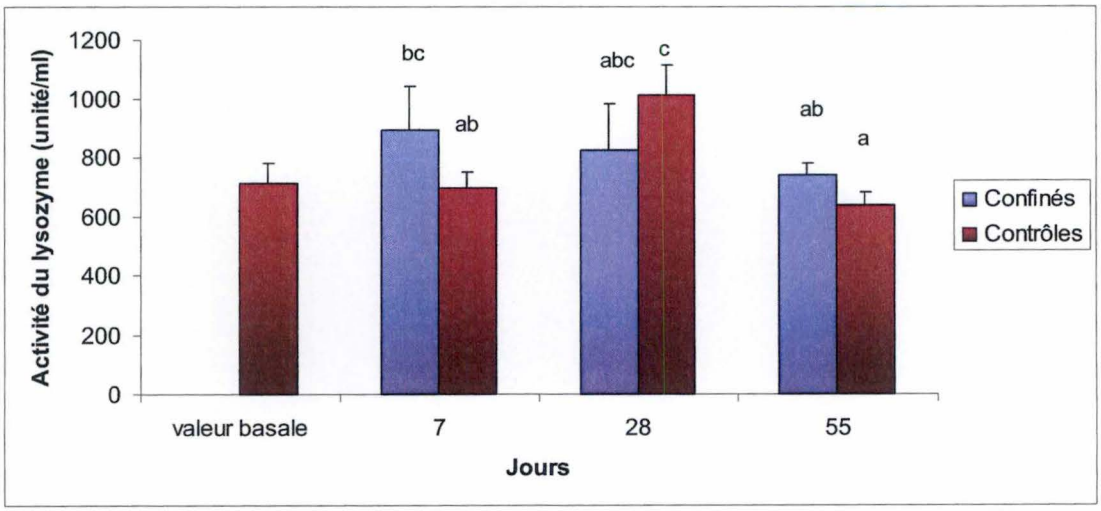
Tukey HSD test; variable LYSOZYME (analyse sans j-0.sta)			
Probabilities for Post Hoc Tests			
MAIN EFFECT: TEMPS			
	{1}	{2}	{3}
	795,608	917,524	688,039
7 .... {1}		0,050	0,086
28 .... {2}	0,050		0,001
55 .... {3}	0,086	0,001	



Graphique 9 : Evolution de l'activité moyenne du lysozyme sérique de tous les poissons ± un écart-type au cours du temps (Idem graphique 3).

Tableau 11 : Résultats de l'analyse post-hoc de Tukey pour l'effet combiné des facteurs temps et confinements sur les données d'activités moyennes du lysozyme sérique (Idem tableau 1).

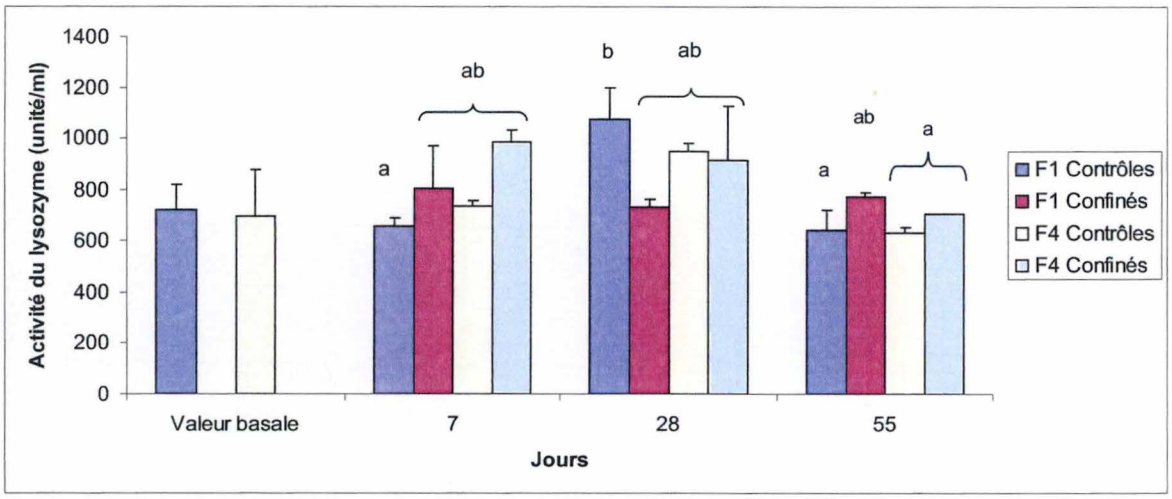
Tukey HSD test; variable LYSOZYME (analyse sans j-0.sta)						
Probabilities for Post Hoc Tests						
INTERACTION: 1 x 2						
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	894,246	696,971	823,131	1.011,917	739,453	636,625
7 C .... {1}		0,083	0,872	0,488	0,231	0,017
7 NC .... {2}	0,083		0,419	0,004	0,984	0,930
28 C .... {3}	0,872	0,419		0,103	0,782	0,109
28 NC .... {4}	0,488	0,004	0,103		0,012	0,001
55 C .... {5}	0,231	0,984	0,782	0,012		0,618
55 NC .... {6}	0,017	0,930	0,109	0,001	0,618	



Graphique 10 : Evolution de l'activité du lysozyme sérique ± un écart-type au cours du temps en fonction du confinement (Idem graphique 3).

3. Les indicateurs du système immunitaire

3.1. Le lysozyme



Graphique 8 : Evolution de l'activité du lysozyme sérique (unité ml^{-1}) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type) (Pour la signification des lettre : idem graphique 3).

Avant le début de l'expérience, les valeurs basales moyennes des F1 et F4 sont assez proches : 721,7 ± 98,5 unités ml^{-1} pour les F1 et 697,4 ± 179,2 unités ml^{-1}.

Au J7, pour un même niveau de confinement, on remarque que les F4 ont une activité du lysozyme supérieure à celle des F1. A part au J28, où un problème est survenu dans les bassins contrôles, ce qui a probablement perturbé les poissons s'y trouvant (cf. dosage cortisol), on observe que les poissons confinés ont toujours une activité moyenne du lysozyme sérique supérieure à celle des poissons contrôles.

Aux J7 et 28, on observe une augmentation globale de l'activité du lysozyme sérique par rapport aux valeurs mesurées avant le début de l'expérience (709,5 unités ml^{-1} contre respectivement 795,6 et 917,5 unités ml^{-1} pour les J7 et 28). Au J55 par contre, on observe une légère diminution de cette activité.

L'ANOVA 3 réalisée sur les données du lysozyme sérique révèle qu'il y a un effet au cours du temps et un effet croisé entre celui-ci et le confinement (voir tableau 9). Une analyse post-hoc de Tukey sur le facteur temps, révèle que les données d'activité de lysozyme mesurées au J28, sont significativement plus élevées que celles mesurées aux autres jours de prélèvements (voir tableau 10 et graphique 9). Un test post-hoc de Tukey réalisé sur l'effet croisé entre le temps et le confinement montre que les poissons contrôles non confinés du J28, ont une activité du lysozyme sérique très significativement ($P<0,01$) plus élevée celle mesurée chez les contrôles du J7 et 55 ainsi que de celle des confinés du J55. De plus, les perches confinées du J7 ont une activité de lysozyme sérique significativement plus importante que celle des non confinées du J55 (voir tableau 11 et graphique 10). Un test de Tukey sur l'ensemble des données révèle qu'il y a de grandes différences dans l'activité du lysozyme entre les classes de poissons aux différents

Tableau 12 : Résultats partiels du test de Tukey global réalisé sur les données d'activités moyennes du lysozyme sérique (Idem tableau 1).

Tukey HSD test; variable LYSOZYME (analyse.sta)						
Probabilities for Post Hoc Tests						
INTERACTION: 1 x 2 x 3						
	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
	1.075,833	948,000	773,500	705,406	641,250	632,000
7 C F1 {1}	0,218	0,881	1,000	0,991	0,811	0,761
7 C F4 {2}	0,995	1,000	0,504	0,195	0,067	0,058
7 NC F1 {3}	0,019	0,166	0,967	1,000	1,000	1,000
7 NC F4 {4}	0,076	0,517	1,000	1,000	0,992	0,984
28 C F1 {5}	0,070	0,492	1,000	1,000	0,994	0,988
28 C F4 {6}	0,802	1,000	0,905	0,534	0,224	0,194
28 NC F1 {7}		0,943	0,138	0,044	0,014	0,012
28 NC F4 {8}	0,943		0,736	0,345	0,129	0,111
55 C F1 {9}	0,138	0,736		1,000	0,930	0,898
55 C F4 {10}	0,044	0,345	1,000		1,000	0,999
55 NC F1 {11}	0,014	0,129	0,930	1,000		1,000
55 NC F4 {12}	0,012	0,111	0,898	0,999	1,000	

Tableau 13 : Résultats de l'ANOVA 3 réalisée avec les données de la production moyenne de radicaux libres par les rates des perches (Idem tableau 1).

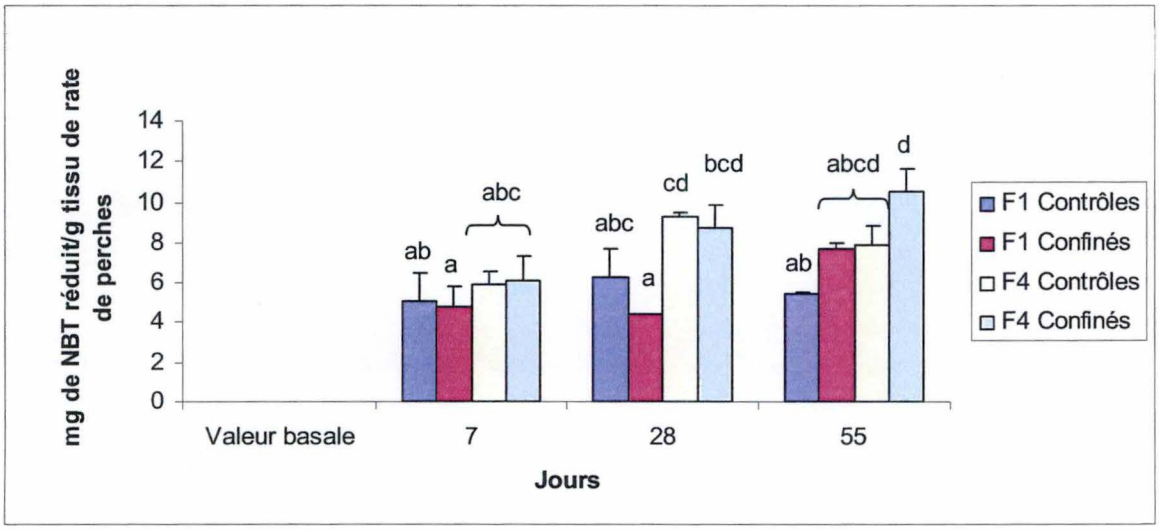
Summary of all Effects; design: (analyse sans j-0.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	12,407	12,000	0,870	14,256	0,001
2	1,000	0,793	12,000	0,870	0,911	0,359
3	1,000	36,414	12,000	0,870	41,841	0,000
12	2,000	7,151	12,000	0,870	8,216	0,006
13	2,000	3,234	12,000	0,870	3,716	0,055
23	1,000	0,811	12,000	0,870	0,932	0,353
123	2,000	0,111	12,000	0,870	0,127	0,882

Tableau 14 : Résultats du test de Tukey effectué uniquement en fonction du facteur temps sur les données de la production moyenne de radicaux libres par les rates.

Tukey HSD test; variable NBT (analyse sans j-0.sta)			
Probabilities for Post Hoc Tests			
MAIN EFFECT: TEMPS			
	{1}	{2}	{3}
	5,476	7,189	7,899
7 .... {1}		0,008	0,001
28 .... {2}	0,008		0,315
55 .... {3}	0,001	0,315	

prélèvements (voir tableau 12 et graphique 8). En effet, les poissons F1 contrôles du J28 ont une activité du lysozyme sérique significativement plus élevée que celle de leurs homologues des J7 et 55 et de celle des F4, contrôles ou confinés, du J55.

3.2. La production de radicaux superoxydes au niveau de la rate

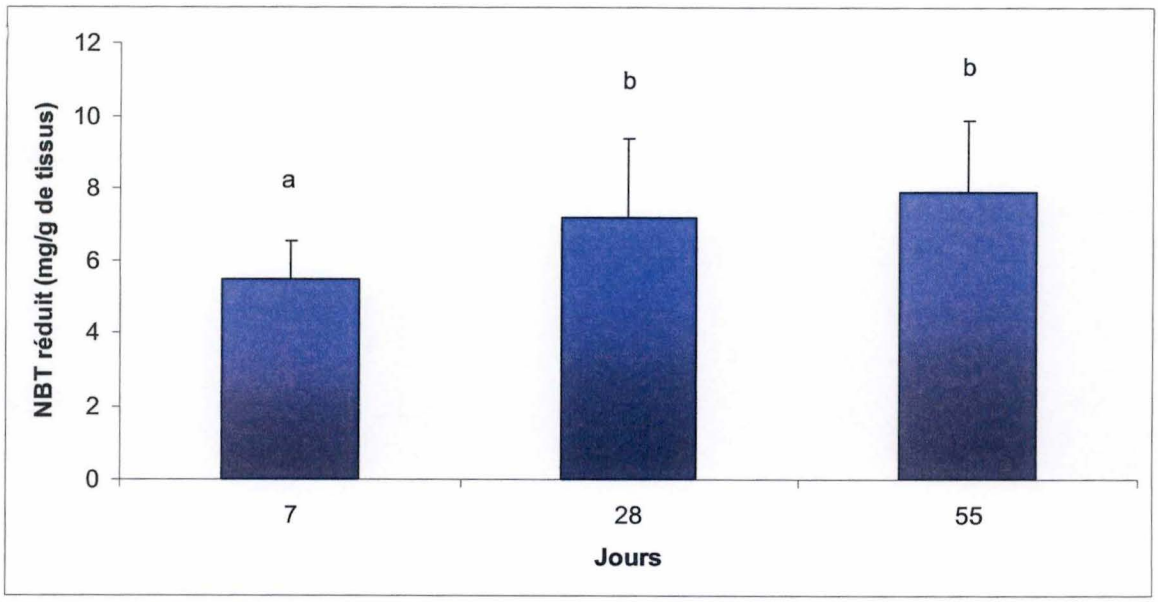


Graphique 11 : Evolution de la production moyenne de radicaux superoxydes par les macrophages de la rate (mg de NBT réduit g^{-1} de tissu frais) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type) (Pour la signification des lettre : idem graphique 3).

Comme on peut le voir sur le graphique, aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne la production de radicaux superoxydes avant le début de l'expérience.

Les quantités de NBT réduit par gramme de tissu varient entre minimum 4,41 ± 0,049 mg g^{-1} de tissu et maximum 10,55 ± 1,07 mg g^{-1} de tissu.

