

66092  
ES00 - FRO\_A  
OUR 2409

**Ifremer**

**IFREMER, Laboratoire de  
Génétique et Pathologie (LGP)  
Ronce-Les-Bains  
17390 La Tremblade**

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE



Université de la Rochelle  
Département Biologie  
Avenue Michel Crépeau  
17042 La Rochelle Cedex

**FROUIN Héloïse**

Licence de Biologie

Stage non-obligatoire effectué du 28 juin au 30 juillet 2004



**Analyse en cytométrie de flux de l'influence  
de la salinité sur les fonctions hématocytaires de  
l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.**

Responsable scientifique :  
Béatrice Gagnaire (Doctorante)  
LGP  
17390 La Tremblade  
Tel : 05.46.36.98.41

Tuteur pédagogique :  
Hélène Thomas-Guyon  
Laboratoire de Biologie et  
d'Environnement Marin (LBEM)  
17000 La Rochelle

# Sommaire

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	3
<b>A. SYSTÈME IMMUNITAIRE DES MOLLUSQUES BIVALVES</b> .....	3
1. <i>Système circulatoire et cellules de défense</i> .....	3
2. <i>Mécanismes de défense</i> .....	4
<b>B. SALINITÉ ET CONSÉQUENCE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DES BIVALVES MARINS</b> .....	6
<b>III. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	7
<b>A. ANIMAUX</b> .....	7
<b>B. PRÉLÈVEMENT DES HÉMOCYTES</b> .....	7
<b>C. PROTOCOLE D'EXPOSITION AUX DIFFÉRENTES SALINITÉS</b> .....	8
1. <i>Test in vitro</i> .....	8
2. <i>Tests in vivo</i> .....	8
<b>D. ANALYSE EN CYTOMÉTRIE DE FLUX</b> .....	9
1. <i>Principe</i> .....	9
2. <i>Activités cellulaires mesurées</i> .....	11
<b>E. ANALYSE STATISTIQUE</b> .....	14
<b>IV. RESULTATS</b> .....	15
<b>A. EFFETS DE LA SALINITÉ IN VITRO SUR LA SURVIE DES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES</b> .....	15
1. <i>Cas de l'hyposalinité</i> .....	15
2. <i>Cas de l'hypersalinité</i> .....	17
<b>B. EFFET DE LA TEMPÉRATURE IN VIVO SUR LA SURVIE ET LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES</b> .....	20
<b>V. DISCUSSION</b> .....	30
<b>A. TESTS IN VITRO</b> .....	30
1. <i>Cas de l'hyposalinité</i> .....	31
2. <i>Cas de l'hypersalinité</i> .....	31
<b>2. TESTS IN VIVO</b> .....	32
<b>VI. CONCLUSION</b> .....	34
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	35
<b>VII. ANNEXES</b> .....	40

## I. INTRODUCTION

L'élevage des coquillages ou conchyliculture est une activité ancestrale sur les côtes françaises. Elle représente aujourd'hui une activité économique majeure en France avec plus de 270 000 tonnes de coquillages produits par an.

L'ostréiculture (culture des huîtres) française représente plus de la moitié de la production aquacole (68 % du tonnage des coquillages d'intérêts économiques produits en France en 1996, données FAO (Food and Agriculture Organization)). Elle concerne deux espèces, l'huître plate, *Ostrea edulis* et l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. La production française d'huîtres suffit à la totalité de la consommation nationale.

L'élevage de *C. gigas* représente 135 500 t/an en France. Il comprend deux phases principales: la récolte des larves – ou captage – autour de supports collecteurs qui sont recouverts par un naissain pendant six mois ou plus; puis le transfert de la jeune huître vers un parc où elle subira, pendant dix-huit mois à trois ans, une phase d'engraissement.

Cependant, ces productions sont sujettes à des fluctuations importantes au cours du temps, les maladies infectieuses étant un des facteurs limitant essentiel pour toutes les espèces exploitées commercialement. La propagation de ces infections peut être facilitée par les fortes densités d'animaux présents dans les élevages. De plus, les variations des facteurs environnementaux (température, salinité, pH, luminosité, etc) pour ces animaux le plus souvent élevés en milieu ouvert (estran), peuvent également agir comme des facteurs favorisant l'apparition et le développement des infections (Hauton *et al.*, 2000). En effet, la plupart des espèces de mollusques bivalves marins sont des organismes benthiques (fixés sur le fond) et sédentaires. C'est pourquoi ce mode de vie les expose à toute modification physico-chimique de leur environnement, sans possibilité de fuite. Ainsi, de graves épidémies ont abouti dans les années 70 à la disparition de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, que l'huître creuse, *C. gigas*, a remplacée. Ce sont également des épidémies qui ont conduit à l'importante baisse de production de l'huître plate, *O. edulis*.

Afin de mieux comprendre et lutter contre les maladies infectieuses, qui peuvent être un frein à la rentabilité des élevages, l'étude du système immunitaire et la compréhension des capacités de défense chez les coquillages sont les clés nécessaires au bon développement de la conchyliculture. C'est ainsi que depuis quelques années, l'étude de la modulation du système

immunitaire chez les mollusques bivalves marins est devenue l'une des voies de recherche privilégiée pour l'évaluation des effets de facteurs environnementaux.

Le système de défense des huîtres repose essentiellement sur des cellules circulantes, les hémocytes, qui possèdent différentes activités, notamment la phagocytose, la production et la libération de molécules actives et la destruction de corps étrangers (virus, bactéries, parasites) (Cheng, 1981).

Depuis 1995, des mortalités importantes de cheptels d'huîtres sont constatées chaque année, durant la période estivale. Ce phénomène est étudié depuis plusieurs années à l'IFREMER, et il apparaît qu'un ensemble de facteurs puisse jouer un rôle dans le déclenchement de cette mortalité (fortes températures, richesse en nutriments, présence de pathogènes, stress physiologiques associés à la maturation sexuelle, etc) (Gouletquer *et al*, 1998). Parmi ces facteurs, la salinité peut avoir un rôle important. En effet, l'ostréiculture est réalisée dans des zones d'estuaires, qui reçoivent les apports des bassins versants et notamment les eaux de pluies. Ainsi, dans le milieu naturel des huîtres, la variation de salinité est notamment due aux cycles des marées, aux précipitations et au drainage des terrains adjacents (Tirard *et al.*, 1997). En été, les huîtres peuvent être soumises à des variations de salinités très importantes liées à l'évaporation et à l'émersion.

Le présent travail a donc consisté à analyser les effets des variations d'un paramètre physico-chimique du milieu, la salinité, sur les capacités hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Afin de répondre à cette problématique, des expériences ont été réalisées *in vivo* et *in vitro* en maintenant respectivement des huîtres et des hémocytes à différentes salinités. La réponse immunitaire a été évaluée par le suivi de différents paramètres hémocytaires. L'outil d'analyse choisi a été la cytométrie de flux pour ses nombreuses possibilités d'analyses au niveau cellulaire.

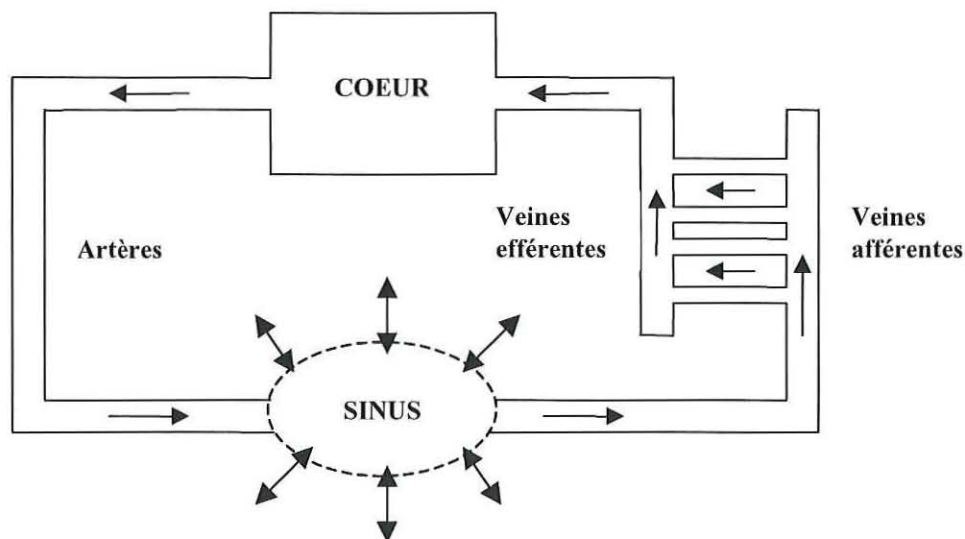
## II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### A. Système immunitaire des mollusques bivalves

#### 1. Système circulatoire et cellules de défense

##### ❖ Appareil hémolympathique

Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur, des vaisseaux et des sinus, où circule l'hémolymphe (Figure 1) (Cheng, 1981). Les hémocytes peuvent être présents dans différents compartiments tels que le compartiment circulatoire et les tissus.



**Figure 1** : Diagramme schématisé représentant le système circulatoire chez les Mollusques bivalves. (modifié d'après Cheng, 1981; issu de Gagnaire, 2001).

##### ❖ Les hémocytes

Les hémocytes sont considérés comme le principal système de défense et jouent un rôle essentiel dans l'inflammation, la réparation des tissus endommagés, ainsi que dans la phagocytose et l'encapsulation de corps étrangers.

Actuellement, différentes sous-populations hémocytaires ont été identifiées. Cependant, leur description est souvent incomplète et la nomenclature hétérogène. Tout de même, il semblerait qu'il existe deux principaux types d'hémocytes observés chez les mollusques bivalves : les hémocytes granuleux (comprenant différents types de granulocytes) et les

hémocytes agranuleux (comprenant les « macrophage-like », les hyalinocytes et les « monocyte-like ») (Auffret, 1985).

Les fonctions des différentes sous-populations hémocytaires sont encore mal déterminées, mais l'observation cellulaire des hémocytes montrent des différences structurales suggérant la possibilité de fonctions différentes. Les hyalinocytes présentent les caractéristiques morphologiques de cellules peu différenciées. Dans tous les cas, ces cellules sont équipées d'un appareil lysosomal (Auffret, 1985).

## 2. Mécanismes de défense

Le système immunitaire des invertébrés repose essentiellement sur des défenses innées, et ne possède pas de mémoire immunitaire. Ils ne peuvent donc pas produire d'immunoglobuline. Afin de se défendre, les mollusques bivalves mettent en place deux grandes sortes de mécanismes :

### ❖ Défense immunitaire à médiation cellulaire :

#### - Agrégation hémocytaire :

L'agrégation des hémocytes dites spontanée est un phénomène, en l'absence de pathogène, qui a lieu lors d'un stress (Gagnaire, 2002). En général, le contact avec des objets ou l'agitation mécanique peuvent servir de stimulus (Auffret et Oubella, 1997).

#### - Phagocytose :

C'est un phénomène majeur de défense chez les mollusques bivalves. Les hémocytes des mollusques bivalves peuvent phagocyter de nombreux micro-organismes et particules, dont les bactéries, levures, virus, globules rouges, protéines, etc (Auffret, 1985). La phagocytose peut-être décomposée en quatre phases : attraction, adhérence, internalisation et destruction (Cheng et Rodrick, 1975 ; Cheng, 1983). Les trois premières étapes reposent sur des capacités de locomotion, transformation et communication hémocyte-cible. La quatrième étape qui est celle de la destruction, peut faire intervenir deux types de mécanismes afin de détruire les particules phagocytées :

- le premier mécanisme est dépendant de l'oxygène (flambée oxydative). Il correspond à la libération de radicaux toxiques de l'oxygène. La production de ces formes intermédiaires

réactives de l'oxygène est initié par l'attachement des particules à la surface de la membrane cytoplasmique des cellules. L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les composants intermédiaires avec une haute activité bactéricide, font partie des ROS (Reactive Oxygen Species) (Pipe, 1992).

- le second mécanisme dépend principalement des enzymes lysosomiales. Les particules étrangères sont internalisées dans une vacuole de phagocytose. Cette dernière va alors fusionner avec des lysosomes contenant des enzymes hydrolytiques, formant ainsi un phagolysosome à l'intérieur duquel les enzymes sont relarguées pour détruire les particules étrangères. Les particules phagocytées sont généralement dégradées par les enzymes lysosomiales hydrolytiques issu des hémocytes (Lopez *et al.*, 1997). Dans de nombreux cas, les enzymes lytiques, et les lysosomes en particulier, peuvent être relâchés dans l'hémolymphe durant la phagocytose, ainsi ils participent à l'inactivation des microbes arrivant (Cheng et Rodrick, 1975 ; Mohandas *et al.*, 1985).

#### ❖ Défense immunitaire à médiation humorale

Elle correspond à la production de substances circulantes intervenant dans les réactions de défense (lysozyme, enzymes lysosomiales, peptides antimicrobiens) (Pipe, 1990). Le lysozyme est une enzyme bactériologique retrouvée dans le sérum comme dans les hémocytes des bivalves, notamment chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Cheng et Rodrick, 1975 ). Les autres enzymes lysosomiales ( $\beta$ -glucuronidase, phosphatase, estérase, peroxydase, aminopeptidase, etc) sont également présentes dans les hémocytes d'huître (Xue et Renault, 2000). Les estérases participent à la dégradation intracellulaire des corps étrangers (Auffret, 1985). Les aminopeptidases catalysent l'hydrolyse du peptide N-terminal des protéines et dégradent des protéines de surface des parasites (Cheng *et al.*, 1978). Les peroxydases interviennent dans la flambée oxydative.

En plus de leur implication dans le système immunitaire, les hémocytes jouent également un rôle dans le transport et la digestion des nutriments, dans la réparation des blessures et de la coquille.

## B. Salinité et conséquence sur le système immunitaire des bivalves marins

Chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, l'élévation rapide de la salinité ralentit l'étalement et le déplacement des hémocytes. Cependant la diminution de la salinité accroît plutôt les activités hémocytaires (Fisher et Newell, 1986 ; Fisher, 1988). Chez cette même espèce, le pourcentage des hémocytes agranuleux est plus important pour les animaux provenant de sites où la salinité naturelle est élevée (Fisher et Tamplin, 1988). Fisher *et al.* (1987) ont montré que la capacité de phagocytose des hémocytes de l'huître plate, *Ostrea edulis*, est diminuée de manière significative lorsque que les huîtres sont transférées d'une eau à 30‰ dans une eau à 15‰ en salinité. Les effets de la salinité du milieu sur les hémocytes correspondraient aux capacités des cellules à ajuster leur osmolalité (Fisher et Newell, 1986). En effet, face à des variations importantes de paramètres environnementaux tels que la salinité, les huîtres tentent de réguler leur milieu interne. Les activités lysosomiales dans l'hémolymphe de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, maintenue en salinité élevée sont plus faible que chez les animaux élevés à faible salinité (Chu *et al.*, 1993). Des expériences d'infection expérimentales réalisée à des salinités de 3‰, 10‰ et 20‰, montrent que les fortes infections à *Perkinsus marinus* ne sont observées que pour les animaux maintenus dans une eau ayant une salinité de 10‰ et 20‰ (Chu *et al.*, 1993). Ces observations sont confirmées par les données épidémiologiques recueillies lors d'épisodes d'infections survenant dans le milieu naturel (Burreson et Ragone Calvo, 1996).

Par ailleurs très peu d'études ont été effectuées chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, sur les effets de la salinité.