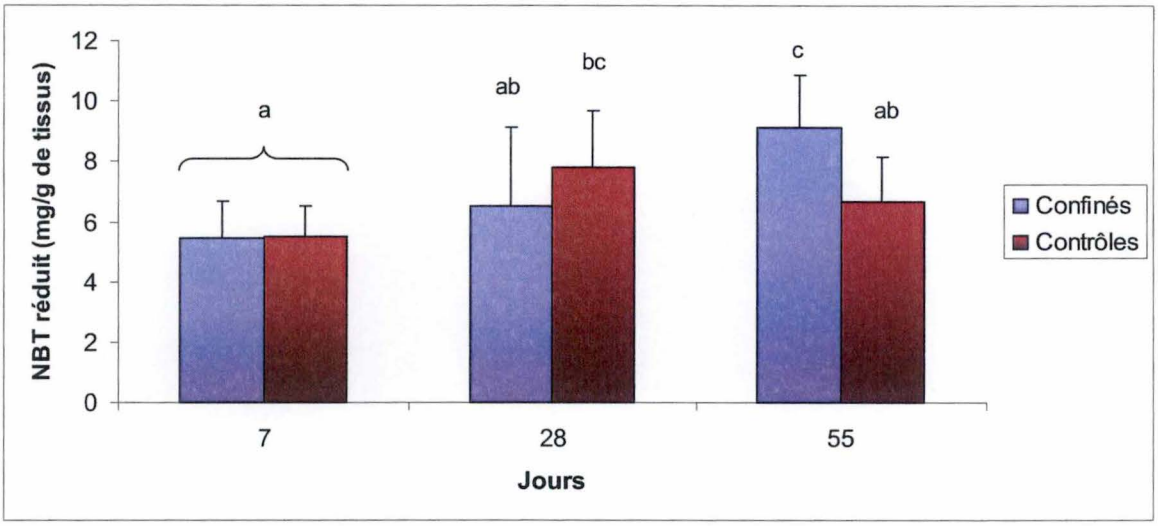
On remarque que les rates des poissons F4 ont toujours une production de radicaux libres supérieure à celle des F1. Cet effet au cours de la génération est d'ailleurs confirmé par l'ANOVA 3 qui révèle un effet très hautement significatif ($P<0,001$) de la génération (voir tableau 13). On observe aussi que la production de radicaux libres augmente au fur et à mesure des prélèvements. Les valeurs de production de radicaux libres du J55 étant bien plus élevées, excepté pour les F1 contrôles, que celles du J7. Cette observation est d'ailleurs confirmée par l'ANOVA 3 qui révèle un effet très hautement significatif ($P<0,001$) du facteur temps. Le test post-hoc de Tukey cherchant à voir l'effet au cours du temps confirme bien le fait que les valeurs mesurées au J7 sont très ($P<0,01$), voir très hautement ($P<0,001$), significativement plus petites de celles mesurées au J28 et 55 (voir tableau 14 et graphique 12). Sans les valeurs avant le début de l'expérience, on ne peut malheureusement pas dire si cet effet d'augmentation de la production de radicaux libres par les macrophages des rates au J28 et 55, est un retour à des valeurs de base suite à une diminution de cette production au J7, ou si c'est uniquement une augmentation de la



Graphique 12 : Evolution de la production moyenne de radicaux superoxydes dans la rate de tous les poissons ± un écart-type au cours des prélèvements (Idem graphique 3).

Tableau 15 : Résultats du test post-hoc de Tukey permettant de voir l'effet combiné entre le temps et le confinement pour les données de la production moyenne de radicaux libres par les rates des perches (Idem tableau 1).

Tukey HSD test; variable NBT (analyse sans j-0.sta)						
Probabilities for Post Hoc Tests						
INTERACTION: 1 x 2						
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	5,440	5,513	6,553	7,824	9,116	6,682
7 C .... {1}		1,000	0,564	0,033	0,001	0,456
7 NC .... {2}	1,000		0,627	0,039	0,002	0,515
28 C .... {3}	0,564	0,627		0,432	0,021	1,000
28 NC .... {4}	0,033	0,039	0,432		0,416	0,538
55 C .... {5}	0,001	0,002	0,021	0,416		0,029
55 NC .... {6}	0,456	0,515	1,000	0,538	0,029	



Graphique 13 : Evolution de la production moyenne de radicaux superoxydes dans la rate ± un écart-type au cours des prélèvements et en fonction du confinement (Idem graphique 3).

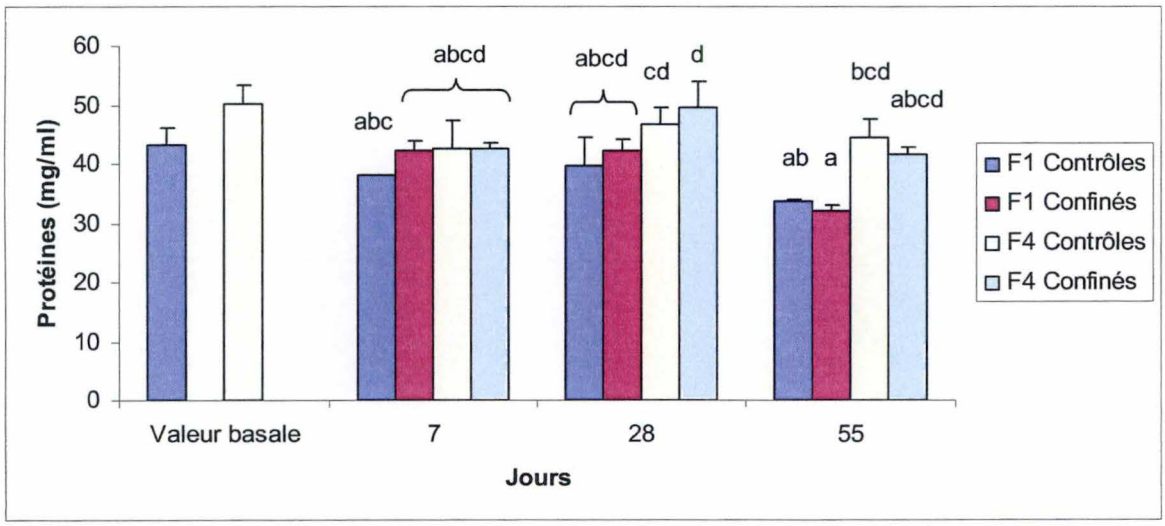
Tableau 16 : Résultats partiels du test de Tukey réalisé avec les 3 facteurs sur les données de la production moyenne de radicaux libres par les rates (Idem tableau 1).

Tukey HSD test; variable NBT (analyse sans j-0.sta)							
Probabilities for Post Hoc Tests							
INTERACTION: 1 x 2 x 3							
	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
	8,692	6,324	9,325	7,678	10,554	5,484	7,880
7 C F1 {1}	0,035	0,854	0,012	0,185	0,002	0,999	0,134
7 C F4 {2}	0,298	1,000	0,113	0,847	0,014	1,000	0,743
7 NC F1 {3}	0,057	0,955	0,020	0,287	0,003	1,000	0,213
7 NC F4 {4}	0,240	1,000	0,088	0,771	0,011	1,000	0,654
28 C F1 {5}	0,019	0,661	0,007	0,104	0,001	0,984	0,075
28 C F4 {6}		0,399	1,000	0,989	0,690	0,114	0,998
28 NC F1 {7}	0,399		0,159	0,929	0,021	0,998	0,853
28 NC F4 {8}	1,000	0,159		0,809	0,960	0,040	0,899
55 C F1 {9}	0,989	0,929	0,809		0,193	0,493	1,000
55 C F4 {10}	0,690	0,021	0,960	0,193		0,005	0,262
55 NC F1 {11}	0,114	0,998	0,040	0,493	0,005		0,384
55 NC F4 {12}	0,998	0,853	0,899	1,000	0,262	0,384	

production au J28 et 55. L'ANOVA 3 met aussi en évidence une interaction entre le temps et le confinement. L'analyse post-hoc de Tukey effectuée pour ces deux facteurs en même temps, révèle que les poissons, confinés ou non, du J7, ont une production de radicaux libres significativement inférieure à celle des perches confinées du J55 ainsi que des contrôles du J28. Enfin, les poissons confinés du J55, en plus d'avoir une production de radicaux libres supérieure à celle des poissons du J7, sont différents, pour ce même paramètre, de toutes les classes de poissons, excepté les non confinés du J28 (voir tableau 15 et graphique 13).

Nous avons aussi effectué un test post-hoc en prenant en compte les trois facteurs (voir tableau 16 et graphique 11). Il en ressort que les F4 confinés du J55, ont une production de radicaux libres significativement (P<0,05) voir très significativement (P<0,01) plus grande, que celle de tous les autres poissons, excepté les F4 confinés ou non du J28, les F4 contrôles du J55 et les F1 confinés du J55. En plus d'avoir une production de radicaux libres différente des F4 confinés du J55, les F1 confinés des J7 et 28, ont une production de ces mêmes radicaux significativement plus petite, que celle des F4 confinés ou non du J28. Enfin, les F4 non confinés du J28, ont une production de radicaux superoxydes significativement plus élevée que celle des F1 non confinés des J7 et 55.

3.3. Les protéines sériques



Graphique 14 : Evolution de la concentration en protéines sériques (mg ml^{-1}) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type) (Pour la signification des lettre : idem graphique 3).

Avant le début de l'expérience, la quantité de protéine sériques, aussi bien chez les F1 que chez les F4, semble être légèrement supérieure aux quantités de protéines mesurées lors des prélèvements ultérieurs.

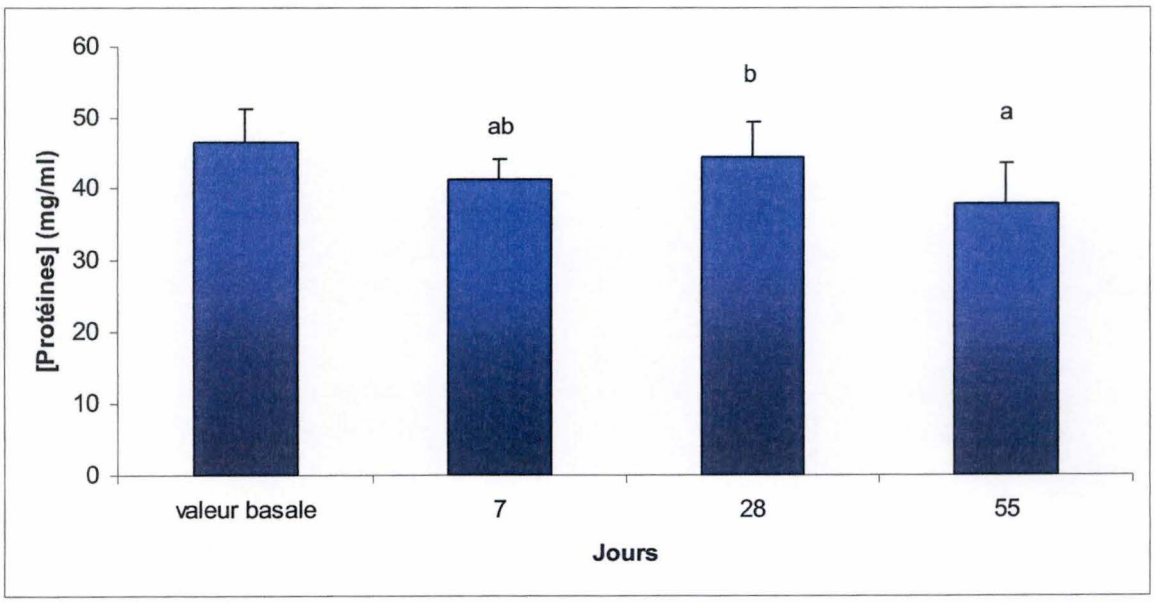
On remarque que les F4 ont, dans tous les prélèvements excepté au J7, où elles sont au même niveau (± 42 mg ml^{-1}), plus de protéines sériques que les F1 (moyenne de tous les poissons de tous les prélèvements : 37,95 mg ml^{-1} pour les F1 et 44,53 mg ml^{-1} pour les F4). Cette différence est déjà observable, avant le début de l'expérience, même si elle n'est pas significative.

Tableau 17 : Résultats de l'ANOVA 3 effectuée sur les mesures de quantité moyenne en protéines sériques (Idem tableau 1).

Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	85,045	12,000	8,077	10,529	0,002
2	1,000	4,237	12,000	8,077	0,525	0,483
3	1,000	259,960	12,000	8,077	32,184	0,000
12	2,000	14,588	12,000	8,077	1,806	0,206
13	2,000	31,130	12,000	8,077	3,854	0,051
23	1,000	5,617	12,000	8,077	0,695	0,421
123	2,000	2,238	12,000	8,077	0,277	0,763

Tableau 18 : Résultats du test de Tukey effectué sur les données de quantité de protéines sériques pour le facteur temps.

Tukey HSD test; variable PROT (analyse sans j-0.sta)			
Probabilities for Post Hoc Tests			
MAIN EFFECT: TEMPS			
	{1}	{2}	{3}
	41,303	44,475	37,955
7 .... {1}		0,106	0,086
28 .... {2}	0,106		0,002
55 .... {3}	0,086	0,002	

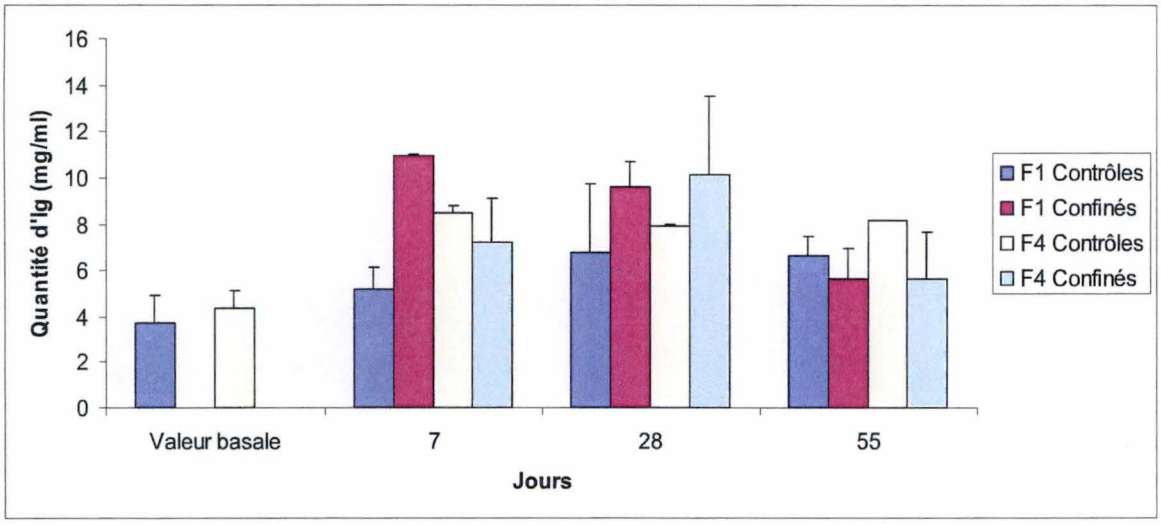


Graphique 15 : Evolution de la quantité moyenne de protéine sérique de tous les poissons ± un écart-type au cours du temps (Idem graphique 3).

Les quantités de protéines sériques observées dans notre expérience varient entre minimum 32,16 ± 0,77 mg ml^{-1} pour les F1 confinés du J55 et maximum 50,09 ± 3,08 mg ml^{-1} pour les F4 contrôles avant le début de l'expérience. Au J7 et 28, les poissons confinés ont une quantité de protéines sériques moyenne supérieure à celle des leurs homologues non confinés. Cette tendance s'inverse au J55, où les poissons confinés ont moins de protéines que les non confinés.

L'ANOVA 3 effectuée sur ces données révèle un effet au cours du temps et de la génération (voir tableau 17). Un test de Tukey pour le temps a donc été fait. Il en ressort que ce sont les quantités de protéines sériques des poissons prélevés au J28 et au J55 qui sont très significativement ($P<0,01$) différentes entre elles. Les poissons du J28 ont une quantité de protéines sériques de 44,47 mg ml^{-1} alors que celle des poissons du J55 est de 37,95 mg ml^{-1}. Les poissons du J7 n'étant pas différents en terme de quantité de protéines sériques par rapport aux deux autres (voir tableau 18 et graphique 15). Un test de Tukey prenant en compte tous les facteurs a été effectué (voir tableau 19 et graphique 14). On y remarque que les poissons du J7 ne sont significativement différents d'aucun des autres pour ce paramètre, si ce n'est une valeur significativement supérieure des F4 confinés du J28 comparé à celle des F1 contrôles du J7. De plus, les F4 confinés ou non du J28 ont significativement ($P<0,05$) ou très significativement ($P<0,01$) plus de protéines sériques que les F1, confinés ou non, du J55. Enfin, au J55, les F1 confinés ont significativement moins de protéines sériques que les F4 non confinés.

3.4. Les immunoglobulines (Ig) totales



Graphique 16 : Evolution de la quantité moyenne d'Ig sériques (mg ml^{-1}) au cours du temps en fonction du niveau de domestication et de confinement (moyenne ± un écart-type).

On remarque que la quantité d'Ig est beaucoup plus faible chez les poissons prélevés juste avant le début de l'expérience. La quantité d'Ig varie très fort en fonction des prélèvements. Par rapport à la quantité de protéines, sur toutes les données de l'expérience, les Ig représentent en moyenne 22,24 ± 14,73 % de la quantité de protéines.

Les poissons F1 avant le début de l'expérience ont une quantité d'Ig de 3,73 ± 1,21 mg ml^{-1} alors que les F1 confinés du J7 ont 10,92 ± 0,07 mg ml^{-1} d'Ig dans leur sérum. Cela signifie,

Tableau 19 : Résultats partiels du test de Tukey en fonction de tous facteurs effectués sur les données de quantité de protéines sériques (Idem tableau 1).

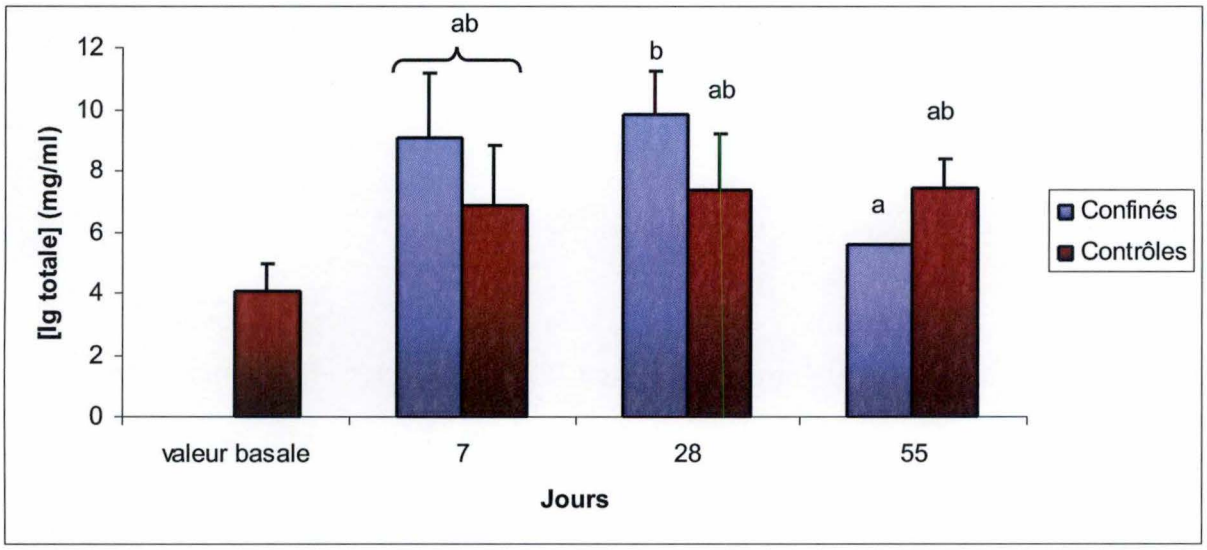
Tukey HSD test; variable PROT (analyse.sta)							
Probabilities for Post Hoc Tests							
INTERACTION: 1 x 2 x 3							
	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
	49,397	39,566	46,809	32,159	41,480	33,604	44,577
7 C F1 {1}	0,416	0,996	0,883	0,094	1,000	0,202	0,999
7 C F4 {2}	0,461	0,992	0,914	0,082	1,000	0,177	1,000
7 NC F1 {3}	0,046	1,000	0,187	0,661	0,974	0,902	0,509
7 NC F4 {4}	0,438	0,994	0,899	0,088	1,000	0,189	0,999
28 C F1 {5}	0,390	0,998	0,862	0,103	1,000	0,218	0,998
28 C F4 {6}		0,111	0,997	0,002	0,292	0,004	0,841
28 NC F1 {7}	0,111		0,394	0,367	1,000	0,633	0,810
28 NC F4 {8}	0,997	0,394		0,008	0,755	0,017	0,999
55 C F1 {9}	0,002	0,367	0,008		0,145	1,000	0,027
55 C F4 {10}	0,292	1,000	0,755	0,145		0,297	0,989
55 NC F1 {11}	0,004	0,633	0,017	1,000	0,297		0,059
55 NC F4 {12}	0,841	0,810	0,999	0,027	0,989	0,059	

Tableau 20 : Résultats de l'ANOVA 3 effectuée sur les données de quantité de d'Ig totale mesurée dans le sérum (Idem tableau 1).

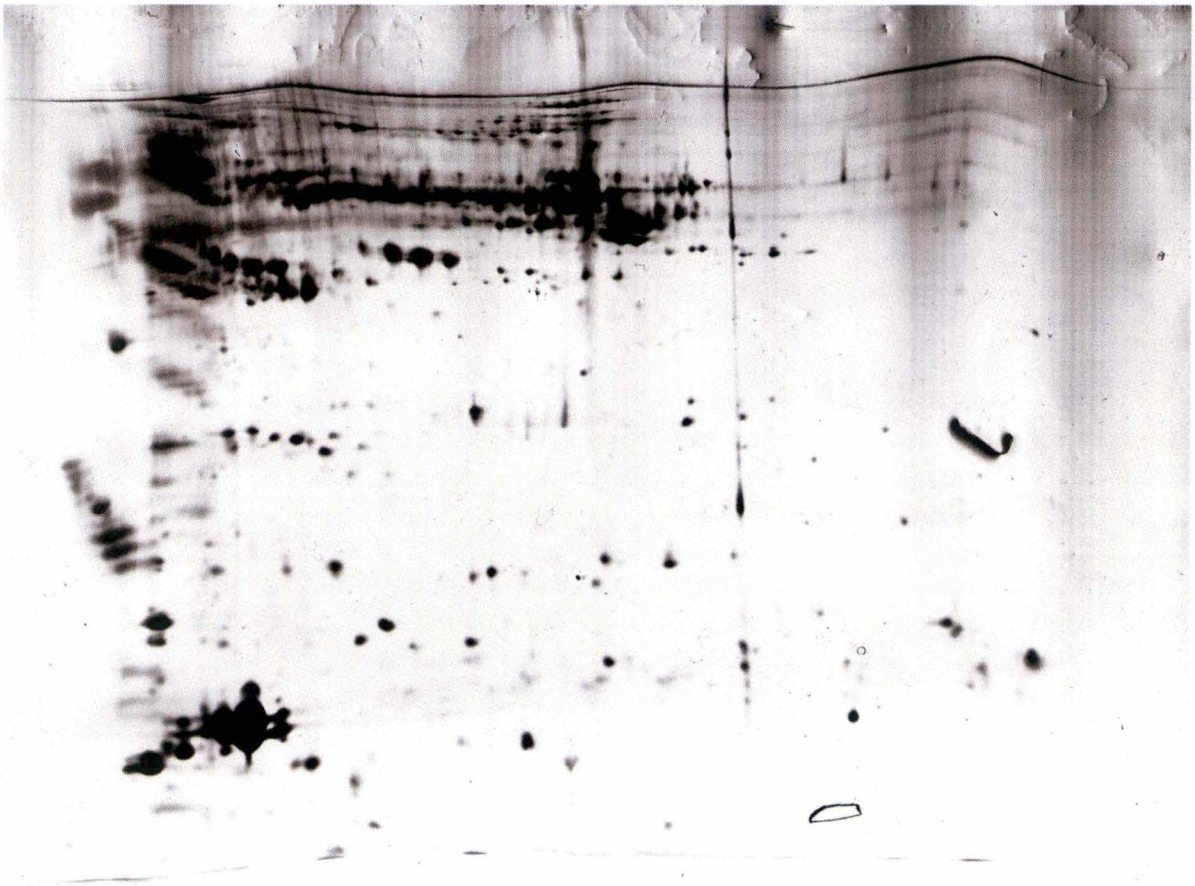
Summary of all Effects; design: (analyse.sta)						
1-TEMPS, 2-CONF, 3-GEN						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2,000	9,084	12,000	2,775	3,274	0,073
2	1,000	5,744	12,000	2,775	2,070	0,176
3	1,000	1,270	12,000	2,775	0,458	0,512
12	2,000	11,623	12,000	2,775	4,189	0,042
13	2,000	0,630	12,000	2,775	0,227	0,800
23	1,000	14,148	12,000	2,775	5,099	0,043
123	2,000	5,964	12,000	2,775	2,149	0,159

Tableau 21 : Résultats du test de Tukey effectuée pour voir l'interaction des facteurs temps et confinement sur les mesures d'Ig totales sériques (Idem tableau 1).

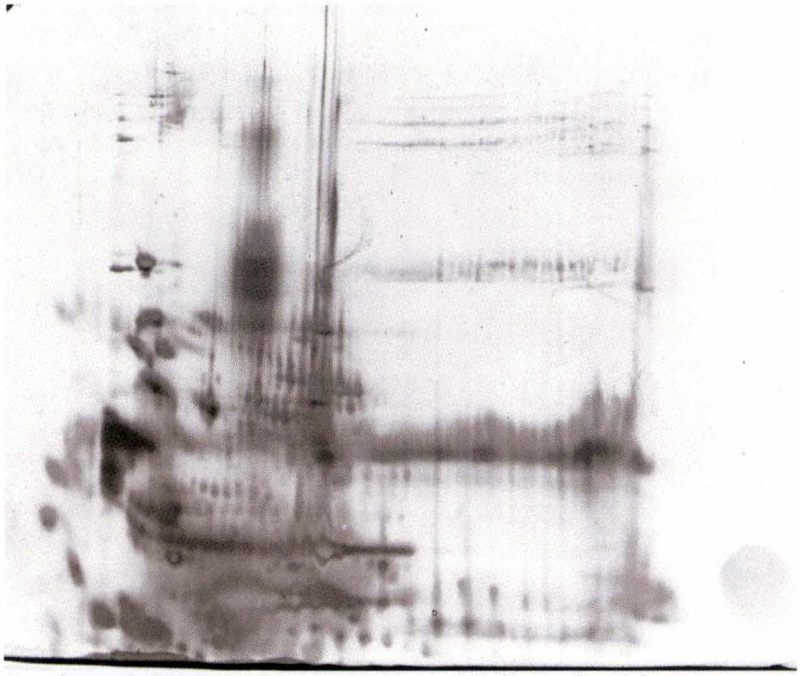
Tukey HSD test; variable IG_TOT (analyse sans j-0.sta)						
Probabilities for Post Hoc Tests						
INTERACTION: 1 x 2						
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	9,066	6,832	9,847	7,344	5,613	7,414
7 C .... {1}		0,448	0,983	0,692	0,101	0,725
7 NC .... {2}	0,448		0,182	0,998	0,897	0,996
28 C .... {3}	0,983	0,182		0,337	0,034	0,364
28 NC .... {4}	0,692	0,998	0,337		0,688	1,000
55 C .... {5}	0,101	0,897	0,034	0,688		0,654
55 NC .... {6}	0,725	0,996	0,364	1,000	0,654	



Graphique 17 : Evolution de la quantité moyenne d'Ig sérique ± un écart-type au cours du temps et en fonction du confinement (Idem graphique 3).



Gel 1 : Gel protéomique (pH entre 3 et 11 avec 12,5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) de test effectué sur du sérum de perches.



Gel 2 : Gel protéomique (pH entre 3 et 11 avec 5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) de test effectué sur du sérum de perches.

qu'en 7 jours, la quantité d'Ig sériques a presque triplé chez ces poissons alors que pour le même laps de temps la quantité de protéines est restée stable : 43,02 ± 3,02 mg ml^{-1} juste avant le début de l'expérience et 42,28 ± 1,51 mg ml^{-1} au J7 pour les poissons F1 confinés.

Globalement, pour tous les confinements et toutes les générations, excepté les F1 confinés dont la concentration d'Ig sériques ne fait que diminuer à partir des prélèvements du J7, on observe que la quantité d'Ig a augmenté après la mise en charge des poissons jusqu'au J28, puis a légèrement diminué au J55.

Au J28, on remarque bien que les perches confinées ont plus d'Ig que leurs homologues non confinées. Cette tendance est par contre inversée au J55. Au J7, aucune tendance ne peut être tirée du fait que les F1 confinés ont plus d'Ig que leurs homologues contrôles et que les F4 confinés ont par contre moins d'Ig que leurs homologues non confinés.