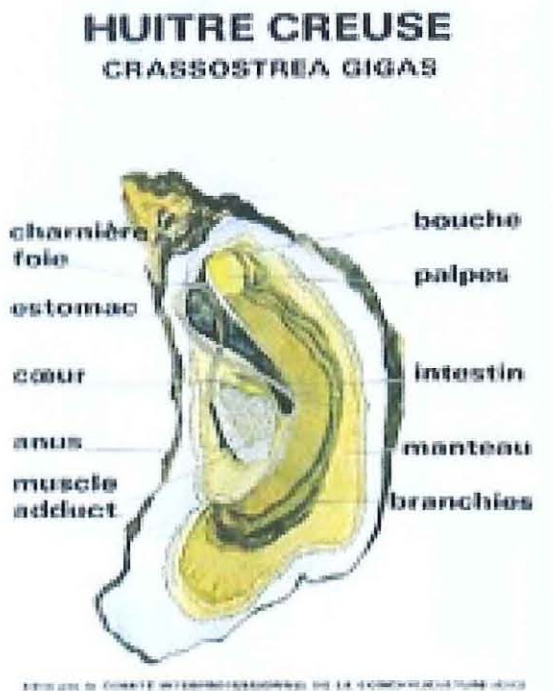
### III. MATERIELS ET METHODES

#### A. Animaux

Tous les animaux utilisés pour les expériences *in vivo* provenaient de familles d'huîtres creuses produites à l'écloserie de l'IFREMER La Tremblade dans le cadre du programme de suivi des mortalités estivales (MOREST). Les huîtres creuses utilisées dans les expériences *in vitro* comme source d'hémocytes provenaient d'un ostréiculteur du Bassin de Marennes-Oléron. Les huîtres étaient stockées en dégorgeoir à la station de l'IFREMER. Les individus utilisés étaient des animaux âgés d'approximativement 2 ans, de longueur comprise entre 3,4 à 9,3 cm. Aucune distinction de sexe n'a été faite dans cette étude et par conséquent les animaux échantillonnés étaient un mélange de mâles et femelles.

#### B. Prélèvement des hémocytes

L'hémolymphe a été prélevé dans le muscle adducteur de l'huître. Au moyen d'une pince, un trou a été percé dans la coquille, puis une ouverture a été réalisée au couteau. Au moyen de cette brèche la ponction a été réalisée à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0,9x25 mm dans le muscle adducteur.



**Figure 2 :** morphologie de *Crassostrea gigas*

Pour chaque huître, 0,5 à 1 mL d'hémolymphe a été prélevé. La quantité d'huîtres ponctionnées était en fonction des analyses à effectuer. Le prélèvement a été filtré sur 60µm afin de réduire la présence de débris de tissus ou de gamètes femelles. Les hémocytes prélevés ont été placés dans la glace le temps de réaliser les expériences de façon à éviter l'agrégation hémocytaire. Une fois l'hémolymphe prélevée, un comptage a été effectué sur cellule de Malassez et la concentration en hémocytes a été ramenée à 10<sup>6</sup> cellules par mL par ajout de EDL (Eau De Lewis, eau de mer artificielle) (composition : cf. Annexe 1).

## C. Protocole d'exposition aux différentes salinités

### 1. Test *in vitro*

- Différents degrés d'hyposalinité

Le pool d'hémolymphe a été divisé en 8 tubes, puis les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 4°C à 1500 tours/min. Après avoir mis de côté le surnageant de chacun des tubes, les cellules ont été reprises dans un mélange hémolymphe – EDL – eau distillée (ED). Le volume final était toujours le même dans tous les tubes de manière à obtenir une concentration cellulaire identique.

Dans le tube 1, les cellules ont été reprises dans le surnageant préalablement isolé (témoin).

Dans les tubes 2 à 7, un volume de plus en plus important d'ED a été rajouté, de manière à obtenir 1/10<sup>ème</sup>, 2/10<sup>ème</sup>, 3/10<sup>ème</sup>, 5/10<sup>ème</sup>, 8/10<sup>ème</sup>, 9/10<sup>ème</sup> de  $\mu$ volume final en ED.

Dans le tube 8, les cellules ont été reprises uniquement en ED (10/10<sup>ème</sup>).

Les cellules ont été maintenues pendant 19 heures à 15°C. Les analyses en cytométrie de flux ont été réalisées après 2 heures et 19 heures d'exposition. Cette expérience a été réalisée 4 fois.

- Différents degrés d'hypersalinité

Le pool d'hémolymphe a été divisé en 8 tubes.

Dans le tube 1, l'hémolymphe a été conservé telle quelle et aucune addition de sel d'aquarium n'a été effectuée (témoin).

Dans les tubes 2 à 8 des quantités de sel d'aquarium (Instant Océan d'Aquarium Systems, sel de mer synthétique sans nitrate et sans phosphate) de plus en plus importantes ont été rajoutées afin d'obtenir une élévation de salinité de l'hémolymphe des huîtres (31,4 ‰) de 5 ‰, 8 ‰, 10 ‰, 12 ‰, 15 ‰, 18 ‰ et 20 ‰. Cette expérience a été réalisée 3 fois.

### 2. Tests *in vivo*

- Premier test

Les huîtres ont été exposées à différentes salinités : 15 ‰ (hyposalinité), 34 ‰ (témoin) et 45 ‰ (hypersalinité). 38 huîtres ont été placées dans le bac à 15 ‰, 40 huîtres dans le bac à 45 ‰ et 36 huîtres dans le bac témoin. Les huîtres ont été disposées dans des bacs de 40 L d'eau. La salinité de 15 ‰ a été obtenue en mélangeant 25 L d'eau douce et 15 L d'eau de mer. La salinité de 45 ‰ a été obtenue en ajoutant 516 g de sel d'aquarium

(Instant Océan d' Aquarium Systems, sel de mer synthétique sans nitrate et sans phosphate) à de l'eau de mer. Le bac d'hypersalinité été préparé la veille afin de permettre une meilleure homogénéisation du milieu suite à la dissolution du sel.

Les huîtres ont été nourries avec du *Chaetoceros gracialis* (diatomées). Chaque bac a reçu 3 L d'une solution de concentration moyenne de  $10^6$  cellules/mL.

L'expérience a duré 7 jours. L'eau et l'apport de nourriture ont été renouvelés tous les jours. Des prélèvements ont été effectués à J0, J1, J3 et J7. A J0, 10 huîtres ont été prélevées avant le début de l'expérience. A J1, J3 et J7, 10 huîtres de chaque bac ont été prélevées. Les 10 huîtres d'un lot ont été réparties en 3 pools de 3 et l'hémolymphe a été ponctionné comme décrit précédemment. L'hémolymphe de la 10<sup>ème</sup> huître a été répartie de manière égale dans les 3 pools. Les hémocytes ont ensuite été analysés en cytométrie de flux.

- Deuxième test

La même expérience a été répétée avec des conditions de salinité différentes : 5 ‰ (hyposalinité), 34 ‰ (témoin) et 60 ‰ (hypersalinité). 40 huîtres ont été déposées dans le bac à 5 ‰, 37 dans le bac à 60 ‰ et 37 dans le bac témoin. La salinité de 5 ‰ a été obtenue en mélangeant 35 L d'eau douce et 5 L d'eau de mer. La salinité de 60 ‰ a été obtenue en ajoutant 1219 g de sel d'aquarium (Instant Océan d' Aquarium Systems, sel de mer synthétique sans nitrate et sans phosphate) à de l'eau de mer.

## D. Analyse en cytométrie de flux

### 1. Principe

La cytométrie de flux consiste à étudier les caractéristiques de particules (cellules). Les cellules passent devant un laser qui les excite. Ces dernières émettent alors un rayonnement. C'est à partir de ce rayonnement que de nombreuses informations sur les caractéristiques des cellules peuvent être obtenues. Ces informations sont obtenues de manière directe (autofluorescence des cellules) ou par l'intermédiaire de composés fluorescents (marquage à l'aide de fluorochromes).

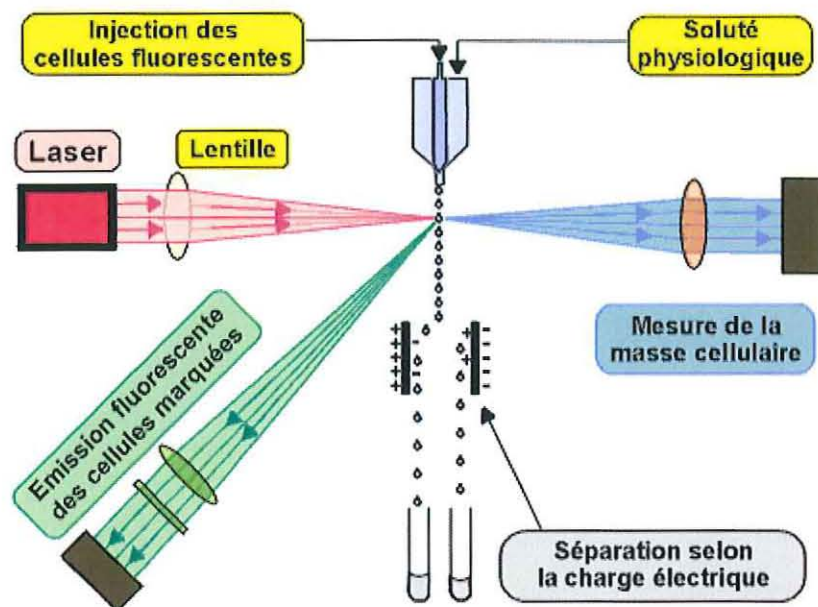
Le cytomètre de flux se décompose en trois parties distinctes : fluïdique, optique et électronique, gérées au moyen d'une interface informatique.

Le cytomètre utilisé est un EPICS XL4 (Beckman Coulter).

Les cellules sont alignées au sein d'une gaine au moyen d'un flux liquide coaxial (solution saline isotonique). Elles sont acheminées vers un système optique (Figure 3). Ce

Le système se compose d'une source lumineuse et de miroirs dichroïques (optiques de réception). La source lumineuse est un laser à ions argon qui produit une lumière monochromatique (488 nm), unidirectionnelle et stable. Des lentilles permettent de focaliser le faisceau laser. Après excitation des cellules par le laser, les signaux émis sont transmis par l'optique de réception vers les détecteurs où ils sont mesurés et quantifiés.

Les signaux sont alors amplifiés par des photomultiplicateurs et transformés en signaux électriques. Ils sont ensuite triés et répartis en fonction de leur voltage respectif. Les signaux de même tension se retrouvent regroupés dans le même canal. Un canal correspond à 0,01 volt et le voltage maximum étant de 10,24 volts, 1024 canaux sont disponibles pour l'analyse des événements.



**Figure 3** : Principe de la cytométrie de flux; PMT : photomultiplicateur

Une fois le tri réalisé, les données sont analysées et rapportées sous forme d'histogrammes ou de cytogrammes grâce à l'interface informatique. Certains d'entre eux sont analysés directement sur la base de l'autofluorescence des cellules et d'autres demandent une étape préalable au cours de laquelle un fluorochrome (iodure de propidium, billes fluorescentes...) est incorporé à la cellule. En effet, toutes les cellules émettent une fluorescence naturelle de faible intensité, dite autofluorescence, qu'il est possible d'analyser en cytométrie de flux. Dans le cas d'une mesure directe (sur les cellules non marquées) la mesure se fait sur des rayons diffractés (modification de la direction sans modification de la longueur d'onde). les paramètres ainsi mesurés sont la taille (Forward Scatter height : FSC) et la complexité (Size

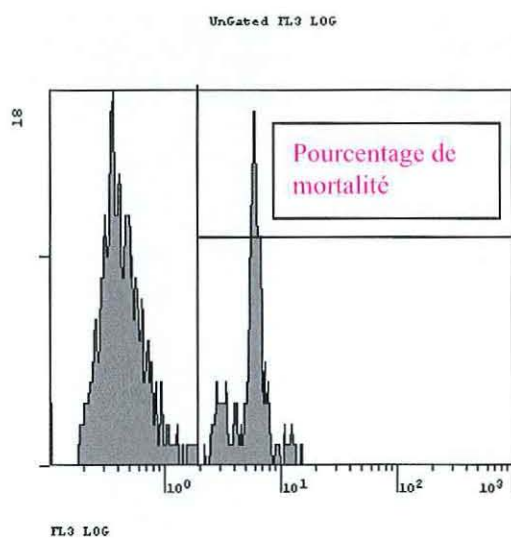
Scatter height : SSC) des cellules étudiées. C'est la mesure des rayonnements diffractés à petit angle (inférieur à  $10^\circ$ ) qui permet de déterminer la taille. Plus la cellule est petite, plus la diffraction est faible. La mesure de la lumière diffractée ou réfléchie à grand angle (inférieur à  $90^\circ$ ) permet d'analyser la complexité. Dans ce cas, la diffraction est fonction de la richesse des cellules en organites et de leur complexité structurale.

Certaines analyses nécessitent l'utilisation de composés fluorescents (fluorochromes). Les analyses sont basées sur la capacité de ces composés à absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée, puis de la réémettre à une longueur d'onde différente après excitation. Le cytomètre EPICS XL4 (Beckman Coulter) possède quatre lentilles permettant de recueillir quatre longueurs d'onde différentes : le vert de 500 à 550 nm (détecteur FL1), le jaune de 550 à 600 nm (détecteur FL2), l'orange et le rouge de 560 à 670 nm (détecteur FL3), et le rouge uniquement de 640 à 700 nm (détecteur FL4).

## 2. Activités cellulaires mesurées

Pour chaque paramètre cellulaire mesuré, le nombre d'événements analysés a été fixé à 3000. Les résultats ont été exprimés sous forme de cytogramme indiquant la taille (FSC), la complexité (SSC) ainsi que le canal de fluorescence correspondant à l'activité testée. Les activités cellulaires suivantes ont été mesurées : la viabilité cellulaire, la phagocytose et la présence d'enzymes lysosomiales (estérases), les lysosomes et les granulocytes.

### - Analyse de la viabilité cellulaire



**Figure 4** : cytogramme de mortalité hémocytaire (protocole utilisé au LGP).

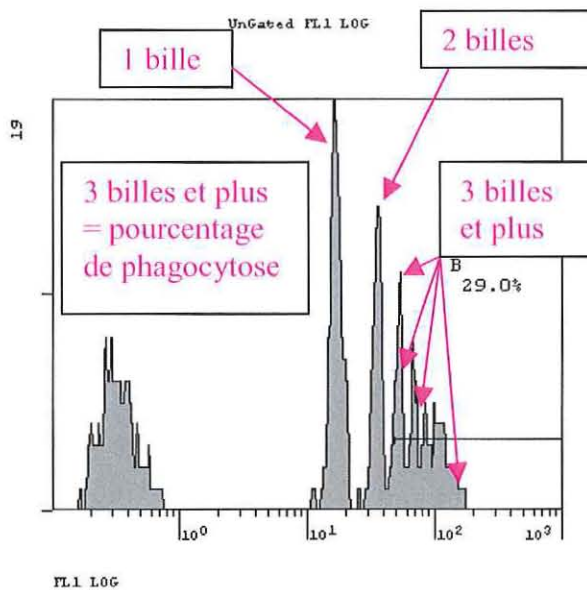
200  $\mu$ L d'hémolymphe fraîchement prélevée ont été incubé en présence de 10  $\mu$ L d'iodure de propidium (IP), un intercalant des acides nucléiques double brin, pendant 30 minutes à l'obscurité dans de la glace. L'IP a été utilisé à une concentration finale de 10  $\mu$ g/mL. Ce produit ne pénètre que dans les cellules présentant des lésions des membranes cytoplasmiques, c'est à dire les cellules mortes. L'IP se fixe à l'ADN ou l'ARN en le colorant. Les cellules mortes possèdent

donc une fluorescence rouge intense (600-650 nm), détectée en FL3. Les résultats sont rapportés sous forme d'histogramme d'intensité de fluorescence en FL3 et des pourcentages de cellules mortes sont calculés.