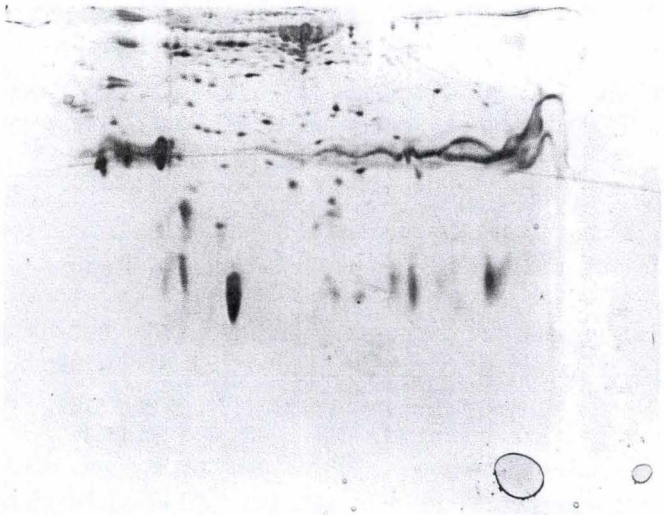
L'ANOVA 3 réalisée sur les données d'Ig sériques totale révèle deux effets. Tout d'abord, un effet combiné entre le temps et le confinement et enfin un effet combiné du confinement et de la génération (voir tableau 20). Trois tests post-hoc de Tukey ont donc été réalisés. Le test tenant compte des trois facteurs (temps, confinement et génération) ainsi que celui visant à montrer la différence en fonction de la génération et du confinement, n'ont révélé aucune différence significative. Par contre, le test post-hoc de Tukey réalisé en tenant compte du temps et du confinement montre que les perches confinées du J55 ont une quantité d'Ig sériques moyenne significativement plus faible que celle des confinées du J28 (voir tableau 21 et graphique 17).

4. Approche préliminaire en protéomique

Nous allons tout d'abord présenter les gels de mise au point. Nous allons ensuite expliquer dans quelles conditions les gels analytiques ont été réalisés et présentés des images de ceux-ci. Ensuite, nous allons décrire quelques différences qui ont été observées entre les différentes générations et les différents confinements. Malheureusement, le temps imparti à la réalisation de cette étude ne permettait pas de poursuivre cette approche protéomique par une analyse statistique sur les différences d'expression des protéines entre les différentes classes, ni même par une analyse de la nature des protéines en spectrométrie de masse ou par une confirmation de celle-ci par western blot. Nous parlerons donc des protéines en terme de spot sans savoir si elles interviennent d'une quelconque façon dans l'immunité ou dans la réponse générale au stress des poissons.

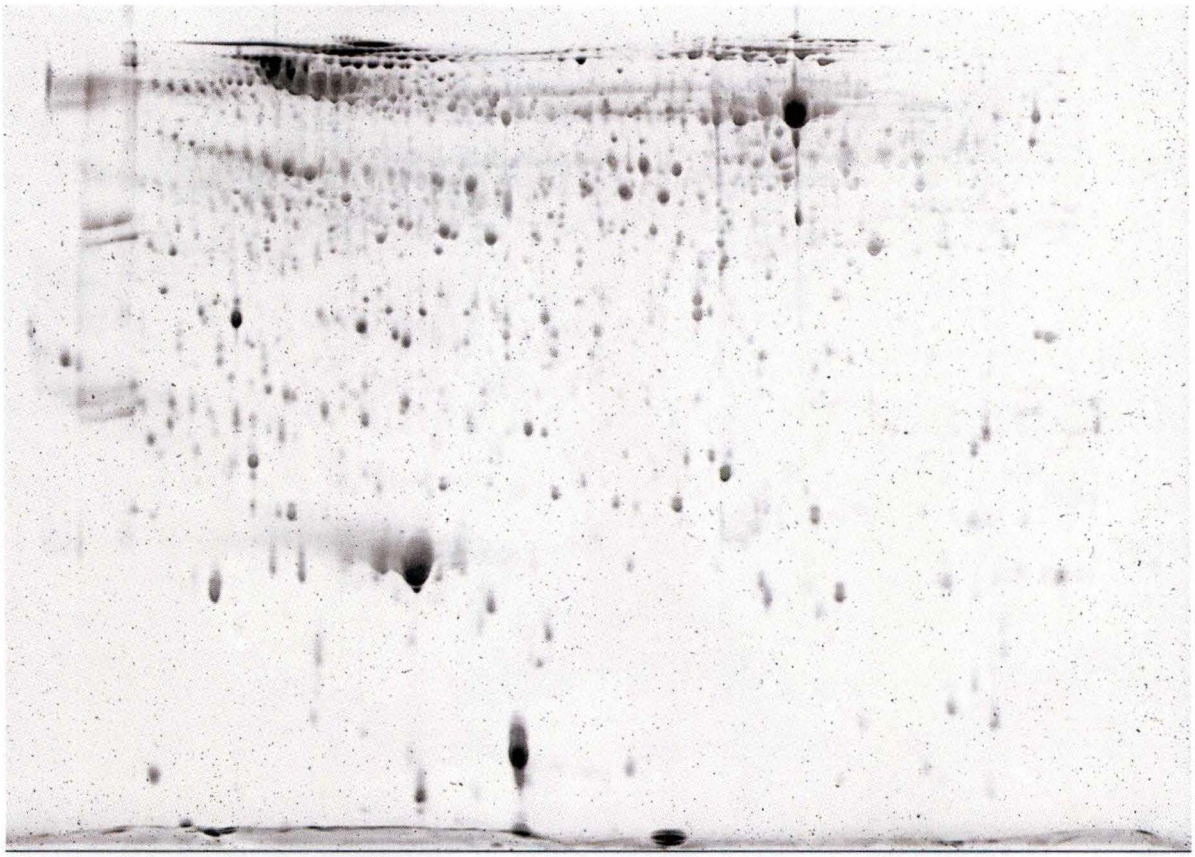
Nous nous sommes intéressé au sérum du fait qu'il permet la circulation de nombreuses protéines, comme le lysozyme et les composés du complément, intervenant dans le système immunitaire et voyant leur quantité varier en cas de stress. Pour ce faire, nous avons effectué deux gels par bassin. Les protéines du sérum servant à faire un gel proviennent d'un pool de deux poissons, afin de minimiser l'erreur individuelle.

Voici tout d'abord les résultats des tests qui ont été effectués afin de mettre au point la technique sur le sérum de perche. Chaque test a été réalisé en duplicat, mais nous ne présenterons qu'un seul des deux gels afin de ne pas trop charger les pages de photos. Nous avons tout d'abord effectué un test sur deux gels de 24cm avec une séparation en première dimension entre les pH 3 et 11. Le pourcentage d'acrylamide utilisé dans les gels servant à faire la migration était de 12,5 % (voir gel 1). Le but de la réalisation de ces premiers gels est de voir si on a une bonne séparation des protéines dans ceux-ci, et si éventuellement un traitement du sérum par sonication avant le chargement des protéines dans les gels par exemple est nécessaire. Comme on peut le

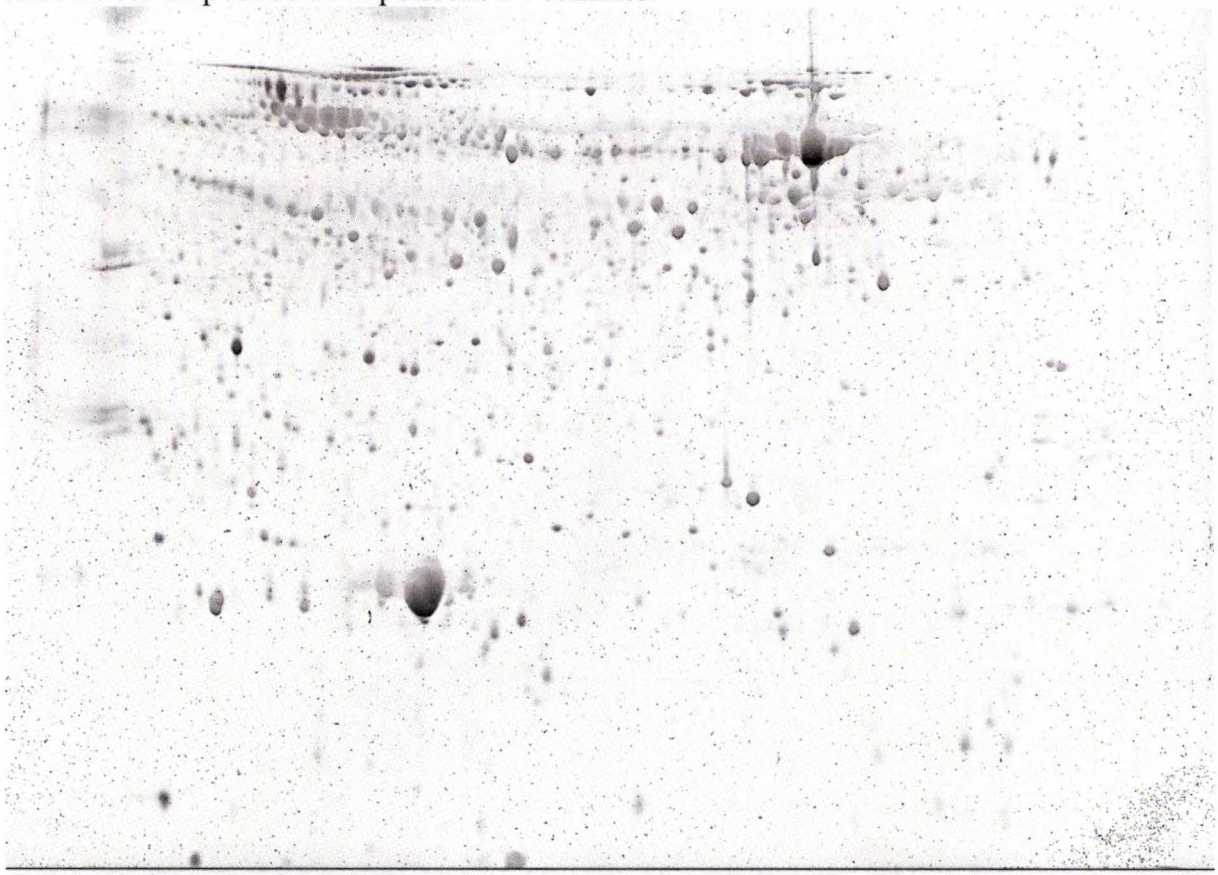


Gel 3 : Gel protéomique (pH entre 3 et 11 avec 16 % d'acrylamide et tampon tris-tricine) de test effectué sur du sérum de perches.

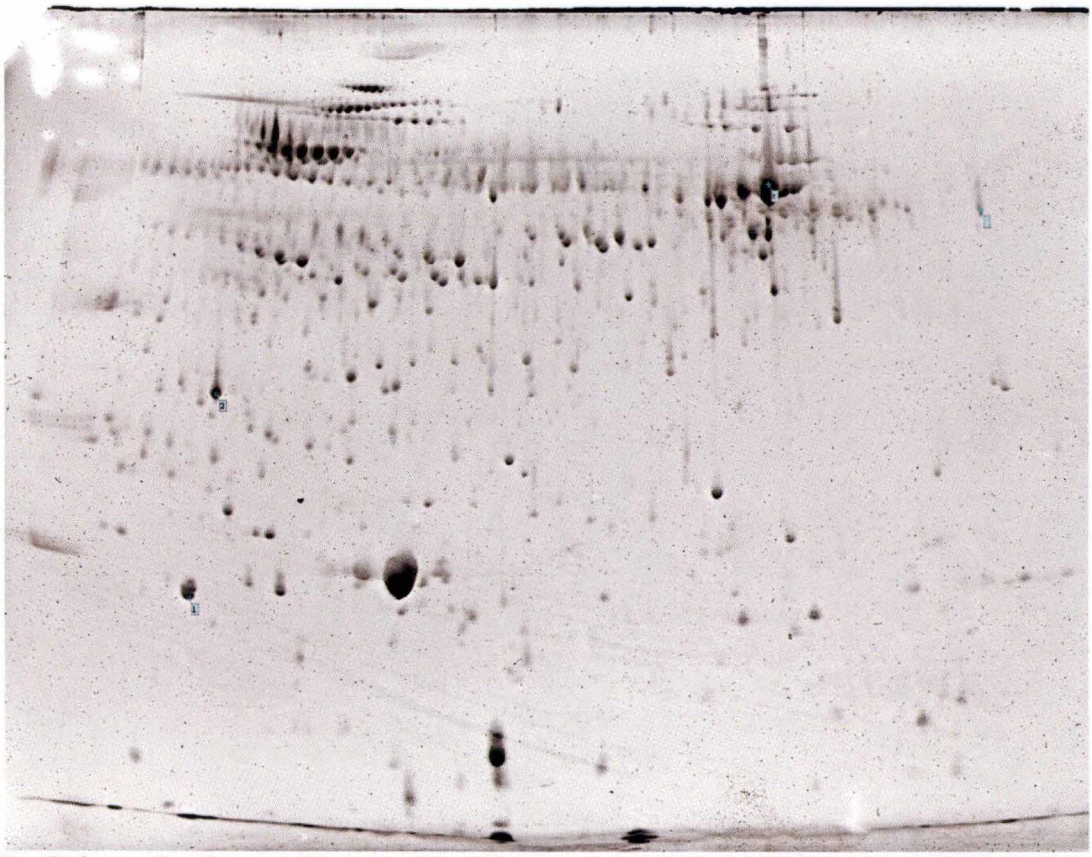
Gel 4 : Gel protéomique (pH entre 4 et 7 avec 14% d'acrylamide et tampon tris-tricine) de test effectué sur du sérum de perches.



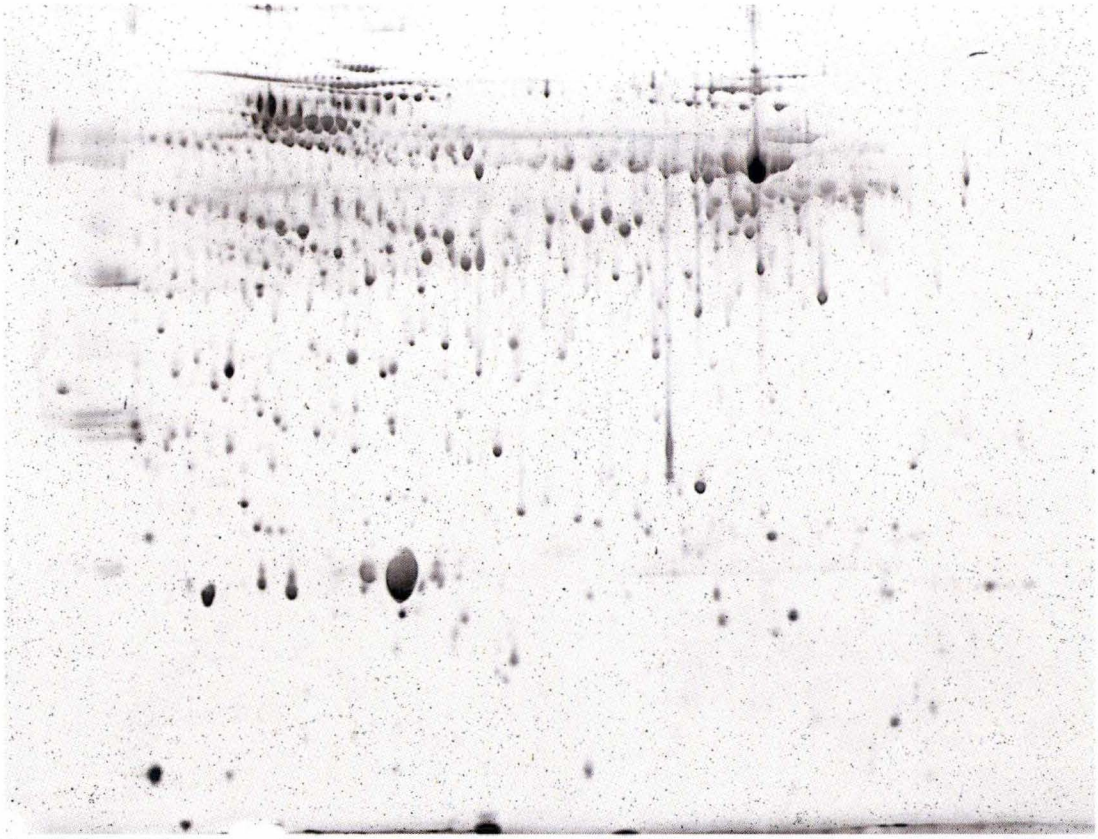
Gel 5 : Gel protéomique (pH entre 4 et 7 avec 12,5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) effectué sur un pool de deux poissons F4 confinés.



Gel 6 : Gel protéomique (pH entre 4 et 7 avec 12,5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) effectué sur un pool de deux poissons F1 confinés.



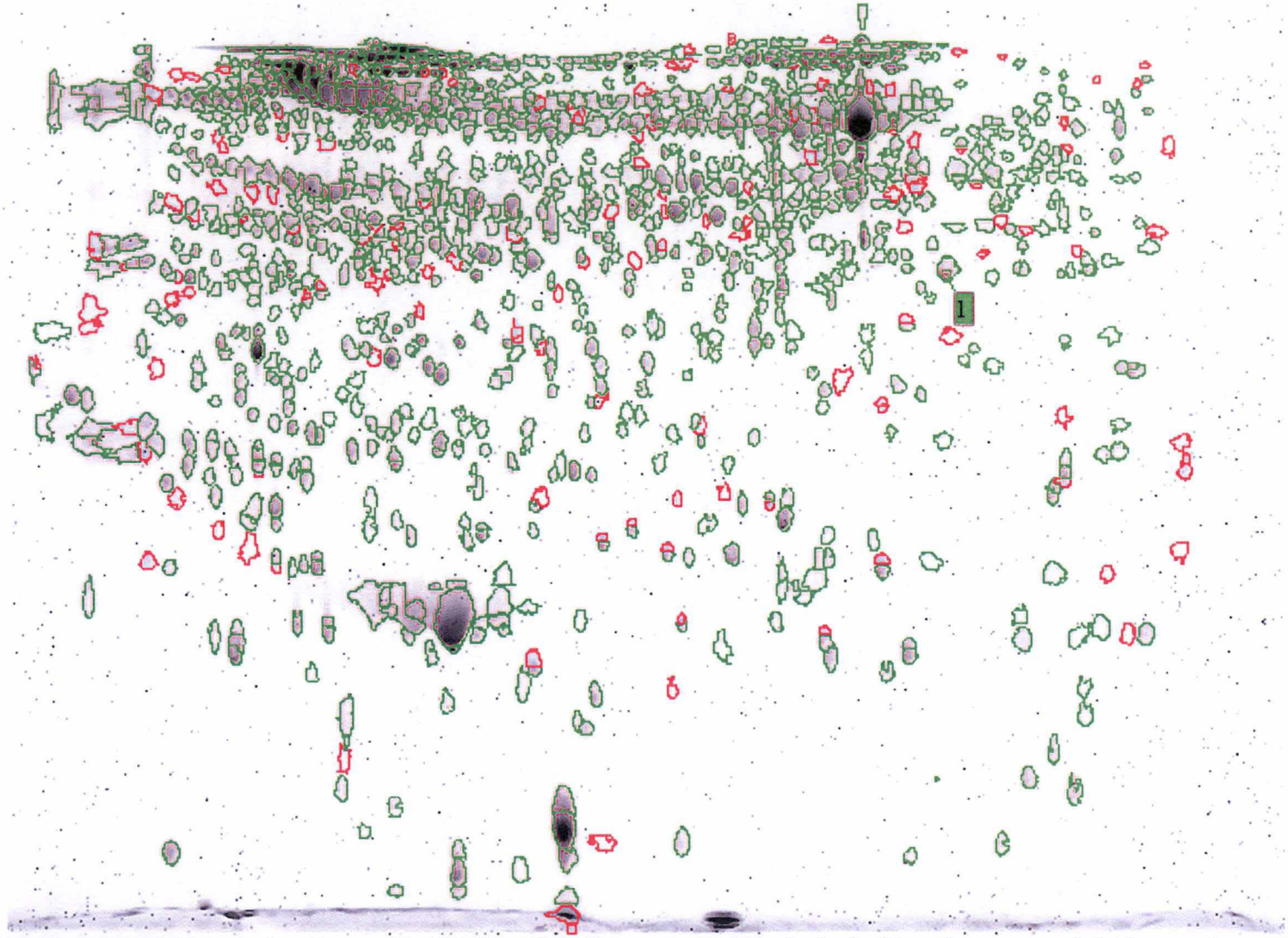
Gel 7 : Gel protéomique (pH entre 4 et 7 avec 12,5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) effectué sur un pool de deux poissons F4 contrôles.



Gel 8 : Gel protéomique (pH entre 4 et 7 avec 12,5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) effectué sur un pool de deux poissons F1 contrôles.

voir sur la photo du gel, la séparation des protéines dans les hauts poids moléculaire n'est pas idéale. Par contre, sur le reste du gel, les protéines sont bien séparées et les résultats sont bien reproductibles car les deux gels ont un profil identique. Cela signifie que la technique utilisée est bonne et qu'aucun autre traitement que la dilution des échantillons dans la solution de lyse 2D n'est nécessaire. Il suffit juste d'essayer de changer les paramètres influençant la migration pour, peut-être, mieux séparer certaines protéines. Les deux paramètres qui peuvent être changé facilement sont la gamme de pH dans laquelle la première migration a lieu et le pourcentage d'acrylamide des gels. Afin de mieux séparer les molécules de hauts poids moléculaire, nous avons décidé de faire d'autres tests en changeant le pourcentage d'acrylamide. Dans le but de ne pas utiliser trop de réactifs, nous avons réalisé 4 gels de 7 cm toujours avec une séparation en première dimension entre les pH 3 et 11. Deux des gels servant à la migration des protéines lors de la deuxième dimension, ont été réalisés avec un pourcentage d'acrylamide de 5 % afin de mieux séparer les protéines de hauts poids moléculaire (voir gel 2). Pour les deux autres gels, nous nous sommes dit qu'il était peut-être plus intéressant de se concentrer sur les protéines de faible poids moléculaire. Pour ce faire, nous avons réalisé 2 gels avec une concentration en acrylamide de 16 % et nous y avons fait migrer les protéines (voir gel 3). Pour rendre la séparation des protéines de faibles poids moléculaire (entre 20 et 100 kDa) encore plus efficace, le tampon d'électrophorèse utilisé est du tampon tris-tricine car il permet une meilleure résolution dans la partie du gel où se trouve les petites protéines en comparaison au tampon tris-glycine qui a été utilisé lors des migrations précédentes (Schägger, 2006). On remarque bien que ces gels 2 et 3 ne sont pas du tout analysables du fait que les protéines qui ont pénétré dans le gel n'occupent pas toute la surface de celui-ci. Nous nous sommes donc concentré sur les protéines de poids moléculaire inférieur à ± 100kDa. Pour cela, nous avons utilisé un tampon d'électrophorèse tris-tricine, des gels de 24 cm et nous avons changé le pourcentage d'acrylamide à 14 %. Le résultat, visible au verso (voir gel 4), est que les protéines ne se répartissent pas sur tout le gel. L'utilisation de cette technique n'est pas un choix optimal.

Pour nos gels analytiques, nous avons donc utilisé la technique que nous avions utilisée pour nos premiers gels de test, à savoir des gels de 24 cm contenant 12,5 % d'acrylamide et un tampon d'électrophorèse de type tris-glycine, car c'est avec cette technique que nous obtenons la meilleure séparation des protéines. Par contre, la gamme de pH dans laquelle les protéines ont migré, a été réduite de 3-11 à 4-7. Les prélèvements de sérum qui ont été utilisés pour la réalisation de ces gels sont ceux du J7. Pour toutes les classes, 4 gels ont été réalisés sauf pour les F1 non confinés où il y en a eu 3. Les gels obtenus sont visibles au verso : voir gel 5, 6, 7 et 8. Nous avons matché tous ces gels ensembles. Matcher les gels signifie repérer les spots en commun entre les différents gel. Pour ce faire, nous avons d'abord matché les gels se trouvant dans une même classe, ensuite les confinés et non confinés d'une même génération ensemble et enfin les gels des deux générations entre eux. Le pourcentage de matching moyen pour chaque classe de gel est de : 74,87 % pour les F4 confinés avec en moyenne 821,5 spots matchés, 68,33 % pour les F1 confinés avec en moyenne 797 spots matchés, 64,19 % pour les F4 contrôles avec 746,75 spots matché en moyenne et 77,59 % pour les F1 contrôles avec en moyenne 652 spots matchés. Une photo d'un gel avec les spots matchés et non matchés est visible au verso : voir gel 9. Sur les gels, entre les F1 et les F4, on observe déjà même sans faire d'analyse que les profils protéiques sont sensiblement différents sous certains aspects. Par exemple, chez les F4, au milieu, en bas des gels, dans la zone des faibles masses moléculaires, on observe des spots qui ne sont pas présents chez les F1.



Gel 9 : Gel protéomique (pH entre 4 et 7 avec 12,5 % d'acrylamide et tampon tris-glycine) effectué sur un pool de deux poissons F4 confinés. Les spots repérés sont les spots entourés. Les spots entourés en vert sont les spots qui ont été matché à l'intérieur d'une même classe.

Discussion

Discussion

Avant de commencer à discuter ces résultats, commençons d'abord par un bref rappel du but de l'expérience. Nous avons cherché à mettre en évidence l'effet de la domestication de la perche commune sur les réponses physiologiques et immunologiques à un stress chronique de confinement. Dans ce but, nous avons choisi et dosé différents paramètres physiologiques et immunitaires dont les résultats sont présentés ci-dessus. Nous avons également mis au point et utilisé une technique de biologie moléculaire sur le sérum de perches : la protéomique.

Nous allons maintenant comparer nos résultats à ceux présentés dans la littérature afin de pouvoir confirmer ou infirmer certaines de nos observations. Pour rappel, notre hypothèse de départ est que la domestication a pour effet de diminuer la sensibilité des poissons aux stress chroniques ou aigus engendrés par l'aquaculture et l'influence de ceux-ci sur le système immunitaire inné et acquis.

Tout d'abord, il est important de savoir que les prélèvements effectués avant le début de l'expérience ne révèlent aucune différence significative entre les F1 et les F4, quel que soit les paramètres étudiés. Cela signifie que les différences observées entre les F1 et les F4 ne sont dues qu'à leur réponse différente au stress.

1. Paramètres physiologiques

Commençons tout d'abord par les aspects physiologiques mesurés sur les poissons tout au long de l'expérience.

Les plus faibles taux de croissance mis en évidence sur le graphique 1 chez les poissons confinés en comparaison à ceux obtenus chez les non confinés, sont en partie en accord avec les résultats obtenus par Jentoft *et al.* (2005). Ils ont en effet remarqué que des juvéniles de perches (*Perca fluviatilis*) stressés régulièrement avaient une croissance plus faible que d'autres non stressées. Au bout de 8 semaines, les poissons stressés ont une masse 35,4 % plus faible que celle des non stressés. Cette même expérience a été menée sur des juvéniles de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) d'élevage. Or, les truites arc-en-ciel sont sélectionnées par les aquaculteurs en fonction, notamment, de leur meilleur taux de croissance, et ceci depuis de nombreuses décennies. Cette expérience ne révèle une différence de croissance que de 22 % entre les truites stressées et les non stressées, ce qui laisserait penser qu'un effet de l'acclimatation à l'aquaculture existe chez les truites arc-en-ciel. Cette différence de croissance entre poissons stressés et non stressés ainsi qu'entre les truites et les perches serait due à l'action des aminotransférases dégradant les protéines pour synthétiser du glucose afin de répondre aux stress. Cette dégradation des protéines se traduit par une diminution de la croissance. Ceci peut expliquer pourquoi les poissons confinés ont, au bout de 55 jours, une croissance plus faible que leurs congénères non confinés. Chez les poissons contrôles, le SGR est plus important chez les F4 que chez les F1, ce qui pourrait suggérer, comme dans l'étude de Jentoft *et al.* (2005), qu'au bout de 4 générations, une acclimatation des perches à l'aquaculture. Dans notre expérience, ce sont les F1 qui sont plus gros et ceci depuis le début de l'expérience. Il faut savoir que pendant une bonne partie de leur vie les F4 ont été moins nourris, ceci afin qu'ils aient une masse moyenne comparable à celle des F1. En effet, une expérience similaire a déjà été menée l'année dernière, et il s'est avéré qu'en plus du stress de confinement, il y avait un stress de densité car

les perches F4 étaient plus grosses que les F1 (cf. résultats Marotte 2006 non publiés). Dans le but d'éviter ce problème, les perches F4 ont été un peu moins nourries afin, qu'au moment de commencer l'expérience, leur masse soit similaire à celle des F1.

La diminution de croissance observée dans les bassins des poissons confinés au J55 peut s'expliquer par les perturbations sociales qu'engendrent les petits bassins. Les poissons ne pouvant s'éloigner très fort d'un ou de leurs congénères, ils allouent plus de leur énergie à préparer leur défense contre un pathogène éventuel, plutôt qu'à accroître leur croissance. Ce phénomène est normalement accompagné d'une augmentation de la glycémie, du fait que les poissons ont besoin d'avoir de l'énergie prête à être utilisée pour se défendre, (Yin *et al.*, 1995), ce qui n'est pas observé chez les F1 confinés au J55 par exemple. Toute variation dans la mobilisation d'énergie peut avoir des effets délétères sur la santé des poissons parce que les processus de défense immunitaire humoral et cellulaire sont très demandeurs d'énergie.