- *Détermination du pourcentage de granulocytes*

La détermination de pourcentage de granulocytes s'est effectué sur les cytogrammes de la viabilité cellulaire. Pour chaque analyse, les informations concernant la taille et la complexité des particules analysées ont été rapportées. Le pourcentage de différentes populations cellulaires a pu être déterminé, en définissant des zones sur la base des paramètres de taille et de complexité.

- *Test de phagocytose*



**Figure 5 :** cytogramme d'activité de phagocytose (protocole utilisé au LGP).

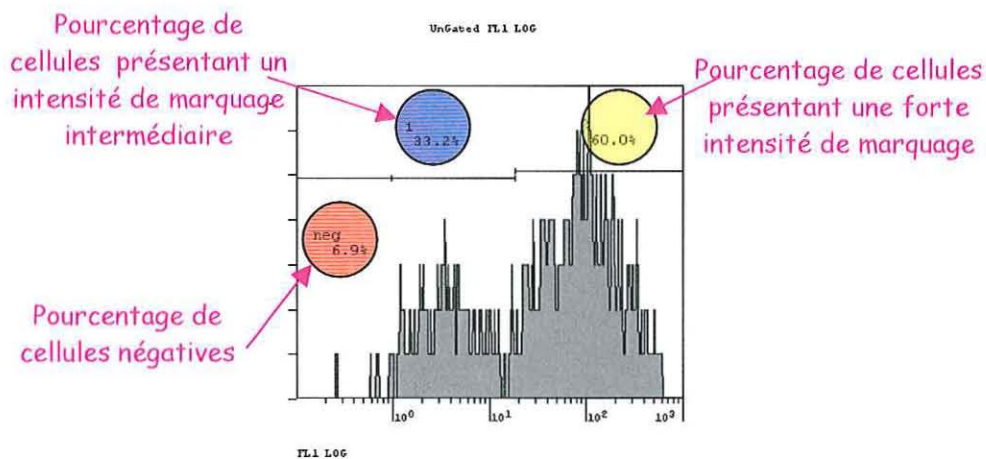
Après une dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la solution mère dans de l'eau distillée, un volume de 10 µL de billes (fluorosphères carboxylate-modified microsphères yellow-green fluorescent (505/515), 2% solid) de 1 µm de diamètre a été rajouté à 200 µL d'hémolymphe. L'incubation a duré 1 heure, à température ambiante et à l'obscurité. Lorsque les billes sont phagocytées, les cellules émettent une fluorescence correspondant à la présence d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) porté par les billes. Plusieurs billes peuvent être phagocytées par une même cellule

Les événements correspondant à une intensité de fluorescence égale ou supérieure à celle de trois billes sont comptabilisés comme des cellules présentant une activité phagocytaire. En effet, on ne tient pas compte de la fluorescence correspondant à 1 et 2 billes car elle n'est pas caractéristique de la phagocytose : elles peut correspondre à la présence de billes collées à la surface des cellules. Les résultats des analyses sont rapportés sous forme d'un cytogramme de

fluorescence en FL1 avec le nombre de cellules fluorescentes en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse.

- *Test des estérases*

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  de fluorescéine diacétate (FDA) a été ajouté à 200  $\mu\text{L}$  d'hémolymphe. Une incubation de 30 minutes a été réalisée à l'obscurité et à température ambiante. Après le temps d'incubation, la réaction a été stoppée sur la glace à l'obscurité jusqu'à la mesure au cytomètre. Le FDA est un substrat pour les enzymes estérases, lié à un fluorochrome de façon à ce que l'ensemble soit non fluorescent et puisse pénétrer dans les cellules. Si l'enzyme est présente, elle dégrade le substrat, ce qui coupe la liaison avec le fluorochrome associé qui émet alors une fluorescence. Ce dernier n'étant pas liposoluble, il se trouve emprisonné à l'intérieur de la cellule. On peut donc mesurer par cytométrie en flux l'intensité de fluorescence qui donne une information qualitative et quantitative sur l'activité enzymatique. Les résultats des analyses sont rapportés sous forme d'un histogramme de fluorescence en FL1 avec le nombre de cellules fluorescentes en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse. Seules les cellules présentant une forte intensité de marquage ont été considérées dans les analyses.

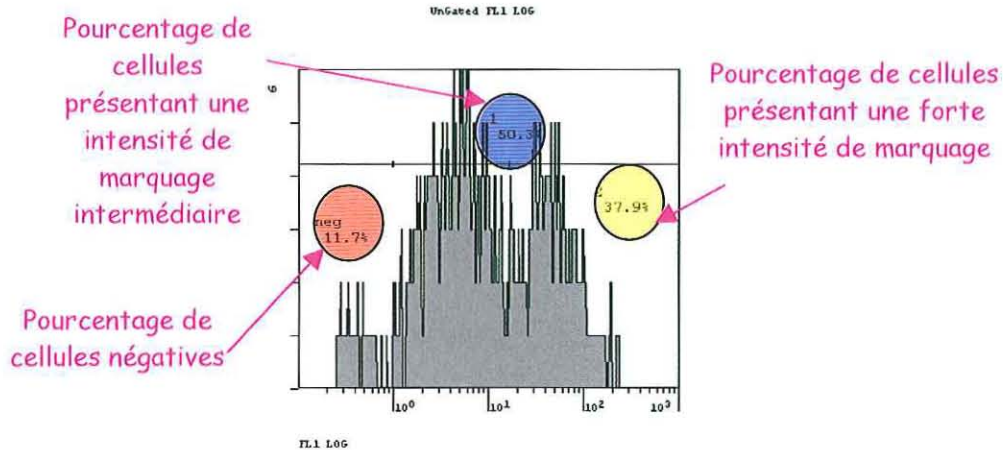


**Figure 6 :** cytogramme d'activité estérasique (protocole utilisé au LGP).

- *Test des lysosomes*

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  de lysotracker green DND-26 (1mM solution in DMSO, special packaging) a été ajouté à 200  $\mu\text{L}$  d'hémolymphe. Une incubation de 2 heures a été réalisée à

l'obscurité et à température ambiante. Après le temps d'incubation, la réaction a été stoppée sur la glace à l'obscurité jusqu'à la mesure au cytomètre. Ce marqueur s'accumule dans les compartiments acides. Les résultats des analyses sont rapportés sous forme d'un histogramme de fluorescence en FL1 avec le nombre de cellules fluorescentes en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse. Seules les cellules présentant une forte intensité de marquage ont été considérées dans les analyses.



**Figure 7** : cytogramme d'activité lysosomiale (protocole utilisé au LGP).

### E. Analyse statistique

Les données sont rapportées sous forme de proportions. Le fait de pooler les hémolymphes et de réaliser par la suite des prélèvements aléatoires pour constituer les aliquots rendent les échantillons indépendants. Suite à une transformation ( $\text{ArcSin}\sqrt{x}$ ) des valeurs, la normalité des données a été recherchée au moyen du logiciel StatGraphics 5.1. Des analyses de variances (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs ont été réalisées. Dans le cas d'un rejet de l'hypothèse d'égalité des moyennes, un test à *posteriori* a été effectué.



## IV. RESULTATS

### A. Effets de la salinité *in vitro* sur la survie des fonctions hémocytaires

#### 1. Cas de l'hyposalinité

Quatre essais ont été effectués (Figures 8 et 9). (Annexes 2 et 3).

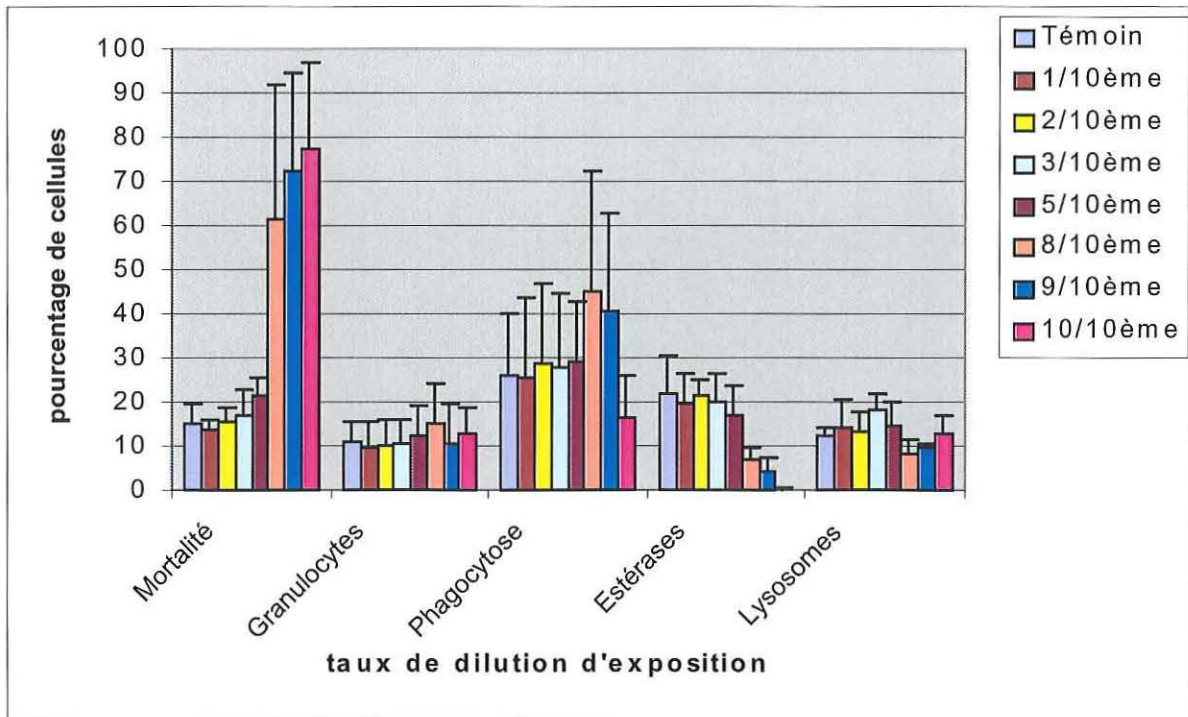
Après 2 heures d'exposition, la mortalité des hémocytes a augmenté de manière significative lorsque la dilution croît de 0 à  $10/10^{\text{ème}}$  (dilution complète) (respectivement 14,83 % à 77,28 %). La mortalité est significativement supérieure à partir de la dilution  $8/10^{\text{ème}}$  ( $p < 0,001$ ). Le taux de mortalité de la dilution  $10/10^{\text{ème}}$  est 5 fois supérieur à celui observé à la dilution 0 (témoin).

Le pourcentage de granulocytes a varié entre 9,73 % et 15,23 % pour la gamme de dilution testée. Cependant les variations n'étaient pas significatives.

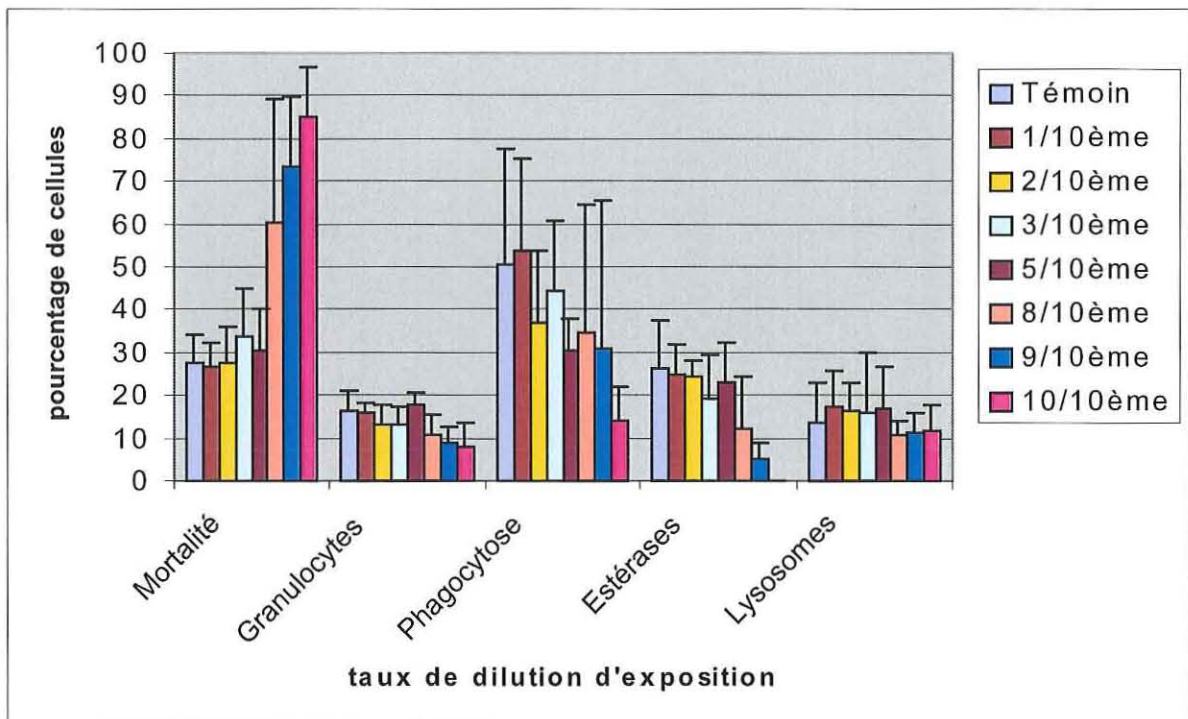
Le pourcentage de phagocytose a présenté peu de variations entre 0 et  $5/10^{\text{ème}}$ . La valeur maximale a été atteinte pour  $8/10^{\text{ème}}$  (44,80 %). Le pourcentage de phagocytose a ensuite diminué jusqu'à  $10/10^{\text{ème}}$  (16,4 %). Cependant ces variations n'étaient pas significatives.

Pour les estérases, le pourcentage de cellules positives a diminué avec l'augmentation du taux de dilution. Cette diminution n'a pas été significative pour les premières dilutions (entre le témoin et  $5/10^{\text{ème}}$ ). Cependant à partir de  $8/10^{\text{ème}}$ , la diminution est devenue significative ( $p < 0,001$ ). Les plus faibles valeurs ont été obtenues pour la dilution  $10/10^{\text{ème}}$ .

Pour les lysosomes, le pourcentage de cellules a varié entre 8,03 % et 18,30 %. Les valeurs ont augmenté de 0 à  $3/10^{\text{ème}}$  (12,28 % à 18,30 %). Puis elles ont diminué (8,03 % pour  $8/10^{\text{ème}}$ ). Enfin, une légère augmentation a été observée entre  $8/10^{\text{ème}}$  et  $10/10^{\text{ème}}$  (12,70 %). Cependant les variations n'étaient pas significatives.



**Figure 8 :** Evolution des paramètres des hémocytes maintenus *in vitro* 2 heures à différentes dilutions. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de quatre mesures (4 essais).



**Figure 9 :** Evolution des paramètres des hémocytes maintenus *in vitro* 19 heures à différentes dilutions. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de quatre mesures (4 essais).