Les valeurs d'IHS calculées dans notre expérience sont comprises entre 1,5 et 2,2 % et sont du même de grandeur que celles calculées sur des perches naturelles par Haux *et al.* (1985) (valeurs comprises entre 1 et un peu plus de 2 %), la valeur minimale observée dans l'expérience d'Haux *et al.* (1985) étant beaucoup plus faible que celle observée dans notre expérience. Contrairement à notre expérience où aucun effet n'est mis en évidence, Haux *et al.* (1985) ont observé qu'après capture de perches dans le milieu naturel, leur IHS diminue jusqu'à un peu plus d'1 % et ne revient à des valeurs basales que deux jours après cette capture. Cette diminution est très difficile à expliquer par rapport aux autres mesures qu'ils ont effectuées. En effet, ils n'ont observé aucune variation dans la quantité d'eau contenue dans le foie ou dans la masse totale des individus. Même si une réduction de la quantité de glycogène dans le foie a bien été observée, elle ne permet pas d'expliquer de tels changements de masse. D'après l'auteur, d'autres expériences sont nécessaires afin de voir si ce changement observé est une des conséquences du stress mesuré chez les poissons.

Les différences observées entre les générations, sur les mesures d'ISS, montre bien qu'il y a un effet de la domestication sur celui-ci. La domestication tend, en effet, à diminuer la taille de la rate. Cet organe sert pour la destruction des globules rouges mais c'est aussi, grâce à sa pulpe blanche, un organe lymphoïde secondaire très important pour l'immunité. Une diminution de sa taille peut supposer une diminution des capacités immunologiques chez ces poissons. Mais, on observe que les poissons F4 ont une production de radicaux libre par les macrophages se trouvant dans la rate bien supérieure à celle des F1. Cette différence de production de radicaux libres par les macrophages de la rate entre les F1 et les F4, est à mettre en relation avec le fait que les F4 ont un ISS inférieur à celui des F1. La production absolue de radicaux libres par les F1, sans tenir compte de la masse de la rate, est supérieure à celle des F4. Mais si cette production est exprimée en poids de tissu frais, alors ce sont les F4 qui ont une production de radicaux plus importante. Pour une même quantité de tissu frais, les macrophages des rates de F4 sont soit plus nombreux, soit produisent des radicaux superoxydes plus efficacement et/ou en plus grande quantité. Il faut savoir que de nombreuses rates avaient des kystes. Ces kystes augmentent la masse de la rate mais ne produisent pas de radicaux libres. Malheureusement, aucun relevé de l'abondance des kystes en fonction des bassins n'a été effectué, par contre, nous en observions aussi bien chez les F1 que chez les F4.

Les valeurs de cortisolémie visibles sur le graphique 4 pour les poissons contrôles du J28 n'ont pas été mesurées dans tous les bassins. En effet, nous avons utilisé les données d'un seul

bassin (ce qui explique l'absence de barre d'erreur sur le graphique 4) ainsi que le test post-hoc de Tukey spécial pour le nombre de valeurs inégal pour ces classes de poisson. Nous avons utilisé les données d'un seul bassin, car pour chaque génération, et pour tous les poissons d'un des deux bassins, le taux de cortisol sanguin dépassait les 200 ng ml^{-1}. Or, ces valeurs sont proches de celles mesurées par Jentoft *et al.* (2005) sur des perches juste après une mise hors de l'eau de 60 sec et un confinement de 15min, c'est-à-dire après un stress aigu. Ces valeurs n'ont donc pas été prises en compte car elles reflètent que les poissons ont subi un stress aigu juste avant notre prélèvement. Même en ayant enlevé les valeurs de ces bassins où il y avait manifestement eu un problème, les valeurs mesurées dans les autres bassins restent très élevées en comparaison à celles mesurées au J7. Or, si on se réfère aux résultats obtenus dans d'autres études (Rotllant *et al.*, 1997 ; Yin *et al.*, 1995 ; Tort *et al.*, 1996), les valeurs de cortisolémie, mesurées sur les poissons contrôles, devraient rester proches de celles mesurées sur ces mêmes poissons avant le début de l'expérience ou au J7. En ce qui concerne les valeurs mesurées chez les poissons confinés, on devrait plutôt observer des valeurs comparables à celles obtenues au J7, voire un retour à des valeurs proches de celles mesurées juste avant le début de l'expérience. Or, les valeurs observées pour ces poissons au J28, même si elles restent tout à fait probables, sont sensiblement supérieures à celles attendues. Les valeurs mesurées chez les poissons contrôles du J55 sont elles aussi assez élevées. Dans ce cas-ci, c'est un des bassins qui a une valeur beaucoup plus élevée que l'autre (57,7 ± 26,9 ng ml^{-1} contre 15,2 ± 6,6 ng ml^{-1} pour les F4 et 41,6 ± 28,2 ng ml^{-1} contre 12,1 ± 7 ng ml^{-1} pour les F1), ce qui se traduit par un grand écart-type. Ces valeurs aberrantes observées pour les poissons confinés au J28 et 55 ont conduit à ce qu'il y ait un effet négatif (significatif) du confinement sur la cortisolémie, ce qui est aberrant, surtout si l'on se réfère aux observations du J7. On pourrait supposer que ces valeurs aberrantes soient dues à des ordres de prélèvements différents, ce qui se vérifie entre ceux du J7 et du J28 mais qui parait peu probable. En effet, les prélèvements des J7 et 55 ont été effectués dans le même ordre et que pourtant les différences, au point de vue des poissons contrôles, sont toujours visibles.

Les mesures de cortisolémie obtenues dans cette expérience sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Jentoft *et al.* (2005) chez des juvéniles de perche non stressés. Elles sont par contre fort différentes des mesures d'Acerete *et al.* (2004) qui ont trouvé que des perches non stressées (prélevées directement à la ferme d'élevage ou après 4 semaines d'acclimatation dans des bassins) avaient une cortisolémie sanguine de base avoisinant 45 ng ml^{-1} ce qui est beaucoup plus élevé que les valeurs mesurées dans notre étude, excepté celles des contrôles du J28 et 55. Globalement, nos valeurs sont plus des valeurs de cortisolémie de base telles celles qui ont été mesurées chez la plupart des espèces comme la carpe (*Cyprinus carpio* L.) (10,27 ± 0,47 ng ml^{-1} mesuré par Yin *et al.*, 1995), l'hybride de bar rayé (*Morone saxatilis*Morone chrysops*) (12,5 ± 5,7 ng ml^{-1} mesuré par Davis *et al.* 2004) ou le bar (*Dicentrarchus labrax*) (10 ± 8 ng ml^{-1} mesuré par Vazzana *et al.*, 2002). Cette différence entre nos valeurs et celles mesurées par Acerete *et al.* (2004) pour une même espèce peut être due aux différences de conditions d'élevages ou éventuellement à l'origine des perches utilisées par Acerete *et al.* Les poissons utilisés dans l'expérience d'Acerete *et al.* (2004) étaient peut-être en situation de stress chronique. Une différence dans le taux de survie et de croissance en aquaculture a déjà été observée chez les perches suivant leur origine (Mandiki *et al.*, 2004). Une différence dans la réponse au cortisol est donc possible suivant l'origine, mais une si grande différence à cause de l'origine parait peu probable.

Ces valeurs de cortisolémie peu élevées laissent à penser que les poissons ne sont pas stressés. En effet, en cas de stress chronique, le taux de cortisol, même s'il diminue après le stress

aigu que constitue la mise en charge, reste plus élevé chez les poissons stressés. Rotllant *et al.* (1997) ont démontré que des pagres (*Pagrus pagrus*) soumis à une augmentation de la densité d'élevage à 20 kg m^{-3} avaient un taux de cortisol plus élevé que des contrôles durant les 23 jours de l'expérience. Yin *et al.* (1995) ont observé le même phénomène pour des carpes soumises à une augmentation de la densité. Dans notre expérience, les poissons contrôles au J7 ont une cortisolémie légèrement plus faible que celle des confinés, même si cette différence n'est pas significative. A cause, des problèmes survenus aux J28 et 55 dans les bassins contrôles, on ne peut malheureusement pas voir si cet effet d'augmentation de la cortisolémie chez les poissons confinés, observée dans d'autres études, se vérifie dans la nôtre ou s'il y a une acclimatation de l'axe HPI (hypothalamus-hypophyse-interrénale) au nouvel environnement restreint.

En fonction du type de stress, de la durée et des facteurs associés à ce stress, le cortisol peut avoir pour effet soit d'augmenter, soit de diminuer les capacités immunologiques des poissons. Les lymphocytes, par exemple, possèdent des récepteurs à corticostéroïdes. De plus, des changements dans les récepteurs à glucocorticoïdes ont déjà été observés dans les leucocytes de la rate et des reins de poissons stressés. Le cortisol lui-même voit sa concentration varier sous l'action du système immunitaire. Les variations observées dans la cortisolémie ne sont pas seulement le résultat du stress, mais d'un ensemble de facteurs variants avec ce stress (Rotllant *et al.*, 1997). L'élévation prolongée de la cortisolémie associée au stress chronique, a généralement des effets délétères pour les fonctions immunitaires (Small & Bilodeau, 2005), mais pas toujours. En effet, l'augmentation de la concentration en cortisol et en glucose résultant d'un stress n'est pas nécessairement corrélée avec une immunodépression. Il y a donc bien d'autres médiateurs régulant l'activité du système immunitaire qui sont influencés par le stress (Ortuño *et al.*, 2002).

Demers & Bayne (1997) suggère que l'effet immunosuppresseur bien connu résultant d'un stress, et plus particulièrement du cortisol, peut être précédé d'une augmentation à court terme des capacités immunitaires, du moins dans le cas d'un stress aigu. Ceci est valable pour le lysozyme par exemple. L'augmentation de l'activité du lysozyme suivant un stress serait une adaptation compensatoire permettant de soutenir la résistance innée lorsque les effets délétères du cortisol conduisent à une plus forte susceptibilité aux parasites. Les effets délétères du stress ne viendraient que plus tard, lors d'un stress chronique, quand les effets deviennent inéluctables.

L'augmentation de la sensibilité à une infection n'est pas forcément due au cortisol. En effet, Small & Bilodeau (2005) n'ont pas observé d'augmentation de la mortalité chez des poissons-chats américains nourris avec du cortisol et exposés à une bactérie virulente : *Edwardsiella ictaluri*. Par contre, des poissons stressés par un faible niveau d'eau sont plus susceptibles d'être infectés. En cas de stress, il y a toute une série d'hormones qui sont produites et qui interviennent dans la réponse au stress. Ce sont donc toutes ces hormones qui interviendront donc la régulation de l'activité du système immunitaire.

Hille (1982) (cité dans Haux *et al.*, 1985) a démontré que les valeurs de glycémie de base chez un poisson pouvaient varier très fortement en fonction des individus et ceci au sein d'une même espèce. De plus, la glycémie va varier en fonction de la température, du statut nutritionnel, du sexe et de la taille (Jentoft *et al.*, 2005). Comme Davis (2004) l'a démontré, la température d'élevage peut influencer la glycémie. Dans notre expérience, tous les poissons se trouvaient dans le même circuit fermé, à la même température. Les différences observées entre les groupes ne peuvent donc pas être dues à une différence de température entre les bassins.

Les valeurs de glycémie mesurées dans le cadre de cette expérience sont du même ordre de grandeur que celles mesurées par Acerete *et al.* (2004), sur des perches soumises à deux stress aigus différents. Ils ont en effet démontré que des perches soumises à un stress de transport avait

une glycémie de 70,9 ± 9,98 mg dl^{-1}. La moyenne maximale mesurée dans notre expérience est de 74,2 ± 8,0 mg dl^{-1} pour les poissons F4 avant le début de l'expérience. On peut donc considérer que les perches F4 utilisées dans notre expérience sont stressées avant même le début de celle-ci ou ont au moins subit un stress quelques heures avant le prélèvement initial. Comme dans le cas du dosage de la cortisolémie sérique, l'ordre de prélèvement des bassins est peut-être en cause dans les différences observées entre les poissons F1 et F4 lors du prélèvement initial. En effet, nous avons d'abord prélevé les bassins contenant les poissons F1, et seulement ensuite les bassins contenant les F4.

Dans notre expérience comme dans celle d'Acerete *et al.* (2004), la plupart des mesures de glycémie sanguine sont comprises entre 40 et 60 mg dl^{-1}. Acerete *et al.* (2004) n'ont pas observé d'augmentation significative dans la glycémie de perches soumises un stress de manipulation. Ceci serait dû au fait que les perches ont une réponse comportementale au stress qui n'implique pas beaucoup d'activité musculaire. Ceci pourrait expliquer pourquoi peu de différences ont été observées dans notre étude. Pourtant, d'après Jentoft *et al.* (2005), la perche est connue pour posséder une grande utilisation des hydrates de carbone et de la glycolyse, en tout cas par rapport à la truite arc-en-ciel.

Rotllant *et al.* (1997) ont soumis des pagres à une augmentation de la densité d'élevage. Ils ont remarqué, tout au long de l'expérience, une différence significative du taux de cortisol sanguin entre les poissons contrôles et les poissons à haute densité, mais très peu d'effets ont été observés sur la glycémie, juste une légère différence 2 jours après la mise en charge, et une augmentation significative de près de 30 % de la glycémie au bout de 9 jours, toujours chez les poissons à plus grande densité. Cette étude montre, tout comme la nôtre, que les perciformes ne répondent pas forcément à un stress chronique en augmentant leur glycémie.

La différence significative mise en évidence entre les deux générations peut être comparée à celle observée par Jentoft *et al.* (2005) entre des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et des perches ou par Ruane *et al.* (1999) entre des truites arc-en-ciel et fario (*Salmo trutta*). Ils ont en effet démontré que la truite arc-en-ciel domestiquée répond moins fortement ou retourne plus rapidement à des niveaux de base de glycémie, en comparaison à des espèces moins domestiquées comme la truite fario ou la perche. Nos résultats sont donc en désaccord avec ces études car les perches F4, qui peuvent être considérées comme domestiquées, ou tout du moins plus domestiquées que les F1, ont tout au long de l'expérience, une glycémie plus importante (moyenne de 59,83 ± 12,89 mg dl^{-1}) que celle mesurée chez les F1 (moyenne de 49,16 ± 8,74 mg dl^{-1}). On peut peut-être expliquer la glycémie plus importante des F4 comme étant un moyen qui leur permet d'être apte à répondre aux nombreux stress engendrés par l'aquaculture. Il aurait été intéressant de mettre ces résultats en parallèle avec une mesure du taux d'hématocrite et du volume des érythrocytes. En effet, une augmentation du métabolisme demande plus d'oxygène, ce qui se traduit normalement par une augmentation du nombre d'érythrocytes circulants. En cas de stress aigu, ces érythrocytes peuvent même être libérés par une contraction de la rate (Pearson & Stevens cités dans Ruane *et al.*, 1999).