Après 19 heures d'exposition aux différents taux de dilution, la mortalité hémocytaire a augmenté de manière régulière jusqu'à 10/10<sup>ème</sup> (85,03 %). La mortalité à 10/10<sup>ème</sup> était significativement plus importante qu'à 8/10<sup>ème</sup>, qui elle-même était significativement plus importante que les dilutions moins fortes  $p < 0,001$ ).

Le pourcentage de granulocytes a varié entre 8,15 % et 17,58 %. La valeur la plus forte a été observée pour la dilution 5/10<sup>ème</sup> (17,58 %). Le pourcentage de granulocytes pour la dilution 10/10<sup>ème</sup> était significativement inférieur à la valeur 5/10<sup>ème</sup> ( $p < 0,05$ ).

Le pourcentage des hémocytes présentant une activité phagocytaire a varié entre 30,40 % et 53,68% entre le témoin et la dilution 9/10<sup>ème</sup>. Pour la dilution 10/10<sup>ème</sup> le pourcentage a chuté à 14,10 %. Cependant, ces variations étaient non significatives.

Pour les estérases, le pourcentage de cellules positives a peu varié jusqu'à la dilution 5/10<sup>ème</sup>, puis a diminué significativement pour les dilutions 8/10<sup>ème</sup>, 9/10<sup>ème</sup> et 10/10<sup>ème</sup> ( $p < 0,001$ ). La valeur a atteint 0,08 % pour la dilution complète.

Pour les lysosomes le pourcentage de cellules positives a varié entre 10,98 % et 17,23 % pour la gamme de dilution testée. Les variations n'étaient pas significatives.

Sur l'ensemble des expériences, les deux paramètres qui ont été modifiés significativement par la salinité, étaient la mortalité cellulaire ( $p < 0,01$ , maximale pour 10/10<sup>ème</sup>) et le pourcentage de cellules positives pour les estérases ( $p < 0,01$ , minimale pour 10/10<sup>ème</sup>).

## *2. Cas de l'hypersalinité*

Trois essais ont été effectués (Figures 10 et 11). (Annexes 4 et 5).

Après 2 heures d'exposition, la mortalité des hémocytes a diminué de plus de 50 % entre le témoin et l'augmentation de salinité de 5 ‰ (9,80 % et 4,17 %). Puis entre l'augmentation de salinité de 8 ‰ et l'augmentation de 20 ‰, la mortalité a varié entre 4 % et 5,37 %.

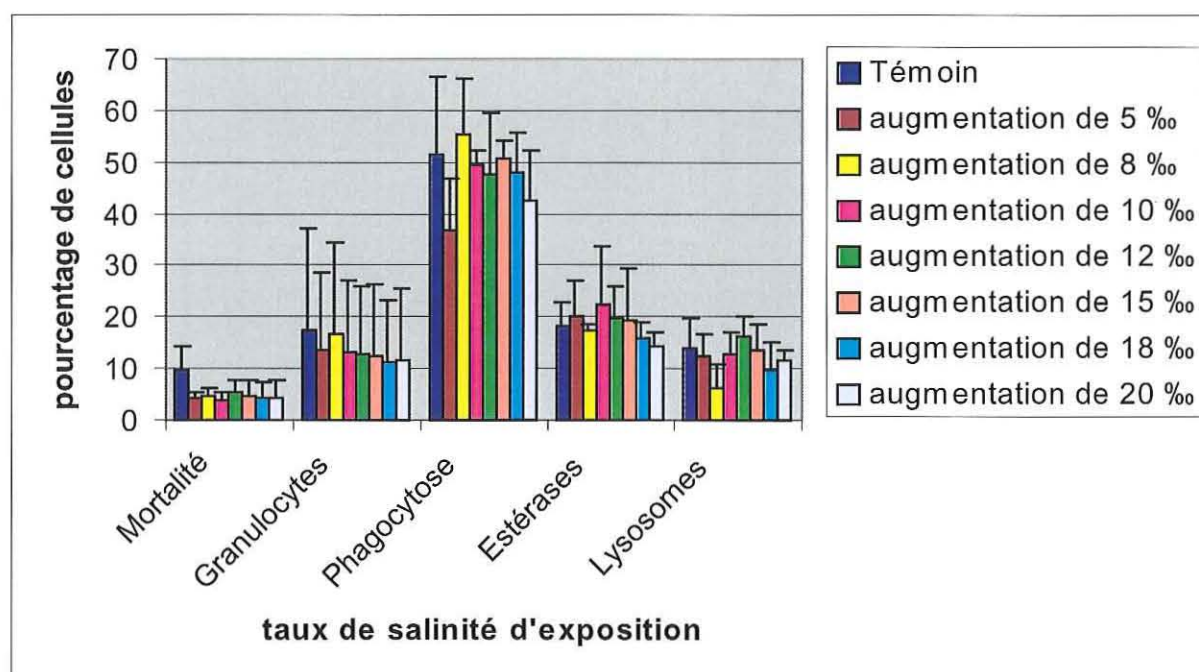
Le pourcentage de granulocytes a diminué lorsque la salinité a augmenté (17,40 % à 11,73 %). La valeur minimale a été atteinte pour une augmentation de salinité de 18 ‰ (11,13 %).

Le pourcentage de phagocytose a diminué entre le témoin et l'augmentation de salinité de 5 ‰ où la valeur était minimale (51,60 % et 36,80 %). Puis le pourcentage de phagocytose a augmenté jusqu'à un maximum, lorsque la salinité a augmenté de 8 ‰ (55,15 %). Le pourcentage de phagocytose a ensuite présenté très peu de variations.

Pour les estérases, le pourcentage de cellules positives a présenté peu de variations entre le témoin et l'augmentation de salinité de 20 ‰. La valeur maximale a été atteinte pour une augmentation de 10 ‰ (22,27 ‰). La valeur minimale a été obtenue lors de l'augmentation de 20 ‰ (14,23%).

Pour les lysosomes, le pourcentage de cellules positives a varié entre 6,27 et 16,30 ‰. Les valeurs ont diminué du témoin à l'augmentation de salinité de 8 ‰ (6,27 ‰). Puis elles ont augmenté (16,30 ‰ pour une augmentation de 12 ‰). Les valeurs ont diminué de nouveau jusqu'à une augmentation de 18 ‰ (9,80 ‰). Enfin, une légère augmentation a été observée lorsque la salinité a augmenté de 20 ‰ (11,57 ‰).

Cependant les variations n'étaient pas significatives.



**Figure 10** : Evolution des paramètres des hémocytes maintenus *in vitro* 2 heures à différentes augmentations de salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de trois mesures (3 essais).

Après 19 heures d'exposition aux différentes augmentations de salinité, la mortalité hémocytaire a varié entre 9,97 ‰ et 13,80 ‰ entre le témoin et l'augmentation de salinité de 20 ‰.

Le pourcentage de granulocytes a varié entre 23,13 ‰ et 32,33 ‰ entre le témoin et l'augmentation de salinité de 20 ‰.

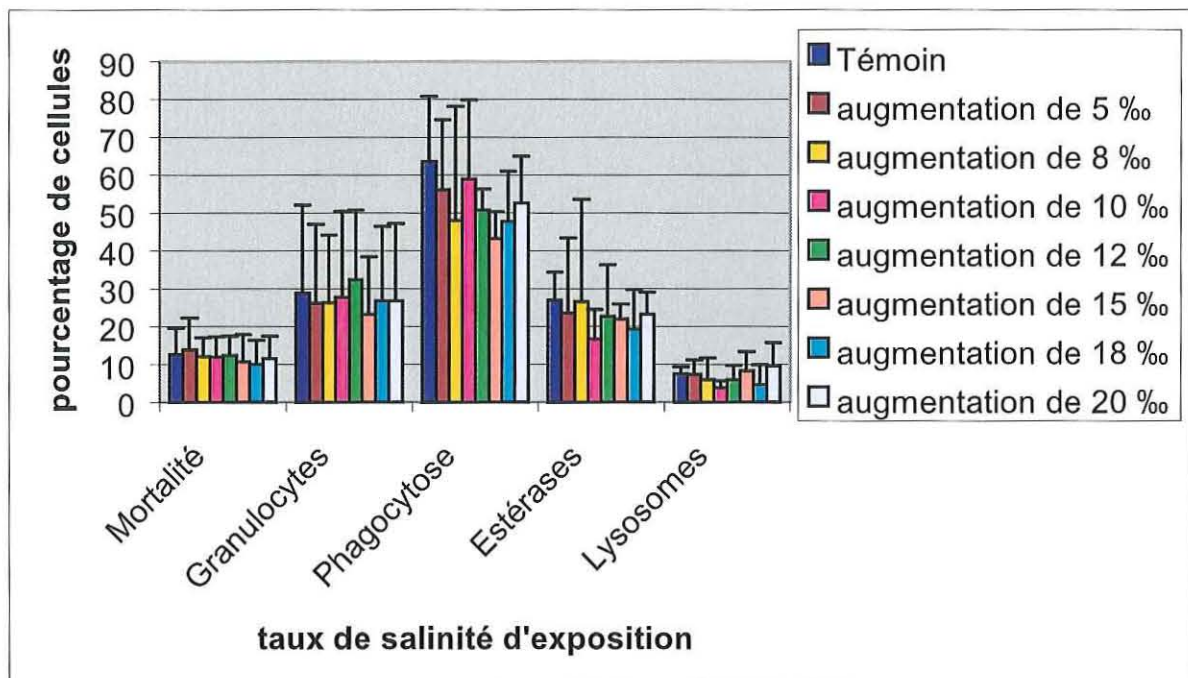
Le pourcentage des hémocytes présentant une activité phagocytaire a varié entre 43,13 % (augmentation de 15‰) et 63,50 % (témoin).

Pour les estérases, le pourcentage de cellules positives a varié entre 16,63 % (augmentation de 10 ‰) et 26,93% (témoin).

Pour les lysosomes le pourcentage de cellules positives a varié entre 3,67 % (augmentation de salinité de 10 ‰) et 9,50 % (augmentation de salinité de 20 ‰).

Cependant les variations étaient non significatives.

Sur l'ensemble des expériences, aucun paramètre n'a été modifié significativement par l'augmentation de salinité.



**Figure 11 :** Evolution des paramètres des hémocytes maintenus *in vitro* 19 heures à différentes augmentation salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de trois mesures (3 essais).

## B. Effet de la température *in vivo* sur la survie et les fonctions hémocytaires

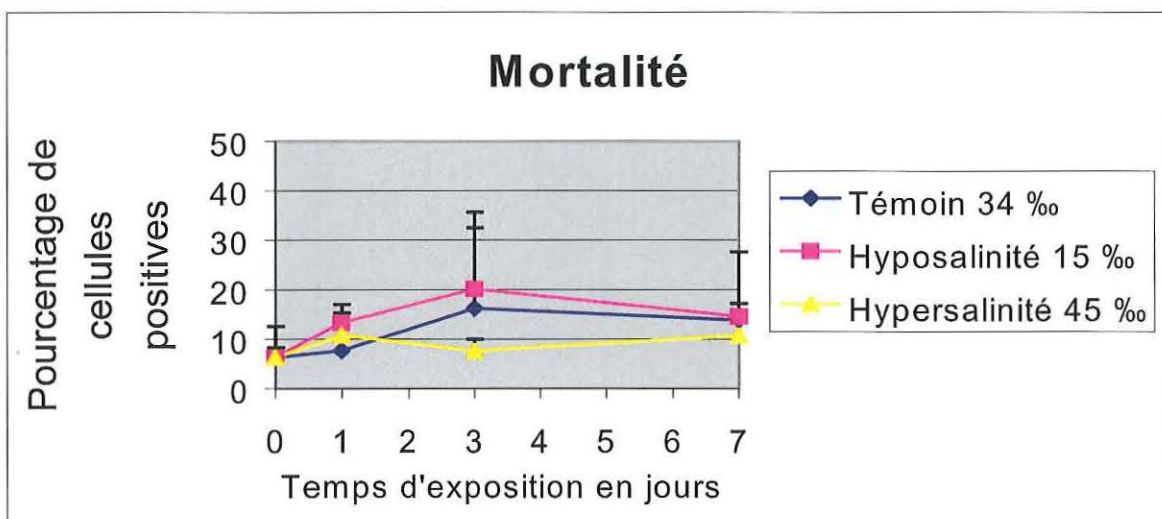
En raison de la trop forte présence de gamètes dans des échantillons, certains pools n'ont pas été analysés.

- **Premier test** (Hyposalinité : 15 ‰, témoin : 34 ‰ et hypersalinité : 45 ‰) (Annexe 6). Durant l'expérience aucune mortalité n'a été relevée.

### LA MORTALITE

- pour le témoin, la mortalité des hémocytes a varié entre 6,30 % et 16,23 %. La valeur maximale a été atteinte pour J3 (16,23 %). La mortalité a ensuite diminué jusqu'à J7 (13,80 %).
- pour l'hyposalinité la mortalité a varié entre 6,30 % et 20,10%. La valeur maximale a été atteinte pour J3 (20,10%). La mortalité a ensuite diminué jusqu'à J7 (14,55 %).
- pour l'hypersalinité, la mortalité a varié entre 6,30 % et 10,75 %. La valeur maximale a été atteinte pour J1 (10,75 %). Puis la mortalité a diminué, à J3 elle est de 7,57 %, et est remontée à J7 (10,70 %).

Cependant ces variations n'étaient pas significatives. De plus, aucune différence entre les 3 conditions de salinité n'a été mise en évidence.



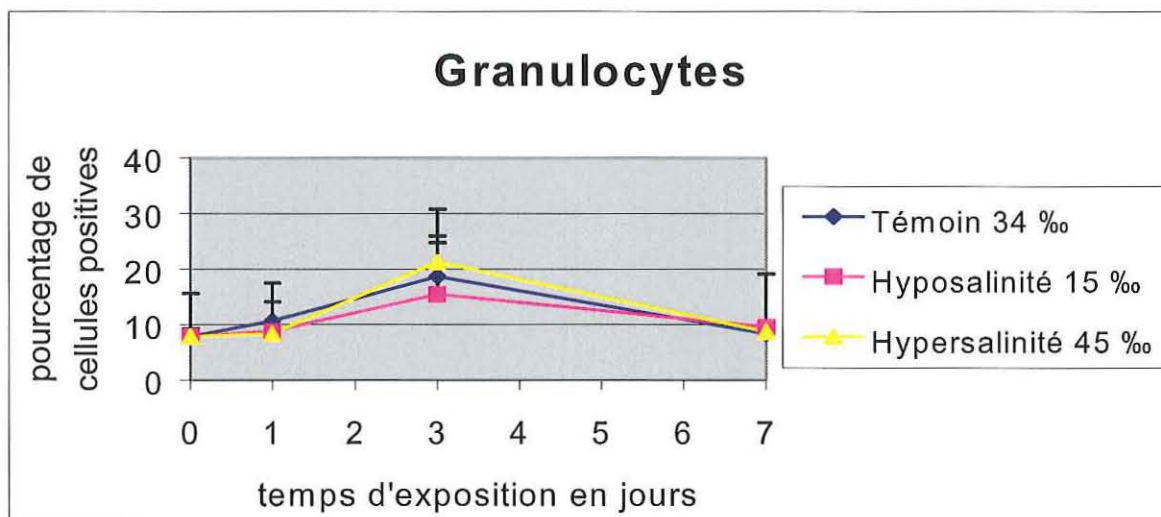
**Figure 12** : Evolution de la mortalité hémocytaire d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

## LES GRANULOCYTES

Le pourcentage de granulocytes a augmenté entre J0 et J3 puis a diminué à J7 pour les 3 conditions.

- pour le témoin, le pourcentage de granulocytes a varié entre 7,80 % et 18,63 %. La valeur la plus forte a été observée pour J3. Le pourcentage de granulocytes en J3 était significativement supérieur à celui en J7 et en J0 ( $p < 0,01$ ).
- pour l'hyposalinité, le pourcentage de granulocytes a varié entre 7,80 % et 15,40 %. La valeur la plus forte a été atteinte en J3.
- pour l'hypersalinité, le pourcentage de granulocytes a varié entre 7,80 % et 21,23 %. La valeur la plus forte a été atteinte en J3. Le pourcentage de granulocytes en J3 était significativement supérieur à celui en J7 et en J0 ( $p < 0,05$ ).

D'une manière générale, le pourcentage de granulocytes en J3 était significativement supérieur à celui obtenu les autres jours ( $p < 0,001$ ). Aucune différence entre les 3 conditions de salinité n'a été mise en évidence.



**Figure 13** : Evolution du pourcentage de granulocytes présents dans l'hémocytes d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

## LA PHAGOCYTOSE

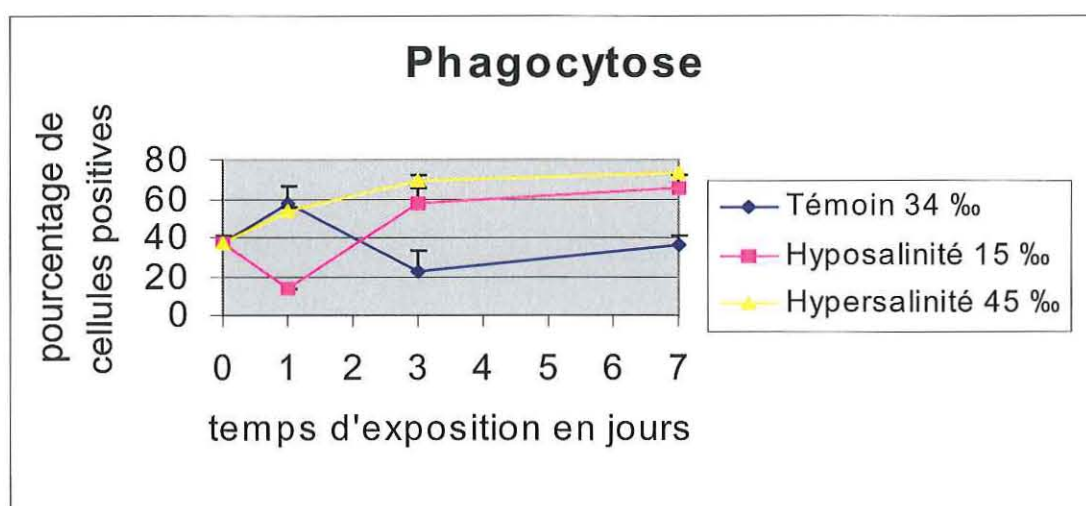
- pour le témoin, le pourcentage des hémocytes présentant une activité phagocytaire a augmenté entre J0 et J1 (36,87 % et 57,25 %) de manière significative ( $p < 0,05$ ). Il a ensuite diminué (22,70 %) à J3, et enfin, a réaugmenté (35,87 %) à J7, de manière significative ( $p < 0,05$ ).

- pour l'hyposalinité, le pourcentage des hémocytes présentant une activité phagocytaire a chuté significativement entre J0 et J1 (36,87 % à 13,25 %) ( $p < 0,01$ ). Il a ensuite augmenté jusqu'à 65,40 % à J7 ( $p < 0,01$ ).
- pour l'hypersalinité, le pourcentage des hémocytes présentant une activité phagocytaire a augmenté de manière régulière entre J0 et J7 (36,87 % à 73,40 %). A J7, le pourcentage d'activité phagocytaire était deux fois supérieur à celle de J0.

A J1, la phagocytose des hémocytes soumis à l'hyposalinité était significativement inférieure à celle de l'hypersalinité et du témoin ( $p < 0,05$ ).

A J3 et à J7 la phagocytose des hémocytes du témoin était significativement inférieure à celle de l'hyposalinité et de l'hypersalinité ( $p < 0,05$ ).

Sur l'ensemble de l'expérience, le pourcentage de phagocytose du témoin s'est révélée significativement inférieur à celui de l'hypersalinité ( $p < 0,05$ ).



**Figure 14** : Evolution de la phagocytose dans les hémocytes d'huîtres creuses maintenues *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

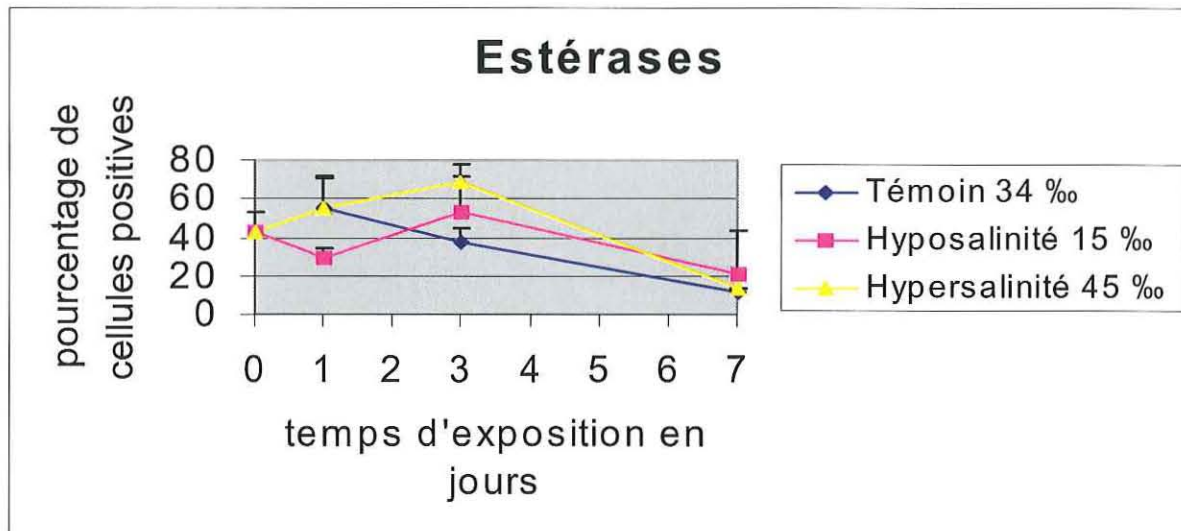
#### LES ESTERASES

- pour le témoin, le pourcentage de cellules positives a peu varié jusqu'à J3, puis a diminué significativement à J7 (11,17 %) ( $p < 0,01$ ).
- pour l'hyposalinité, le pourcentage de cellules positives a varié entre 29,15 % et 53,20 % entre J0 et J3, puis a chuté à 21,20 % à J7.
- pour l'hypersalinité, le pourcentage de cellules positives a augmenté entre J0 et J3, atteignant un maximum de 68,97 %, puis a diminué significativement à J7 (13,10 %) ( $p < 0,05$ ).



A J3, le pourcentage de cellules positives des hémocytes des huîtres soumises à l'hypersalinité était significativement supérieure à celle du témoin ( $p < 0,05$ ).

Sur l'ensemble de l'expérience, le pourcentage de cellules positives pour les estérases était significativement inférieur à J7 ( $p < 0,01$ ).



**Figure 15** : Evolution de l'activité estérasique dans les hémocytes d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

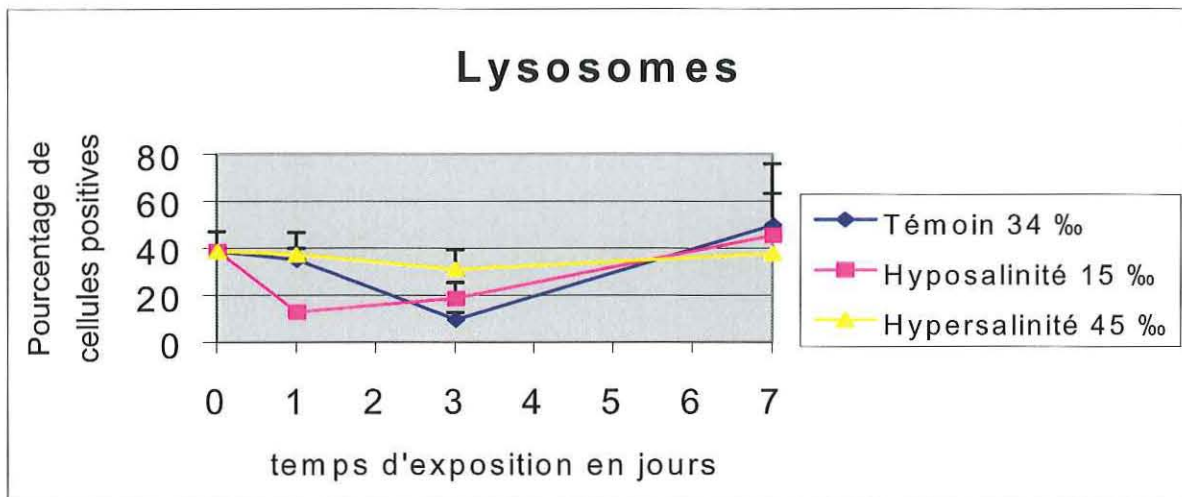
#### LES LYSOSOMES

- pour le témoin, le pourcentage de cellules positives a varié entre 9,47 % et 49,67 %, le minimum étant atteint en J3.
- pour l'hyposalinité, le pourcentage de cellules positives a diminué à J1 (12,65 %). Il est ensuite remonté à 45,35 % en J7.
- pour l'hypersalinité, le pourcentage de cellules positives a diminué à J3 (30,83 %). Il est ensuite remonté à J7 (37,60%).

Cependant les variations sont non significatives.

A J3, l'activité lysosomiale des hémocytes soumis à l'hypersalinité était significativement supérieure à celle du témoin ( $p < 0,05$ ).

Sur l'ensemble des huîtres, le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes était supérieur à J7 par rapport à J1 et J3 ( $p < 0,05$ ).

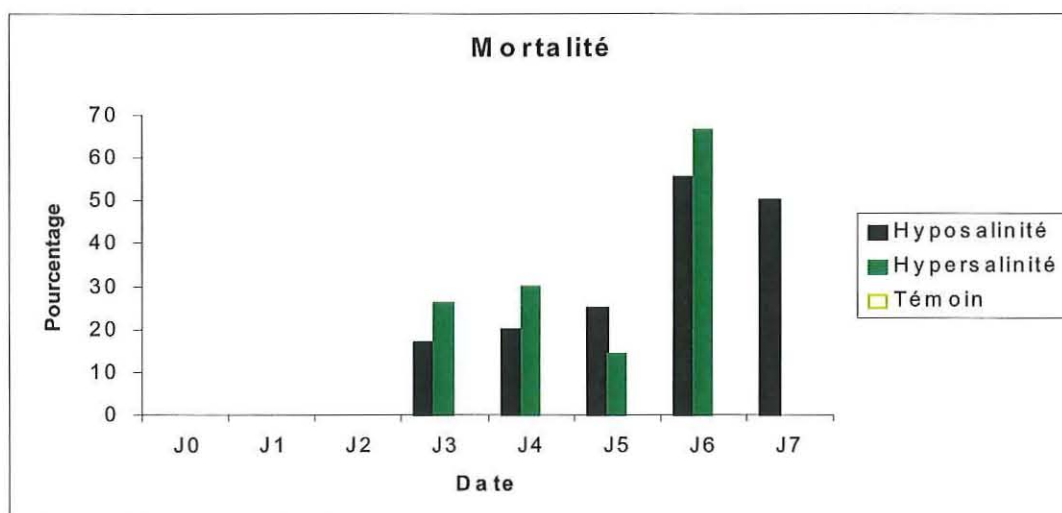


**Figure 16** : Evolution de l'activité lysosomiale dans les hémocytes d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

Il est à noter également que les deux premiers jours, les huîtres placées dans le bac hyposalinité ne se nourrissaient pas. Après cette phase d'adaptation, leur filtration est redevenue normale. A partir du troisième jour, ce sont les huîtres du bac hypersalinité qui se nourrissaient moins.

La mesure journalière des salinités a montré que dans le bac hyposalinité, la salinité était plus forte après 24 heures que lors du changement d'eau. De même, en hypersalinité, la salinité était plus faible après 24 heures (Annexe 7 1').

- **Deuxième test** (Hyposalinité : 5 ‰, témoin : 34 ‰ et hypersalinité : 60 ‰). (Annexe 8)



**Figure 17** : Evolution de la mortalité d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. (cf. Annexe 9).

En hyposalinité, les mortalités sont apparues dès J3. Elles étaient maximales pour J6 et J7 (55,56 % et 50 %). En hypersalinité, les mortalités ont également commencé à J3, et le pourcentage maximal a été atteint à J6 (66,67 %). A J7, aucune mortalité n'a été rapportée. Il est à noter qu'il ne restait que deux animaux.

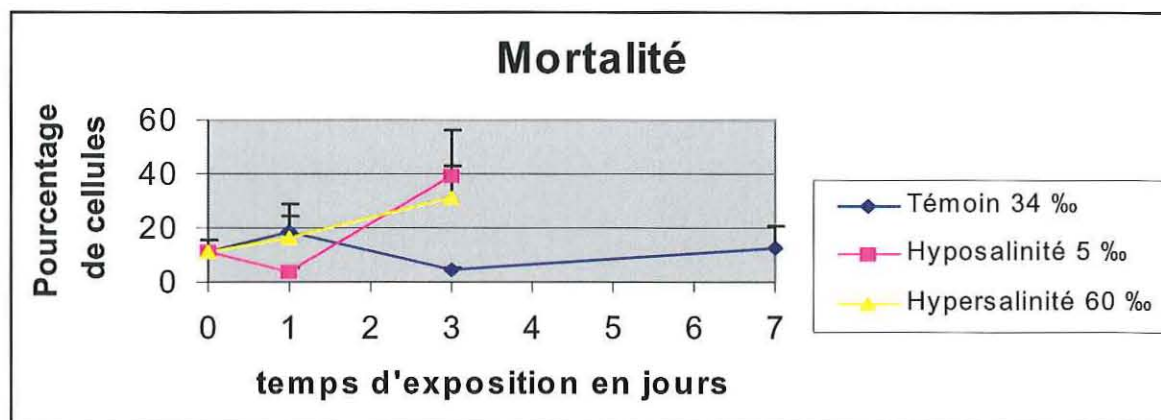
Aucune mortalité dans le bac témoin n'a été rapportée.

Du fait des mortalités importantes, à J7, seules les huîtres témoin ont été analysées.

## LA MORTALITE

- pour le témoin, la mortalité des hémocytes a varié entre 4,33 % et 18,80 %. La valeur maximale a été atteinte pour J1. Puis le pourcentage de mortalité a ensuite diminué jusqu'en J3 (4,33 %), puis était plus important à J7 (12,30 %).
- pour l'hyposalinité la mortalité a varié entre 3,77 % et 39,15 %. La valeur minimale a été atteinte pour J1 (3,77 %). Le pourcentage de mortalité a augmenté significativement, à J3 (39,15 %,  $p < 0,05$ ).
- pour l'hypersalinité le pourcentage de mortalité a été maximal à J3 (31,13 %).