Les valeurs de glycémie mesurées dans notre expérience sont par contre beaucoup plus faibles que celles mesurées par Jentoft *et al.* (2005) sur des juvéniles de perches. En effet, ils ont démontré que ces juvéniles de perches avaient une glycémie sanguine de ± 4 mM avant d'être stressés par une mise hors de l'eau et un confinement de 15 min. Or, une concentration de 4 mM de glucose équivaut à 72 mg dl^{-1}. La valeur basale de glycémie mesurée dans cette expérience est donc équivalente aux valeurs maximales observées par Acerete *et al.* (2004) et dans notre expérience. De plus, dans l'expérience de Jentoft *et al.* (2005), la glycémie monte à 19 mM (342

mg dl^{-1}) 1 h après un stress aigu et reste élevée jusqu'à 6 h après l'application de ce stress. Ces valeurs sont d'ailleurs en contradiction avec celles mesurées par Acerete *et al.* (2004) qui n'observent pas de valeurs dépassant les 80 mg dl^{-1} de glucose même après un stress de transport. De même, Haux *et al.* (1985) ont démontré qu'après une capture de perches au filet dans leur milieu naturel, leur glycémie est de plus de 100 mg dl^{-1} jusqu'à un jour après la capture. Le deuxième jour après celle-ci, la glycémie redescend à des valeurs proches de celles observées dans notre expérience et par Acerete *et al.* (2004) (Haux *et al.*, 1985). Les valeurs atteintes dans l'expérience de Haux *et al.* (1985) montre bien, en plus de celles mesurées dans notre étude et dans celle d'Acerete *et al.* (2004), que les valeurs obtenues par Jentoft *et al.* (2005) sont très élevées.

C'est le glycogène du foie et des muscles et la désamination des protéines et des triglycérides qui permettent une augmentation du glucose sanguin. En effet, parallèlement à la mesure de glycémie, Haux *et al.* (1985) ont mesuré le taux de glycogène dans le foie et les muscles de perches capturées dans le milieu naturel. Ils ont observé une diminution, juste après la capture, et un retour à des niveaux de base deux jours après celle-ci. Ceci est confirmé par Rotllant *et al.* (1997) qui n'ont pas observé d'augmentation de la prise alimentaire chez des pagres stressés, mais bien une augmentation de la glycémie.

2. Discussion sur les paramètres immunologiques

A notre connaissance, aucun article ne mentionnant l'activité du lysozyme ou un des autres paramètres immunologiques utilisés dans cette expérience n'est paru à ce jour pour la perche. Or, l'activité du lysozyme notamment, varie très fort en fonction de l'espèce. En effet, Small et Bilodeau (2005) ont mesuré une activité du lysozyme plasmatique comprise entre 10 et 110 unités ml^{-1} chez des poissons-chats américains (*Ictalurus punctatus*). Yin *et al.* (1995) ont mesurés des activités comprises entre 40 et 110 unités ml^{-1} de sérum de carpes. Et Ruane *et al.* (1999) ont mesurés des valeurs inférieures à 100 unités ml^{-1} chez des truites fario. Or, les activités mesurées dans notre expérience sur du sérum de perches sont comprises entre 632 ± 19,80 et 1075,83 ± 122,80 unités ml^{-1}, et sont du même ordre que celles mesurées par Binuramesh *et al.* (2005) sur du sérum de tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) et par Ruane *et al.* (1999) sur des truites arc-en-ciel.

L'activité du lysozyme, comme beaucoup de paramètres physiologiques chez les poissons téléostéens, varie fortement entre les individus. Des variations dans le niveau de base de l'activité du lysozyme peuvent être déterminées génétiquement ou être dues à des causes environnementales telles qu'une diète ou une infection récente.

Le dosage de l'activité du lysozyme, en plus de celui du cortisol, montre bien que les poissons contrôles, prélevés au J28, sont différents de ceux prélevés lors des autres jours de prélèvements. L'activité du lysozyme est connue pour augmenter ou diminuer en fonction de certains paramètres (comme la durée) caractérisant le stress. Une augmentation de l'activité du lysozyme, comme celle observée au J28, est souvent synonyme de stress aigu (Demers & Bayne, 1997). Mais si on se réfère aux résultats obtenus par Rotllant *et al.* (1997) après avoir soumis des pagres à une densité élevée (20 kg m^{-3} contre 10 chez les contrôles), l'augmentation de l'activité du lysozyme au bout de 28 jours est normale. Ils n'ont en effet pas observé, 2 et 9 jours après la mise en charge, d'effet de la densité sur l'activité du lysozyme. Par contre, 16 et 23 jours après cette mise en charge, ils ont observé une augmentation significative de celle-ci chez les poissons

maintenus à densité élevée. Cette augmentation de l'activité du lysozyme survient après qu'une diminution dans l'activité d'autres éléments du système immunitaire ait été observée. On pourrait donc traduire cette augmentation comme un moyen de compensation de la défaillance des autres éléments du système immunitaire. Dans notre expérience, on observe peut-être ce phénomène de compensation par le lysozyme de la diminution de la quantité de protéines et d'Ig sériques au J55 chez les poissons confinés.

La production de radicaux superoxydes, comme on le voit sur le graphique 11, est plus élevée chez les F4 que chez les F1. Or, l'ISS des F4 est inférieur à celui des F1. L'augmentation de la production de radicaux libres a peut-être conduit les poissons à ne plus produire trop de tissu de rate. Cette augmentation dans la production de radicaux libres peut être due à l'augmentation du nombre de macrophages présents dans la rate, ou à une meilleure efficacité de ceux-ci.

La production de radicaux superoxydes peut être régulée par d'autres facteurs que le cortisol ou les catécholamines. En effet, une diminution de l'activité d'explosion respiratoire chez des daurades (*Sparus aurata* L.) exposées à l'air ne peut être due à l'action de ces hormones du fait qu'aucune variation du niveau de ces hormones n'a été observée pendant ce stress. D'après Ortuño *et al.* (2002), la diminution de la production de radicaux superoxydes observée dans ce cas serait surtout due à l'absence d'oxygénation des tissus résultant de la sortie de l'eau des poissons (Ortuño *et al.*, 2002). Il est donc important que l'oxygénation soit toujours optimale afin de ne pas affecter la production de ces radicaux chez les poissons. L'action d'autres hormones comme l'ACTH ou l'α-MSH sur la production de radicaux libres n'est pas à exclure. En effet, l'ACTH a déjà été citée comme pouvant augmenter la production de radicaux libres de leucocytes de reins de truites arc-en-ciel (Bayne & Levy, 1991 cités dans Ruane *et al.*, 1999). La β-endorphine, elle, a déjà été citée comme étant inhibiteur de l'activité des leucocytes des reins de tilapias (Faisal *et al.*, 1989 cités dans Ruane *et al.*, 1999). Enfin, l'effet stimulant de l'α-MSH sur l'activité phagocytaire de leucocyte de reins de truites a déjà été démontré (Harris & Bird, 1998).

Les quantités de protéines sériques mesurées dans notre expérience sont légèrement plus faibles que celles mesurées par Cuesta *et al.* (2004) sur des daurades. Ils ont en effet trouvé, dans le sérum de daurades, des quantités de protéines comprises entre 40 et 60 mg ml^{-1} avec de très faibles différences entre des poissons traités ou non avec des immunostimulateurs.

Les valeurs obtenues correspondent aux valeurs qu'Haux *et al.* (1985) ont mesuré sur des perches. Ils ont étudié la quantité de protéines plasmatiques de perches après les avoir capturées en milieu naturel. Contrairement à notre étude, ils n'ont pas observé de grandes différences dans la quantité de protéines entre les différentes classes de poissons. Ils ont juste observé que la quantité de protéines était légèrement supérieure un jour après la capture.

Yin *et al.* (1995) ont observé une diminution drastique de la quantité de protéines plasmatiques de carpes au bout de 7 jours d'élevage à densité élevée (24 à 26 g L^{-1} contre 4,5 à 5,5 pour les contrôles). Si l'on tient compte des observations du J7 et 28 de notre expérience, le confinement a plutôt comme résultat d'augmenter la quantité de protéines sériques. Au J55 par contre, nos observations concordent avec les résultats obtenus par Yin *et al.* (1995).

Pour synthétiser de nouvelles protéines, il faut synthétiser de nouveaux ARN_m, ce qui prend au moins 5 min chez les mammifères. Chez les poissons, ce temps sera fortement allongé du fait de la nature poïkilothermique de ceux-ci. La réponse classique en phase aiguë induisant une activation génomique, ainsi qu'une synthèse et une sécrétion de nouvelles protéines ne sera donc

pas immédiate, à moins qu'il n'existe déjà des pro-protéines pouvant être activées rapidement (comme dans le cas de la synthèse de l'ACTH) ou des ARN_m prêts à être traduits. On pourrait alors parler de pré phase aiguë (Demers & Bayne, 1997).

Les F4, ont tout au long de l'expérience, une quantité de protéines sériques significativement plus grande que celle des F1. Il semblerait donc que l'acclimatation ait pour effet d'augmenter les protéines du sérum. Des protéines non présentes chez les F1, semblent être synthétisées par les F4. En effet, si on regarde au niveau des gels de protéomique on remarque que de nombreux spots supplémentaires sont présents dans le sérum des F4 comparé au F1.

Les quantités d'Ig mesurées par notre technique sont beaucoup plus faibles que celles mesurées par Rotllant *et al.* (1997) avec la même technique sur des pagres, une autre espèce de perciformes. Ils ont en effet mesuré que la quantité d'Ig plasmatiques totale se trouve aux alentours de 40 % de la quantité de protéines plasmatiques. Nos mesures ont été effectuées sur du sérum et elles ont une moyenne de 22,24 ± 14,73 %. Peut-être qu'une partie des Ig restent bloquées dans le caillot lors de la formation de celui-ci afin d'isoler le sérum ou qu'il y a simplement une grande différence, soit dans la quantité de protéines totales, soit dans la quantité d'Ig, entre ces deux espèces. La formation du caillot qui se déroule pour isoler le sérum, diminue la quantité de protéines se trouvant dans le sang. En effet, le fibrinogène et les facteurs de Willebrand par exemple, disparaissent au moins en partie dans le caillot. Mais nos mesures sont proches de celles mesurées par la même technique par Dautremepuits *et al.* (2004) dans du plasma de carpes parasitées par *Ptychobothrium*. Lorsque ces carpes ne sont pas infectées par contre, les quantités d'Ig sont bien inférieures aux nôtres.

Rotllant *et al.* (1997) ont utilisé la même technique que nous pour évaluer la quantité d'IgM plasmatiques chez des pagres soumis à un grande densité. Au bout de 23 jours d'expérience, aucune différence significative n'a été observée dans leur quantité d'Ig sériques. Le stress et plus particulièrement le cortisol sont pourtant connus pour avoir comme effet de diminuer la production d'anticorps, en agissant négativement sur la différenciation des lymphocytes producteurs des anticorps (Nagae *et al.*, 1994). Le seul effet significatif observé dans les mesures d'Ig sériques de notre étude, est la diminution pour les poissons confinés entre le J28 et 55. Or, lors des prélèvements, ce sont les poissons contrôles qui ont une plus grande quantité de cortisol, ce qui laisse penser qu'il n'y a pas que le cortisol qui intervient dans la régulation de la production d'Ig.

Les quantités d'Ig mesurées dans différentes études citées dans Cuesta *et al.* (2004) se situent entre 0,25 et 23,5 mg ml^{-1}. Ces mêmes études soulignent le fait que la quantité d'IgM circulant varie très fortement entre les individus en fonction de leur age, de leur taille, des conditions environnementales et de leur statut immunitaire. Il est donc important d'utiliser beaucoup de poissons et d'en faire une moyenne ou de faire la moyenne de plusieurs bassins, afin de diminuer l'erreur que pourrait engendrer un poisson ayant une quantité d'Ig fort différente de la moyenne de la population. Dans notre étude, nous avons fait une moyenne de minimum 3 mesures (chacune effectuée sur un poisson) par bassin. Pour chaque confinement et chaque génération, à chaque temps, nous avions 2 bassins dont nous avons fait la moyenne. C'est cette moyenne qui est représentée sur le graphique 16.

A notre connaissance, il n'existe pas d'article prouvant qu'un stress induit une diminution de la quantité d'Ig sériques. Cependant, Cuesta *et al.* (2004) ont cherché à voir l'effet de différents stresseurs sur la quantité d'Ig sériques. Leur étude effectuée sur des daurades n'a d'ailleurs révélé aucun effet de l'hypoxie de 2 min ou de la surpopulation d'1 h sur la quantité d'IgM sériques. Par contre, du phénoxyéthanol à 1,6 mM, en contact avec les poissons pendant 1

h, a eu un effet sur la quantité d'IgM sériques. Dans ce cas, le stress aigu que constitue l'exposition à un anesthésiant n'a pas eu pour effet d'augmenter les capacités immunitaires, contrairement à la quinaldine sulfate, un autre anesthésiant qui a eu pour effet de doubler la quantité d'IgM circulantes.

Les différences observées dans la quantité de protéines sériques ne peuvent pas être due qu'aux lysozymes ou aux Ig, deux types de protéines du sérum mesurées dans cette expérience. En effet, les variations au cours des prélèvements ne suivent pas les mêmes profils. Par exemple, avant le début de l'expérience, mais aussi tout au long de l'expérience, les F4 ont significativement ($P<0,001$) plus de protéines que les F1. Or, la quantité de lysozyme et d'Ig mesurée avant le début de l'expérience n'est pas différente entre les F1 et les F4. Au J28, la quantité de lysozyme est significativement plus élevée, excepté pour les F1 confinés. Or, la quantité de protéines sériques n'augmente que très peu au J28 par rapport au J7 ($41,30 \pm 2,87$ contre $44,47 \pm 5,02$ mg ml^{-1}) et les F1 confinés n'ont pas une quantité de protéines plus faible que les autres groupes. Enfin, les quantités d'Ig au J7 sont fort différentes entre tous les groupes, alors que la quantité de protéines sériques est presque identique dans tous les groupes. Les Ig ou le lysozyme contenus dans le sérum sont loin d'être les principales protéines qui font varier la quantité de protéines sériques. La quantité d'autres protéines, comme celle du complément, des protéines de stress (HSP) ou des CRP (C-Réactive Protein) doivent varier au cours de l'expérience. Par exemple, une des protéines intermédiaires du système complément, la protéine C3, augmente chez des truites quelques minutes après avoir été gardées dans une faible hauteur d'eau et mises hors de celle-ci pendant un temps bref (Demers, 1993 cité dans Demers & Bayne, 1997). Chez les mammifères, les hormones de stress comme les catécholamines ou le cortisol module l'activité de beaucoup de cytokines comme le TNF-α. Or, certaines de ces cytokines augmentent la synthèse hépatique de protéines de la phase aiguë comme les facteurs du complément. Cette action des hormones de stress a besoin d'être vérifiée chez les poissons mais on peut supposer que cette action a aussi lieu grâce aux nombreuses homologies observées (Munk & Guyre, 1986 cités dans Ortuño *et al.*, 2002). La protéomique permet justement d'identifier les protéines dont les niveaux d'expression varient dans les différentes générations ou dans les différents niveaux de confinement. Malheureusement, par manque de temps, aucune analyse n'a pu être réalisée.