Cependant ces variations n'ont été significatives que pour l'hyposalinité. De plus aucune différence entre les trois conditions de salinité n'a été mise en évidence.



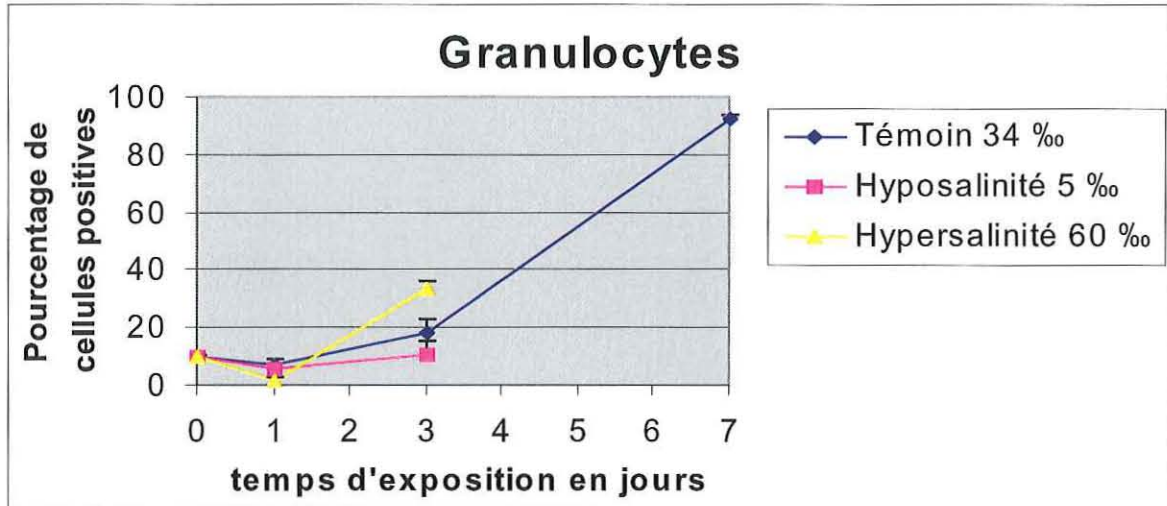
**Figure 18** : Evolution de la mortalité hémocytaire d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

## LES GRANULOCYTES

- pour le témoin, le pourcentage de granulocytes a diminué entre J0 et J1 (9,97 % et 6,65 %), et à ensuite augmenter significativement jusqu'à J7 (92,53 %,  $p < 0,001$ ).
- pour l'hyposalinité, le pourcentage de granulocytes a varié entre 5,87 % et 10,20 %. La valeur la plus forte a été observée à J3 ( $p < 0,001$ ).

- pour l'hypersalinité, le pourcentage de granulocytes a augmenté significativement entre 1,45 % (J1) et 33,67 % (J3) ( $p < 0,01$ ).

A J3, le pourcentage de granulocytes soumis à l'hypersalinité était significativement plus élevé que celui de l'hyposalinité et du témoin ( $p < 0,05$ ).



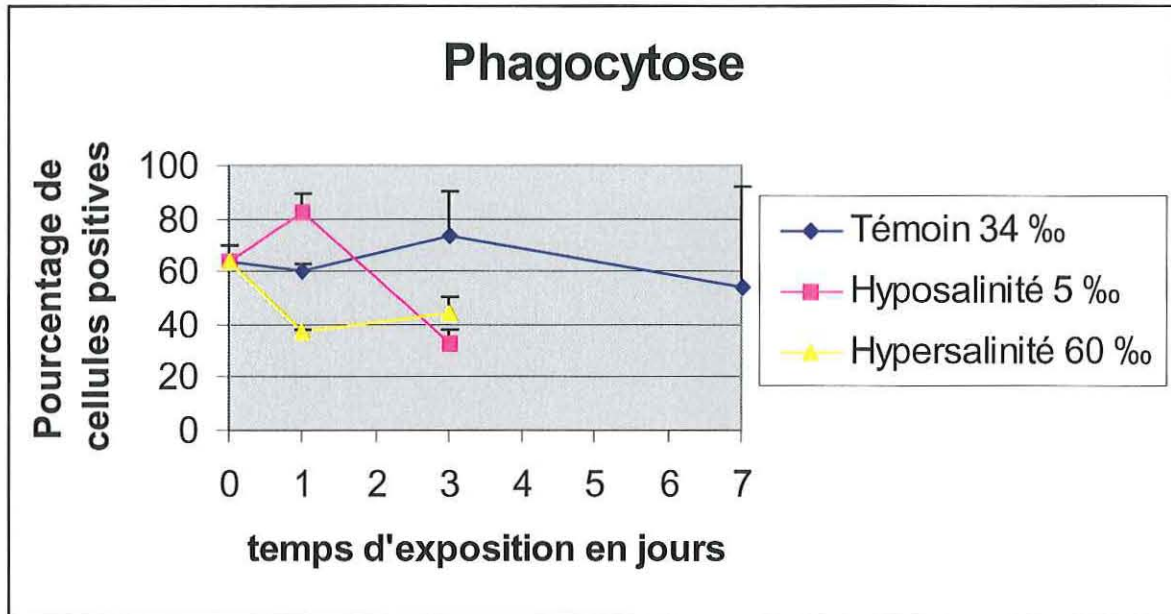
**Figure 19 :** Evolution du pourcentage de granulocytes présents dans l'hémocytes d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

#### LA PHAGOCYTOSE

- pour le témoin, le pourcentage d'hémocytes présentant une activité phagocytaire a diminué entre J0 et J1 (63,67 % et 59,90 %). Il a ensuite augmenté (73,43 %) à J3, et a rediminué (53,73 %) à J7.
- pour l'hyposalinité, le pourcentage d'hémocytes présentant une activité phagocytaire a augmenté entre J0 et J1 (63,6 % et 82,10 %). Il a ensuite diminué (32,65 %) à J3.
- pour l'hypersalinité, le pourcentage d'hémocytes présentant une activité phagocytaire a chuté entre J0 et J1 (63,67 % et 37,15 %). Il a ensuite augmenté (44,13 %) à J3.

Cependant, ces variations n'étaient pas significatives.

A J3, l'activité phagocytaire des hémocytes soumis à l'hypersalinité et à l'hyposalinité sont significativement inférieurs à ceux du témoin ( $p < 0,01$ ).

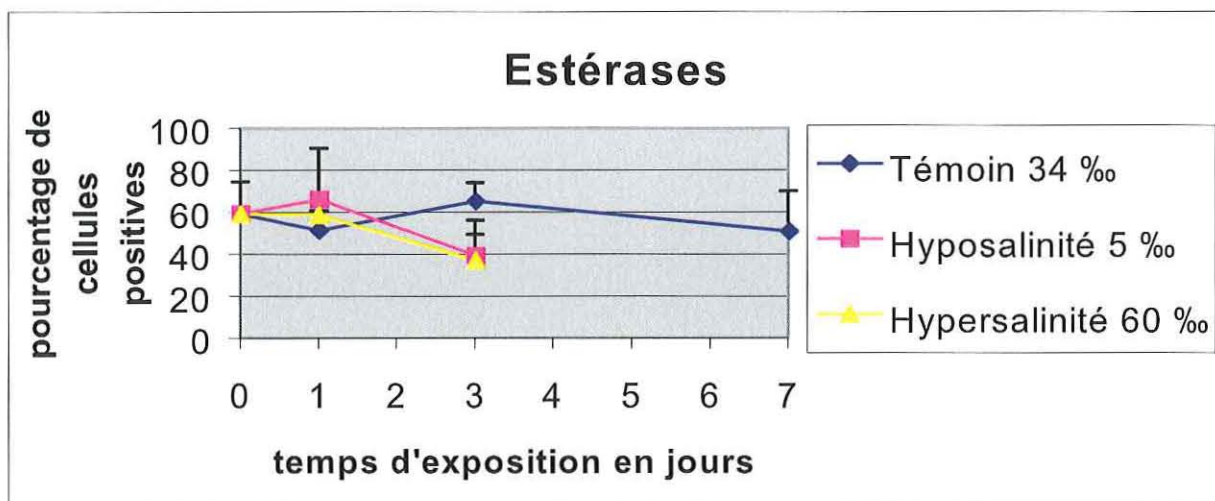


**Figure 20** : Evolution de la phagocytose dans les hémocytes d’huîtres creuses maintenues *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

#### LES ESTERASES

- pour le témoin, le pourcentage de cellules positives a peu varié (50,77 % à 65,17 %). La valeur maximale a été atteinte en J3.
- pour l’hyposalinité, le pourcentage de cellules positives a augmenté entre J0 et J1 (59,17 % et 66,07 %). Il a ensuite chuté à 39,25 % à J3.
- pour l’hypersalinité, le pourcentage de cellules positives a très peu varié entre J0 et J1 (59,17 % et 58,65 %). Il a ensuite diminué à 37,03 % à J3.

Cependant ces variations n’étaient pas significatives. De plus, aucune différence entre les trois conditions de salinité n’a été mise en évidence.

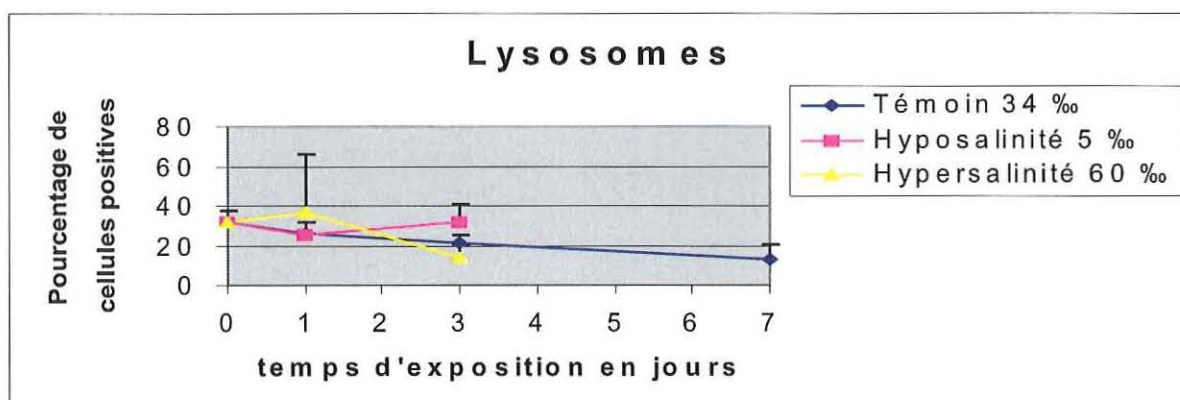


**Figure 21 :** Evolution de l'activité estérasique dans les hémocytes d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

#### LES LYSOSOMES

- pour le témoin, le pourcentage de cellules positives a diminué régulièrement entre J0 et J7 (31,83 % et 12,90 %).
- pour l'hyposalinité, le pourcentage de cellules positives a diminué entre J0 et J1 (31,83 % et 24,93 %). Il est ensuite remonté à 31,75 % en J7.
- pour l'hypersalinité, le pourcentage de cellules positives a augmenté entre J0 et J1 (31,83 % et 36,80 %). Il a ensuite chuté à 14,03 % en J7.

Cependant, ces variations n'étaient pas significatives. De plus, aucune différence entre les trois conditions de salinité n'a été mise en évidence.



**Figure 22 :** Evolution de l'activité lysosomiale dans les hémocytes d'huîtres creuses exposées *in vivo* durant 7 jours à différentes salinités. La valeur pour chaque point correspond à la moyenne de 1 à 3 mesures (1 à 3 pools).

Il est à noter également que dès le premier jour, les huîtres placées dans les bacs hypersalinité et hyposalinité ne se nourrissaient pas. A J1, les huîtres placées dans le bac témoin, ont perdu. De plus, les mêmes observations sur les variations de salinités que dans la première expérience ont été faites (Annexe 7 2').

## V. DISCUSSION

La littérature scientifique rapporte peu d'études sur les effets d'un facteur physico-chimique tel que la salinité, sur les capacités hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Différents tests ont été réalisés dans cette étude. Dans un premier temps des expériences *in vitro* ont été menées pour étudier l'effet de la salinité sur les hématocytes. Ce sont des tests aisés à exécuter au niveau technique. Ensuite, afin de se placer dans des conditions proches de celles rencontrées dans l'environnement, des tests *in vivo* ont été effectués, dans le but d'étudier l'effet de la variation de salinité sur les capacités hématocytaires.

Dans cette étude, l'hématolymphes a été prélevée dans le muscle adducteur. Au laboratoire, la technique la plus couramment utilisée est le prélèvement dans la cavité péricardique. Cette cavité se trouve à proximité de la gonade. Les animaux utilisés dans cette étude étaient diploïdes et les expériences ont été réalisées au mois de juillet, c'est à dire pendant la période de maturation où la gonade recouvre presque entièrement la cavité péricardique. L'hématolymphes alors prélevée peut contenir un grand nombre de gamètes, ce qui peut fausser les analyses en cytométrie de flux. La ponction a alors été réalisée dans le muscle adducteur.

Les tests *in vitro* ont été renouvelés trois ou quatre fois, ce qui représente une somme importante de travail. En effet, il convient de répéter les expériences afin de confirmer l'effet observé. Des analyses statistiques ont été effectuées pour étudier la distribution des valeurs obtenues.

### A. Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* ont été réalisés par contact direct entre les cellules et le milieu hyposalin ou hypersalin. En effet, l'absence d'existence de lignées cellulaires d'hématocytes chez les bivalves marins restreint la pratique des expériences *in vitro*. De ce fait, il n'est pas possible de maintenir les cellules plus de 24 heures.



## 1. Cas de l'hyposalinité

Les tests *in vitro* sur les animaux montre une association entre mortalité cellulaire, activité estérasique et diminution de salinité. De manière générale, l'augmentation de la dilution a abouti à une augmentation de la mortalité hémocytaire et à une diminution de l'activité estérasique. Les estérases participent au métabolisme des lipides et peuvent être utilisées pour mesurer le niveau des enzymes hydrolytiques. Plusieurs types d'estérases ont été détectées dans les hémocytes de différentes espèces de mollusques (Moore et Gelder, 1985; Gelder et Moore, 1986; Noël, 1992; Carballal *et al.*, 1997). La diminution de cette activité enzymatique peut-être la conséquence de la mortalité des hémocytes.

Après 2 heures d'exposition, il semble qu'une dilution 8/10<sup>ème</sup> soit une salinité charnière pour la survie et les capacités hémocytaires de l'huître creuse.

Après 19 heures d'exposition, la mortalité des hémocytes est apparue à des dilutions plus basses : une dilution de 3/10<sup>ème</sup> conduit à environ 34 % de mortalité. Les hémocytes sont dans leur environnement naturel (l'hémolymphe), cependant une incubation de 19 heures dans ces conditions n'est pas favorable au maintien des activités cellulaires. C'est pourquoi il se peut que des proliférations bactériennes se produisent et induisent la mort des hémocytes (Deniau, 2000). L'activité estérasique est apparue plus forte qu'après 2 heures d'exposition. Ce résultat peut s'expliquer par une modification des activités cellulaires chez des cellules maintenues quelques heures *in vitro*.

D'autres études ont utilisées des temps de 1 à 4 heures, soit plus courts que 19 heures, lors de la réalisation de chocs osmotiques d'hémocytes d'huîtres *in vitro* (Tirard *et al.*, 1997).

## 2. Cas de l'hypersalinité

Les tests *in vitro* n'ont pas permis de conclure à une association entre mortalité cellulaire ou activités hémocytaires et augmentation de salinité. Cependant, à 2 heures il semblerait qu'en présence de forte salinité la mortalité cellulaire était plus faible que dans le témoin. Les huîtres de la zone intertidale sont habituées à être exposées à des fluctuations de salinité, ce qui pourrait expliquer leur plus grande résistance à la mortalité comme ceci a été démontré pour les ormeaux noirs (Martello et Tjeerdema, 2001). L'augmentation des acides aminés libres pendant un stress d'hypersalinité a montré de grandes variations entre les espèces de mollusques (Amende et Pierce, 1980).

## 2. Tests *in vivo*

Chez les mollusques bivalves, qui sont des organismes poïkilothermes osmoconformes (Galtsoff, 1964 ; Shumway, 1977 ; Schmidt-Nielsen, 1990 ; Souness and Fleet, 1991), la salinité du milieu influence directement l'osmolalité de l'hémolymphe.

Afin de vérifier si les tests *in vitro* étaient de bons indicateurs de ce qui se passe dans l'environnement, des tests *in vivo* ont été réalisés. Des animaux ont été placés dans des bacs à différentes salinités. Les résultats obtenus sont différents de ceux obtenus *in vitro*. La mortalité hémocytaire n'a pas varié avec la salinité dans aucune des deux expériences : ceci peut être dû au fait que les hémocytes sont mieux protégés dans l'animal, et que la salinité doit diminuer progressivement au sein des organes et tissus. Il serait intéressant de recommencer la première expérience testée en laissant les animaux s'acclimater plus longtemps. Chu *et al.* (1993) ont réalisé des expériences *in vivo* sur des huîtres américaines *Crassostrea virginica* pendant 3 semaines à 3, 10 et 20 ‰. Hauton *et al.* (2000) ont laissé des huîtres plates s'acclimater pendant 7 jours à des salinités de 16, 25 et 32 ‰. Cependant, d'autres paramètres hémocytaires ont présenté des variations, notamment la phagocytose : à J3, J7 et sur l'ensemble de la première expérience, la phagocytose des hémocytes des huîtres soumises à l'hypersalinité (45 ‰) s'est révélée supérieure à celle du témoin. Le même résultat a été observé à J3 pour l'activité de type estérase. Ces activités n'ont pas été suivies lors d'expériences sur la salinité. Il n'est donc pas possible de comparer, mais il apparaît que l'hypersalinité influence les activités hémocytaires.

Lors de la deuxième expérience, peu de paramètres ont varié, cependant une importante mortalité a été relevée dans les bacs 5 ‰ et 60 ‰ : ces valeurs sont éloignées de celles rencontrées dans le milieu, même en conditions extrêmes. Elles apparaissent peu intéressantes pour étudier l'effet de la salinité sur les activités hémocytaires. Comme aucune valeur n'a été obtenue à J7 (sauf pour le témoin), il est difficile de conclure. D'autre part, de nombreuses variations ont été rapportées entre les temps d'analyse. Les activités hémocytaires de l'huître creuse présentent beaucoup de variations en fonction de la date. Il vaut mieux ne pas les considérer (Gagnaire, 2002).

Une influence de la salinité sur la survie des cellules et les capacités hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* a été observée. C'est pour cette raison qu'une augmentation de la salinité pourrait jouer un rôle prépondérant dans les mortalités estivales rencontrées ces dernières années. En affaiblissant les capacités de défense des huîtres creuses, elle rendrait les

huîtres plus sensibles aux maladies infectieuses ou parasitaires. Une plus grande différence de salinité entraîne un plus grand changement des activités hématocytaires. Fisher et Newell (1986) ont montré qu'une augmentation de salinité entraîne une diminution des activités hématocytaires de *C. virginica* et une diminution de la salinité augmente l'activité des hématocytes. Cependant, nos expériences ont rapporté une augmentation des activités hématocytaires en hyposalinité. Scott *et al.*, (1985) ont mis en évidence des mortalités plus faibles chez des huîtres infectées par *Perkinsus marinus* à de faible salinité que chez des huîtres infectées à de forte salinité. De plus, Anderson *et al.* (1995 a,b) ont démontré que les huîtres de sites à salinité élevée, étaient 100% infectées par *Perkinsus marinus* et celles de sites à salinité faible étaient infectées seulement à 31 %, suggérant que la virulence du parasite pourrait être augmentée ou que la résistance des huîtres pourrait être diminuée lors d'une salinité élevée.

Nos analyses n'ont été réalisées qu'après 7 jours de contact. Il est possible que la première réaction des huîtres face à l'augmentation de salinité soit une augmentation des capacités de défense, cependant si l'augmentation de salinité dure trop longtemps, il est envisageable que leur défense soit diminuée, les rendant ainsi plus sensibles aux maladies infectieuses.

Cette étude est une première approche dans la compréhension du rôle joué par la salinité sur les capacités hématocytaires et donc sur les mortalités rencontrées en période estivale. Les expériences doivent être répétées pour confirmer les premiers résultats obtenus et d'autres facteurs physico-chimiques pourront être pris en compte, comme la température, le pH, etc. Ce travail a permis également de montrer l'intérêt d'utiliser la cytométrie de flux pour étudier les capacités immunitaires chez les bivalves.

## VI. CONCLUSION

Ce travail a permis d'étudier les possibles effets d'un facteur physico-chimique du milieu, la salinité sur la survie et les capacités hématocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ce qui suggère la possibilité qu'elle influence la résistance aux maladies. En *in vitro*, les faibles salinités induisent de fortes mortalités hématocytaires, associées en générale à une diminution des activités enzymatiques et phagocytaires. A 2 heures *in vitro*, la dilution 8/10<sup>ème</sup> semble être une dilution charnière. C'est à cette dilution que des variations commencent à être observées, notamment pour les activités phagocytaires et estérases. *In vivo*, ceci n'a pas été observée. Néanmoins, la phagocytose semble être modifiée par une augmentation de salinité *in vivo*. Cependant les résultats obtenus sont plus significatifs *in vitro* qu'*in vivo*. Les huîtres ont besoin de plus de temps pour s'acclimater à la salinité que les hémocytes. Les résultats obtenus doivent être confirmés et l'influence d'autres facteurs physico-chimiques environnementaux pourraient être étudiés seuls ou en association.

La cytométrie de flux est de plus en plus utilisée actuellement dans le domaine de l'étude des invertébrés marins. Elle apporte un ensemble de données très utile dans l'étude des capacités immunitaires.

Les variabilités inter-individuelle et inter-lots reste cependant un problème majeur. Donc, pour étudier les effets de différents paramètres, travailler sur des animaux ayant la même origine génétique et élevés dans les mêmes conditions semble une voie à privilégier.

## VII. BIBLIOGRAPHIE

- AMENDE, L.M., PIERCE, S.K., 1980. Cellular volume regulation in salinity stressed molluscs : the response of *Noetia ponderosa* (Arcidae) red blood cells to osmotic variation. *Journal of Comparative Physiology*. 138, pp 299-306.
- ANDERSON, R.S., BURRESON, E.M., PAYNTER, K.T., 1995a. Defence responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, pp 82-89.
- ANDERSON, R.S., MORA, L.M., BRUBACHER, L.L., 1995b. Luminol-dependent chemiluminescence in molluscs. In : Stolen, S., Fletcher, T.C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Sowerhall, K., Weeks-Perkins, B.A. (Eds), *Techniques in Fish Immunology-4. Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.
- AUFFRET, M., 1985. Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de doctorat en océanographie. Université de Bretagne Occidentale, pp.153.
- AUFFRET, M. and OUBELLA, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas* : *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118 Part A (3) : 705-712.
- BURRESON, E.M., and RAGONE CALVO, L.M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15 : 17-34.
- CARBALLAL, M.J., LOPEZ, C., AZEDEVO, C., VILLALBA, A., 1997. Hemolymph involved in defense functions of hemocytes of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70 : 96-105.

- CHENG, T.C. and RODRICK, G.E., 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Merceneria merceneria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 52 part B : 443-447.
- CHENG, T.C., RODRICK, G.E., FOLEY, D.A. and KOEHLER, S.A., 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25 : 261-265.
- CHENG, T.C. LIE, K.J., HEYNEMAN, D. and RICHARD, S.A., 1978. Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Echinostoma linoense*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 31 : 57-62.
- CHENG, T.C., 1981. Bivalves. In *Invertebrate Blood Cells* (N.A. Ratcliffe, A.F. ROWLEY, eds), pp.233-299. Academic Press, London.
- CHENG, T.C., 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology*, 23 : 119-144.
- CHU, F.E., LA PEYRE, J.F. and BURRESON, C., 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defenserelated activities in Eastern oyster, *Crassostrea vrginica* : salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology* 62 : 226-232.
- DENIAU, S., 2000. Essais de propagation *in vitro* de virus de type herpès infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus. Ecole pratique des hautes études, Science de la Vie et de la Terre. pp 189.
- FISHER, W.S. and NEWELL, R.I.E., 1986. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin* 170, pp 122-134.
- FISHER, W.S., AUFFRET M. and BALOUET G., 1987. Response of European oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* 67 : 179-190.

- FISHER, W.S., 1988. Environmental influence on host response: Environmental influence on bivalve hemocyte function. *American Fisheries Society Special Publication* 18 : 225-237.
- FISHER, W.S. and TAMPLIN, M., 1988. Environmental influence on activities and foreign-particle binding by hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Aquat. Sci.* 45 : 1309-1315.
- GAGNAIRE, B., 2001. Etude de l'impact de micropolluants sur les capacités immunitaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*. Stage de DEA, Université de La Rochelle. 55 pp.
- GAGNAIRE, B., 2002. Environnement et immunomodulation: étude d'activités hémyocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Stage de DES, Université de La Rochelle. 81 pp.
- GALTSOFF, P.C., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Fisheries Bulletin* Vol. 64, US Government Printing Office.
- GELDER, S.R. et MOORE, C.A., 1986. Cytochemical demonstration of several enzymes associated with phagosomal processing of foreign materials within hemocytes of *Mercenaria mercenaria*. *Trans American Microscopy Society*, 105 : 51-58.
- GOULLETEQUER, P., SOLETCHNIK, P., LE MOINE, O., RAZET, D., GEAIRON, P., FAURY, N. & TAILLADE, S. (1998). summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). *ICES Mariculture Committee* CM 1998/CC. pp. 14-21.
- HAUTON, C., HAWKINS, L.E., HUTCHINSON, S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 127B, pp. 203-212.

- LOPEZ, C. , CARVALLAL, M.J., AZEVEDI, C. and VILLALBA, A., 1997. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes dussucatus* (Mollusca : Bivalvia). *Fish and Shellfish Immunology*. 7 : 595-608.
- MARTELLO, L.B., TJEERDEMA, R.S., 2001. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. *Aquatic Toxicology* 51, pp 351-362.
- MOHANDAS, A. , CHENG, T.C., and CHENG, J.B., 1985. Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes : a scanning electron microscope study. *Journal of Invertebrate Pathology* 45 : 189-197.
- MOORE, C.A. et GELDER, S.R., 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : bivalvia). *Transmission American Microscopy Society*, 104 : 242-249.
- NOËL, D., 1992. Etude des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus*. Thèse pour le doctorat de l'université de Bordeaux II, Mention Sciences de la vie, pp 138.
- PIPE, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal*, 22 : 595-603.
- PIPE, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Development and Comparative Immunology* 16 : 111-122.
- SCHMIDT-NIELSEN, K., 1990. *Animal Physiology : Adaptation and the Environment*, 4<sup>th</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- SCOTT, G.I., MIDDAUGH, D.P., SAMMONS, T.I., 1985. Interactions of chlorine-produce oxidants (CPO) and salinity in affecting lethal and sub-lethal effects in the eastern or American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), infected with the protistan parasite, *Perkinsus marinus*, p. 351-376. In : Vernberg, F.J., F.P., Thurberg, A. Calabrese and W.B.



Vernberg (Eds), *Marine Pollution and Physiology : Recent Advances*. University of South Carolina Press.

- SHUMWAY, S.E., 1977. Effect of salinity fluctuations on the osmotic pressure and Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup>, ion concentrations in the haemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology* 1, 153-157.
- SOUNESS, R.A., FLETT, G.H., 1991. Bacterial agents in shellfish depuration. In : Otwell, W.S. Rodrick, G.E., Martin, R.E. (Eds.), *Molluscan Shellfish Depuration*, CRC Press, Boca Raton, F, pp. 59-69.
- TIRARD, C. T., GROSSFED, R. M., LEVINE, J.F., KENNEDY-STOSKOPF, S., 1997. Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry Physiology* Vol. 116A, No. 1, pp. 43-49.
- XUE, Q. and RENAULT, T. 2000. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes : characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Development and Comparative Immunology*, 25 : 187-194.

## VII. ANNEXES

### ANNEXE 1 :

*EDMA*

*Eau de mer artificielle*

Composition selon Lewis (10 X)

NaCl.....234 g

KCl.....15 g

MgSO<sub>4</sub> 74 H<sub>2</sub>O.....12 g

CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O.....1,5 g

CaCl<sub>2</sub> anhydre.....1,5 g

Eau distillée.....1 L

Utilisation à 1 X

**ANNEXE 2** : Pourcentage d'hémocytes présentant des mortalités et des activités enzymatiques et phagocytaires (cellules maintenues *in vitro* et exposées durant 2 heures à différentes dilutions)

	Mortalité	Granulocyte	Phagocytose	Estérase	Lysosome
Test 1 témoin	18,6	16,9	31	28,8	13,5
Test 2 témoin	9,6	5,5	43,5	9,7	11,4
Test 3 témoin	18,7	8,8	13,8	22,1	13,9
Test 4 témoin	12,4	12	14,5	26,4	10,3
Test 1 1/10ème	15,3	15,5	13,8	13	5,5
Test 2 1/10ème	11,8	2,4	52,3	15,1	17,6
Test 3 1/10ème	16,2	11,9	21	28,9	20,5
Test 4 1/10ème	11,3	9,1	14,4	20,7	12,3
Test 1 2/10ème	18,6	18,5		20,6	6,8
Test 2 2/10ème	10,9	3,6	49,3	18,6	17,2
Test 3 2/10ème	16,4	9,5	15,1	19,1	13,6
Test 4 2/10ème	15,4	7,8	21,9	26,5	14,9
Test 1 3/10ème	10,4	4,9	46,4	13,8	18,3
Test 2 3/10ème	19,5	15,9	22,9	26,4	18,3
Test 3 3/10ème	21,2	9	14,1	22,8	11,9
Test 4 3/10ème					
Test 1 5/10ème	16,7	22,6	15,6	9,7	7,1
Test 2 5/10ème	19,1	8,3	48,2	13,2	19,9
Test 3 5/10ème	23,2	8	26,9	20,2	15,1
Test 4 5/10ème	26,3	10,6	25,7	24,8	16
Test 1 8/10ème	22,2	25,3	20,5	10,1	12,2
Test 2 8/10ème	54,1	8,6	69	3,8	5,3
Test 3 8/10ème	93,2	6,7	21,4	5,7	8,6
Test 4 8/10ème	75,8	20,3	68,3	8,3	6
Test 1 9/10ème	73,1	23,6	47,8	5,1	8,7
Test 2 9/10ème	41,1	2,8	10,5	0,1	9,6
Test 3 9/10ème	93	8,3	38,9	7,6	10,8
Test 4 9/10ème	81,6	7,4	64,3	4,4	8,6
Test 1 10/10èm	84,4	20,2	27,6	0,1	10
Test 2 10/10èm	48,2	5,9	10,1	0,2	11,2
Test 3 10/10èm	89,3	14,4	7,5	0,3	18,5
Test 4 10/10èm	87,2	10,8	20,4	0,2	11,1