Au J28, pour le lysozyme et la production de radicaux superoxydes, et au J55, pour les protéines et les Ig sériques, les poissons confinés ont des capacités immunologiques inférieures à celles des poissons non confinés. Les poissons continuellement stressés peuvent avoir une adaptation qui leur permet de survivre sous ces conditions de stress continuel avec des capacités immunologiques plus faibles. Mais ces poissons sont sûrement plus sensibles à une infection bactérienne. Ceci pourrait expliquer pourquoi il arrive que des bassins d'aquaculture soient décimés en quelques jours par des infections (Yin *et al.*, 1995).

Les poissons F4 ont, que ce soit au niveau de la production de radicaux superoxydes ou de leur quantité de protéines sériques, des capacités immunologiques supérieures à celles des F1. Ceci est très probablement le résultat de l'adaptation à l'aquaculture. En effet, une fois qu'une infection a lieu dans un circuit fermé, très vite tous les individus sont en contact avec cette maladie. Les individus les plus résistants sont donc sélectionnés. Dans le milieu naturel par contre, les poissons, même s'ils vivent en banc, vivent dans un milieu beaucoup plus vaste, ce qui limite la propagation des maladies. De plus, les poissons F4 ont sûrement eu le temps de s'acclimater à leur environnement. Ils perçoivent donc moins que les F1 la vie en bassins comme un stress.

Davis *et al.* (2002) (cités dans Small & Bilodeau, 2005) ont proposé comme hypothèse que le stress, par son action sur le système immunitaire inné, augmente la probabilité d'une infection des poissons-chats par *Ichthyophthirius multifiliis*. Mais ce n'est pas parce que les capacités des systèmes immunitaires spécifiques ou non spécifiques sont augmentées que la résistance à un pathogène sera augmentée. La présence du pathogène peut constituer un stress supplémentaire conduisant à une chute de l'efficacité de la défense des poissons contre ce pathogène (Binuramesh *et al.*, 2005). Lors d'une infection par un pathogène, on peut même observer une augmentation de la concentration en cortisol circulant. En effet, la présence d'un pathogène en elle-même constitue un stress (Small & Bilodeau, 2005).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le cadre du développement de l'aquaculture de la perche mise en place afin de diversifier les marchés, la recherche d'un éventuel effet de l'acclimatation et/ou de l'adaptation à l'aquaculture comme celui qui a été observé chez la truite arc-en-ciel s'avère très intéressant. Dans cette étude, nous avons cherché à voir la mise en place d'une adaptation au point de vue des réponses physiologiques et immunologiques au stress chronique de confinement au cours de la domestication. La perche gardée en captivité semble en effet assez sensible à de nombreuses pathologies comme les infections bactériennes, virales et fongiques régulièrement observées en aquaculture.

A notre connaissance, aucune étude ne s'est jamais penchée sur cette problématique chez la perche. Par contre, de nombreuses études dans ce domaine ont déjà été effectuées sur d'autres espèces comme la truite arc-en-ciel et il s'avère que les stress chronique, comme la forte densité ou le faible volume des bassins, influence négativement le système immunitaire. Un stress aigu, par contre, semble plus conduire à une augmentation des capacités immunologiques des poissons.

Il ressort de notre étude qu'un effet du confinement est visible dans la mesure de certains paramètres. A J7, la cortisolémie est plus élevée chez les poissons confinés, mais cet effet n'est plus visible lors des prélèvements suivants suite à une perturbation par des facteurs extérieurs. Il aurait été intéressant de voir si une acclimatation physiologique tendait à réduire cette cortisolémie au cours du temps. Pendant les 55 jours de l'expérience, la croissance des poissons confinés semble presque stoppée, alors que celle des contrôles continue. A J7 et 55, l'activité du lysozyme, qui semble corrélée, au moins à J7, avec la quantité de cortisol, est plus importante chez les poissons confinés. On peut donc dire que le confinement perturbe les poissons au point de vue certains paramètres physiologiques mais aussi immunologiques.

L'effet d'une adaptation est observé pour quelques paramètres immunologiques et physiologiques. Une diminution de l'Indice Spléno Somatique est observée chez les F4, mais chez ces mêmes poissons, la production de radicaux superoxydes par les macrophages se trouvant dans la rate est plus élevée que chez les F1. Ceci suppose donc que l'aquaculture tend à avoir pour effet de diminuer la taille de la rate, tout en gardant les capacités immunologiques de celle-ci. Au point de vue physiologique, la glycémie des F4 est, tout au long de l'expérience, plus élevée que celle des F1. Cette observation est difficilement explicable et demande des recherches plus approfondies.

Afin de voir si les différences observées au point de vue immunologique entre les différents niveaux de confinement et entre les deux générations induisent une quelconque modification des capacités de défense face à un pathogène, il serait intéressant de contaminer les poissons à l'aide d'une souche bactérienne. De plus, il a été remarqué que les F4 expriment des protéines en plus grand nombre et en plus grande quantité que les F1. Une quantification des différences d'expression observées dans les gels de protéomique, et une identification de ces protéines peut être intéressante dans la recherche de nouveaux bioindicateurs immunologiques ou de stress. La mise au point d'une meilleure technique de détermination des quantités d'immunoglobulines par chromatographie d'affinité par exemple pourrait être intéressante. Enfin, comme très peu d'études se sont intéressées aux perches, une recherche des capacités immunologiques au niveau des reins pourrait peut-être apporter des éléments supplémentaires à nos résultats de même que déterminer si, comme pour d'autres espèces, les capacités du système du complément sont influencées par le confinement ou d'autres formes de stress.

Bibliographie

Bibliographie

1. Acerete,L., Balasch,J.C., Espinosa,E., Josa,A. & Tort,L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* **237**, 167-178 (2004).

2. Auperin,B., Baroiller,J.F., Ricordel,M.J., Fostier,A. & Prunet,P. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* **108**, 35-44 (1997).

3. Aurousseau,B. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, le physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.* **15**, 67-82 (2002).

4. Basheera,J., Chandran,M.R., Aruna,B.V. & Anbarasu,K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 201-207 (2002).

5. Binuramesh,C., Prabakaran,M., Steinhagen,D. & Michael,R.D. Effect of chronic confinement stress on the immune responses in different sex ratio groups of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture* **250**, 47-59 (2005).

6. Boshra,H. & Sunyer,J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* **20**, 239-262 (2006).

7. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).

8. Bruslé,J. & Quignard,J.-P. Biologie des poissons d'eau douce européens. TEC & DOC Ed., (2001).

9. Conte,F.S. Stress and welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* **86** , 205-223 (2004).

10. Couso,N., Castro,R., Magarinos,B., Obach,A. & Lamas,J. Effect of oral administration of gucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture* **219**, 99-109 (2003).

11. Craig,J.F. Percid fishes: Systematics, Ecology and Exploitation. Blackwell Science Ltd, (2000).

12. Cuesta,A., Meseguer,J. & Esteban,M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary immunology and immunopathology* **101**, 203-210 (2004).

13. Dautremepuits,C., Betoulle,S., Paris-Palacios,S. & Vernet,G. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquatic toxicology* **68**, 325-338 (2004).

14. Davis,K.B. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* **139**, 433-440 (2004).

15. Davis,K.B. & Small,B.C. Rates of cortisol increase and decrease in channel catfish and sunshine bass exposed to an acute confinement stressor. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **143**, 134-139 (2006).

16. Demers,N.E. & Bayne,C.J. The immediate effects of stres on hormones ans plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology* **21**, 363-373 (1997).

17. Dini,L., Lanubile,R., Tarantino,P., Mandich,A. & Cataldi,E. Expression of stress proteins 70 in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during confinement and crowding stress. *Italian Journal of Zoology* **73**, 117-124 (2006).

18. Ellis,A.E. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 291-308 (1999).

19. Ellis,A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* **25**, 827-839 (2001).

20. Favier,A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladis et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* **Novembre-Décembre**, 108-115 (2003).

21. Fevolden,S.-E., ROED,K.H. & Fjalestad,K.T. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture* **205**, 61-75 (2002).

22. Fontaine,P. L'élevage de la perche commune, un voie de diversification pour l'aquaculture continentale. *INRA Prod. Anim.* **17 (3)**, 189-193 (2004).

23. Frisch,A. & Anderson,T. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **140**, 317-327 (2005).

24. Gamperl,A.K., Vijayan N.M. & Boutilier,R.G. Experimental control of stress hormone levels in fishes - Techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 215-255 (1994).

25. Gregory,T.R. & Wood,C.M. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology* **72**, 286-295 (1999).

26. Grignard,J.-C., Mélard,C. & Kestemont,P. A preliminary study of parasites and diseases of perch in an intensive culture system. *Journal of applied Ichtyology* **12**, 195-199 (1996).

27. Harris,J. & Bird,D.J. Alpha-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) and melanin-concentrating hormone (MCH) stimulate phagocytosis by head kidney leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 631-638 (1998).

28. Harris,J. & Bird,D.J. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary immunology and immunopathology* **77**, 163-176 (2000).

29. Haux,C., Sjöbeck,M.-L. & Larsson,A. Physiological stress responses in a wild fish population of perch (*Perca fluviatilis*) after capture and during subsequent recovery. *Marine Environmental research* **15**, 77-85 (1985).

30. Head,A.B. & Malison,J.A. Effects of lighting spectrum and disturbance level on growth and stress responses of yellow perche *Perca flavescens*. *Journal of the world aquaculture society* **31**, (2000).

31. Iwama,G.K., Afonso,L.O.B., Todgham,A., Ackerman,P. & Nakano,K. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *The journal of experimental biology* **207**, 15-19 (2004).

32. Jentoft,S., Aastveit,A.H., Torjesen,P.A. & Andersen,O. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (Perca fluviatilis) and domesticated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* **141**, 353-358 (2005).

33. Kestemont,P. & Mélard,C. Percid fishes: Systematics, Ecology and Exploitation. Craig,J.F. (ed.), pp. 191-224 (Blackwell, Oxford,2000).

34. Kumari,J. *et al.* Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. *Aquaculture* **252**, 121-127 (2006).

35. Kültz,D. Evolution of the cellular stress proteome : from monophyletic origin to ubiquitous function. *The journal of experimental biology* **206**, 3119-3124 (2003).

36. Magnadóttir,B. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* **20** , 137-151 (2006).

37. Mandiki,S.N.M. *et al.* Effects of géographic origin on growth and food intake in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) juvenils under intensive culture conditions. *Aquaculture* **229**, 117-128 (2004).

38. Nagae,M. *et al.* The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentration in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiology and Biochemistry* **13**, 41-48 (1994).

39. Narnarware,Y.K., Baker,B.I. & Tomlinson,M.G. The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in ranbow-trout *Onchorynchus-mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* **13**, 31-40 (1994).

40. Narnaware,Y.K. & Baker,B.I. Evidence that cortisol may protect against the immediate effects of stress on circulating leukocytes in the trout. *General and Comparative Endocrinology* **103**, 359-366 (1996).

41. Ortuño,J., Esteban,M.A. & Meseguer,J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 187-197 (2001).

42. Ortuño,J., Esteban,M.A. & Meseguer,J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary immunology and immunopathology* **84**, 17-27 (2002).

43. Pepels,P.P.L.M., van Helvoort,H., Bonga,S.E.W. & Balm,P.H.M. Corticotropin-releasing hormone in the teleost stress response: rapid appearance of the peptide in plasma of tilapia (Oreochromis mossambicus). *Journal of Endocrinology* **180**, 425-438 (2004).

44. Pickering,A.D. & Pottinger,T.G. Stress reponses ans disease resistance in salmonid fish : Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* **7**, 253-258 (1989).

45. Portz,D.E., Woodley,C.M. & Cech,Jr.J.J. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **16**, 125-170 (2006).

46. Pottinger,T.G. & Carrick,T.R. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and Comparative Endocrinology* **116**, 122-132 (1999).

47. Pottinger,T.G. & Carrick,T.R. ACTH does not mediate divergent stress reponsiveness in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **129**, 399-404 (2001).

48. Rotllant,J., Pavlidis,M., Kentouri,M., Abad,M.E. & Tort,L. Non-specific immune reponses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture* **156**, 279-290 (1997).

49. Rotllant,J., Balm,P.H.M., Pérez-Sanchez,J., Wendelaar-Bonga,S.E. & Tort,L. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology* **121**, 333-342 (2001).

50. Rotllant,J. *et al.* Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* **223**, 129-139 (2003).

51. Røed,K.H., Fevolden,S.-E. & Fjalestad,K.T. Disease resistance and immune charactersitics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. *Aquaculture* **209**, 91-101 (2002).

52. Ruane,N.M., Bonga,S.E.W. & Balm,P.H.M. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology* **115**, 210-219 (1999).

53. Ruane,N.M., Carballo,E.C. & Komen,J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp Cyprinus carpio (L.). *Aquaculture Research* **33**, 777-784 (2002).

54. Russel,S., Hayes,M.A., Simko,E. & Lumbsden,J.S. Plasma proteomic analysis of the acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to intraperitoneal inflammation and LPS injection. *Developmental & Comparative Immunology* **30**, 393-406 (2006).

55. Sahoo,P.K., Kumari,J. & Mishra,B.K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of applied Ichtyology* **21**, 151-155 (2005).

56. Schägger,H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**, 16-22 (2006).

57. Small,B.C. & Bilodeau,A.L. Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*)pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *General and Comparative Endocrinology* **142**, 256-262 (2005).

58. Swain,T., Mohanty,J. & Sahu,A.K. On step purification and partial characterisation of serum immunoglobulin from Asiatic catfish (*Clarias batrachus* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **17**, 397-401 (2004).

59. Tort,L., Sunyer,J.O., Gómez,E. & Molinero,A. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary immunology and immunopathology* **51**, 179-188 (1996).

60. Van Weerd,J.H. & Komen,J. The effects of chronis stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **120**, 107-112 (1998).

61. Vandeputte,M. & Prunet,P. Génétique et adaptation chez les poissons : domestication, résistance au stress et adaptation aux conditions de milieu. *INRA Prod. Anim.* **15**, 365-371 (2002).

62. Vazzana,M., Cammarata,M., Cooper,E.L. & Parrinello,N. Confinement stress in sea bass (Dicentrarchus labrax) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* **210**, 231-243 (2002).

63. Watts,M., Munday,B.L. & Burke,C.M. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 491-503 (2001).

64. Weil,L.S., Barry,T.P. & Malison,J.A. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture* **193**, 373-380 (2001).

65. Weyts,F.A.A., Cohen,N., Flik,G. & Verburg-van Kemenade,B.M.L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 1-20 (1999).

66. Whittington,R.J. Purification and partial characterisation of serum immunoglobulin of the European perch (*Perca fluviatilis* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **3**, 331-343 (1993).

67. Wirth,D., Gustin,P., Drion,P.V., Dessy-Doize,C. & Christians,E.S. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). I : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann. Med. Vet.* **146**, 201-216 (2002).

68. Wysocki,L.E., Dittami,J.P. & Ladich,F. Ship noise and cortisol secretien un European freshwater fishes. *Biological conservation* **128**, 501-508 (2006).

69. Yin,Z., Lam,T.J. & Sin,Y.M. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **5**, 519-529 (1995).