MOYENNE

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Témoin	14,83	10,80	25,70	21,75	12,28
1/10ème	13,65	9,73	25,38	19,43	13,98
2/10ème	15,33	9,85	28,77	21,20	13,13
3/10ème	17,03	10,40	27,80	20,10	18,30
5/10ème	21,33	12,38	29,10	16,98	14,53
8/10ème	61,33	15,23	44,80	6,98	8,03
9/10ème	72,20	10,53	40,38	4,30	9,43
10/10ème	77,28	12,83	16,40	0,20	12,70

**ANNEXE 3** : Pourcentage d'hémocytes présentant des mortalités et des activités enzymatiques et phagocytaires (cellules maintenues *in vitro* et exposées durant 19 heures à différentes dilutions)

	Mortalité	Granulocyte	Phagocytose	Estérase	Lysosome
Test 1 témoin	18,5	20,4	68,1	23,2	1,5
Test 2 témoin	32,3	17,9	51,7	12,4	12,6
Test 3 témoin	29,3	9,3	12,3	40,3	23,6
Test 4 témoin	30,8	17,5	70,3	28,1	17
Test 1 1/10ème	18,9	16,4	72,6	23,4	13,4
Test 2 1/10ème	30,6	18,8	51,5	17,9	13,1
Test 3 1/10ème	29,9	14,4	23,9	34,5	30,1
Test 4 1/10ème	27,8	14,5	66,7	23	12,3
Test 1 2/10ème	17,5	11	58,1	21,9	12,9
Test 2 2/10ème	34,5	19,9	28,8	20,4	9,3
Test 3 2/10ème	24,6	10	19,1	25,8	24,8
Test 4 2/10ème	33,9	12,3	42	28,7	17,9
Test 1 3/10ème	40,7	17,4	55,4	8,5	8,5
Test 2 3/10ème	21,3	8,9	25,6	28,8	31,9
Test 3 3/10ème	39,4	12,4	51,9	20,8	7,3
Test 4 3/10ème					
Test 1 5/10ème	21,1	13,7	31,6	28,3	20,7
Test 2 5/10ème	34,5	19,3	37,4	13,5	11,30
Test 3 5/10ème	24,7	20,3	22,2	33,5	28,7
Test 4 5/10ème	42	17		16,7	5,7
Test 1 8/10ème	24,4	10,2	34,9	30,3	12,7
Test 2 8/10ème	51,1	15,8	11,6	2,7	6,4
Test 3 8/10ème	89,2	4,3	14,5	6,8	13,7
Test 4 8/10ème	76,6	12,4	76,8	7,9	11,1
Test 1 9/10ème	66,3	13,1	26,7	9,1	10,3
Test 2 9/10ème	53,6	11,1	3,8	0,3	5,7
Test 3 9/10ème	89,7	4,7	11,2	6,1	17,1
Test 4 9/10ème	84	5,9	80,8	4,4	11
Test 1 10/10ème	93,9	2	21,9	0,1	10,70
Test 2 10/10ème	67,9	14,6	3,2	0,1	7,90
Test 3 10/10ème	91,8	9,5	14,4	0,1	20,40
Test 4 10/10ème	86,5	6,5	16,9	0	7,3

MOYENNE	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Témoin	<b>27,73</b>	<b>16,28</b>	<b>50,60</b>	<b>26,00</b>	<b>13,68</b>
1/10ème	<b>26,80</b>	<b>16,03</b>	<b>53,68</b>	<b>24,70</b>	<b>17,23</b>
2/10ème	<b>27,63</b>	<b>13,30</b>	<b>37,00</b>	<b>24,20</b>	<b>16,23</b>
3/10ème	<b>33,80</b>	<b>12,90</b>	<b>44,30</b>	<b>19,37</b>	<b>15,90</b>
5/10ème	<b>30,58</b>	<b>17,58</b>	<b>30,40</b>	<b>23,00</b>	<b>16,60</b>
8/10ème	<b>60,33</b>	<b>10,68</b>	<b>34,45</b>	<b>11,93</b>	<b>10,98</b>
9/10ème	<b>73,40</b>	<b>8,70</b>	<b>30,63</b>	<b>4,98</b>	<b>11,03</b>
10/10ème	<b>85,03</b>	<b>8,15</b>	<b>14,10</b>	<b>0,08</b>	<b>11,58</b>

**ANNEXE 4** : Pourcentage d'hémocytes présentant des mortalités et des activités enzymatiques et phagocytaires (cellules maintenues in vitro et exposées durant 2 heures à différentes augmentations de salinités)

	Mortalité	Granulocyte	Phagocytose	Estérase	Lysosome
<b>Test 1 témoin</b>	4,9	4,2	35,2	13,1	7,4
<b>Test 2 témoin</b>	13,1	39,9	55,2	18,3	17,2
<b>Test 3 témoin</b>	11,4	8,1	64,4	22,7	17,7
<b>Test 1 + 5 ‰</b>	3,4	3,5	38,1	26,8	16,3
<b>Test 2 + 5 ‰</b>	5,8	30,9	46	13,3	13,4
<b>Test 3 + 5 ‰</b>	3,3	6,4	26,3	20,7	7,8
<b>Test 1 + 8 ‰</b>	3,2	4,3	47,3	16,3	11,6
<b>Test 2 + 8 ‰</b>	5,8	29,1	63	17,1	4,1
<b>Test 3 + 8 ‰</b>	4,4	8,7	42,4	18,8	3,1
<b>Test 1 + 10 ‰</b>	2,5	1,7	51,7	35,5	15,7
<b>Test 2 + 10 ‰</b>	5,3	28,6	46,3	15,1	7,8
<b>Test 3 + 10 ‰</b>	4,2	8,6	50,3	16,2	14,5
<b>Test 1 + 12 ‰</b>	4,3	3,7	49,2	23,8	12
<b>Test 2 + 12 ‰</b>	8,1	27,7	34,9	12,8	17,9
<b>Test 3 + 12 ‰</b>	3,7	7,3	58,6	22,8	19
<b>Test 1 + 15 ‰</b>	2,7	2	46,8	30,7	13,2
<b>Test 2 + 15 ‰</b>	8,4	28,3	51,8	11,4	8,4
<b>Test 3 + 15 ‰</b>	3	7,2	53,3	16,3	18,7
<b>Test 1 + 18 ‰</b>	2,1	1,7	56,5	19,1	15,4
<b>Test 2 + 18 ‰</b>	8	24,5	46,1	12,7	5
<b>Test 3 + 18 ‰</b>	2,5	7,2	41,2	15,3	9
<b>Test 1 + 20 ‰</b>	1,4	1,6	46,1	14,5	9,9
<b>Test 2 + 20 ‰</b>	8,1	27,3	49,9	11,5	13,6
<b>Test 3 + 20 ‰</b>	2,8	6,3	31,6	16,7	11,2

MOYENNE

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Témoin	<b>9,80</b>	<b>17,40</b>	<b>51,60</b>	<b>18,03</b>	<b>14,10</b>
Test + 5 ‰	<b>4,17</b>	<b>13,60</b>	<b>36,80</b>	<b>20,27</b>	<b>12,50</b>
Test + 8 ‰	<b>4,50</b>	<b>16,70</b>	<b>55,15</b>	<b>17,40</b>	<b>6,27</b>
Test + 10 ‰	<b>4,00</b>	<b>12,97</b>	<b>49,43</b>	<b>22,27</b>	<b>12,67</b>
Test + 12 ‰	<b>5,37</b>	<b>12,90</b>	<b>47,57</b>	<b>19,80</b>	<b>16,30</b>
Test + 15 ‰	<b>4,70</b>	<b>12,50</b>	<b>50,63</b>	<b>19,47</b>	<b>13,43</b>
Test + 18 ‰	<b>4,20</b>	<b>11,13</b>	<b>47,93</b>	<b>15,70</b>	<b>9,80</b>
Test + 20 ‰	<b>4,10</b>	<b>11,73</b>	<b>42,53</b>	<b>14,23</b>	<b>11,57</b>

**ANNEXE 5** : Pourcentage d'hémocytes présentant des mortalités et des activités enzymatiques et phagocytaires (cellules maintenues in vitro et exposées durant 19 heures à différentes augmentations salinités)

	Mortalité	Granulocyte	Phagocytose	Estérase	Lysosome
Test 1 témoin	11,9	50	80,3	35,4	9,1
Test 2 témoin	19,9	32,4	45,8	21,4	7,6
Test 3 témoin	5,8	3,8	64,4	24	5,3
Test 1 + 5 ‰	10,4	44,1	72,2	45,3	9,1
Test 2 + 5 ‰	23,4	31,1	60,2	18,7	9,9
Test 3 + 5 ‰	7,6	3,1	35,9	6,5	2,9
Test 1 + 8 ‰	10,9	43,1	80,9	56,5	3,4
Test 2 + 8 ‰	17,5	28,1	41,4	19	12,4
Test 3 + 8 ‰	7,7	7,3	21,6	3,9	1,7
Test 1 + 10 ‰	13,5	47,9	81,1	23,1	1,4
Test 2 + 10 ‰	16,2	32	56,2	18,8	4,4
Test 3 + 10 ‰	5,8	3,1	39,4	8	5,2
Test 1 + 12 ‰	9,8	47,1	54,9	25	1,5
Test 2 + 12 ‰	18,2	38,1	52,8	34,9	8
Test 3 + 12 ‰	8,9	11,8	44,4	8	8,1
Test 1 + 15 ‰	7,4	28,5	45,7	25,8	2,7
Test 2 + 15 ‰	18,9	35	48,6	22	9,7
Test 3 + 15 ‰	5,5	5,9	35,1	17,9	12,4
Test 1 + 18 ‰	8,6	34	51,1	29	1,7
Test 2 + 18 ‰	16,9	41,7	59	20,4	10,7
Test 3 + 18 ‰	4,4	4,4	32,9	8,1	1
Test 1 + 20 ‰	12	35,5	43,8	27,3	2,5
Test 2 + 20 ‰	17,1	41,4	61,3	19	11,9
Test 3 + 20 ‰	5,4	3,3			14,1

MOYENNE

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Témoin	<b>12,53</b>	<b>28,73</b>	<b>63,50</b>	<b>26,93</b>	<b>7,33</b>
Test + 5 ‰	<b>13,80</b>	<b>26,10</b>	<b>56,10</b>	<b>23,50</b>	<b>7,30</b>
Test + 8 ‰	<b>12,03</b>	<b>26,17</b>	<b>47,97</b>	<b>26,47</b>	<b>5,83</b>
Test + 10 ‰	<b>11,83</b>	<b>27,67</b>	<b>58,90</b>	<b>16,63</b>	<b>3,67</b>
Test + 12 ‰	<b>12,30</b>	<b>32,33</b>	<b>50,70</b>	<b>22,63</b>	<b>5,87</b>
Test + 15 ‰	<b>10,60</b>	<b>23,13</b>	<b>43,13</b>	<b>21,90</b>	<b>8,27</b>
Test + 18 ‰	<b>9,97</b>	<b>26,70</b>	<b>47,67</b>	<b>19,17</b>	<b>4,47</b>
Test + 20 ‰	<b>11,50</b>	<b>26,73</b>	<b>52,55</b>	<b>23,15</b>	<b>9,50</b>

**ANNEXE 6** : Pourcentage d'hémocytes présentant des mortalités et des activités enzymatique et phagocytaires (cellules maintenues *in vivo* et exposées durant 7 jours à différentes salinités). Expérience 1

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Test 1 témoin J0	4,7	6,3	35,7	37,5	44,6
Test 2 témoin J0	5,7	9,2	41,2	54,1	32,6
Test 3 témoin J0	8,5	7,9	33,7	37,3	
Test 1 Hyposalinité J1					
Test 2 Hyposalinité J1	10,5	8,1	12,7	33	12,5
Test 3 Hyposalinité J1	15,9	9,4	13,8	25,3	12,8
Test 1 témoin J1					
Test 2 témoin J1	8	8,2	63,4	44,1	31,6
Test 3 témoin J1	7,3	13,1	51,1	66,2	38,6
Test 1 Hypersalinité J1	9,1	9,5	55	44	30,5
Test 2 Hypersalinité J1	12,4	7,2	52,8	66,6	43,8
Test 3 Hypersalinité J1	17,20	8,10	30,00	32,40	12,30
Test 1 Hyposalinité J3					
Test 2 Hyposalinité J3	9,1	18,9	63,1	66,2	23,4
Test 3 Hyposalinité J3	31,1	11,9	52,6	40,2	13,8
Test 1 témoin J3	13,9	12,3	10,7	33,6	7,7
Test 2 témoin J3	21,3	24,5	30,6	32,1	7,7
Test 3 témoin J3	13,5	19,1	26,8	45,4	13
Test 1 Hypersalinité J3	10,2	17,7	70	78,2	37,1
Test 2 Hypersalinité J3	7,1	26,6	72	68,1	34,1
Test 3 Hypersalinité J3	5,4	19,4	66	60,6	21,3
Test 1 Hyposalinité J7					
Test 2 Hyposalinité J7	16,4	5,3	70,3	5	58
Test 3 Hyposalinité J7	12,7	13,8	60,5	37,4	32,7
Test 1 témoin J7	12,8	6,7	38,8	12,7	67,8
Test 2 témoin J7	5,9	10,8	38,3	11,7	19,7
Test 3 témoin J7	22,7	7,5	30,5	9,1	61,5
Test 1 Hypersalinité J7					
Test 2 Hypersalinité J7					
Test 3 Hypersalinité J7	10,7	8,7	73,4	13,1	37,6

**MOYENNE**

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Témoin J0	<b>6,30</b>	<b>7,80</b>	<b>36,87</b>	<b>42,97</b>	<b>38,60</b>
Hyposalinité J1	<b>13,20</b>	<b>8,75</b>	<b>13,25</b>	<b>29,15</b>	<b>12,65</b>
Témoin J1	<b>7,65</b>	<b>10,65</b>	<b>57,25</b>	<b>55,15</b>	<b>35,10</b>
Hypersalinité J1	<b>10,75</b>	<b>8,35</b>	<b>53,90</b>	<b>55,30</b>	<b>37,15</b>
Hyposalinité J3	<b>20,10</b>	<b>15,40</b>	<b>57,85</b>	<b>53,20</b>	<b>18,60</b>
Témoin J3	<b>16,23</b>	<b>18,63</b>	<b>22,70</b>	<b>37,03</b>	<b>9,47</b>
Hypersalinité J3	<b>7,57</b>	<b>21,23</b>	<b>69,33</b>	<b>68,97</b>	<b>30,83</b>
Hyposalinité J7	<b>14,55</b>	<b>9,55</b>	<b>65,40</b>	<b>21,20</b>	<b>45,35</b>
Témoin J7	<b>13,80</b>	<b>8,33</b>	<b>35,87</b>	<b>11,17</b>	<b>49,67</b>
Hypersalinité J7	<b>10,70</b>	<b>8,70</b>	<b>73,40</b>	<b>13,10</b>	<b>37,60</b>

**ANNEXE 7. 1' Mesure de la salinité lors du test 1 *in vivo***  
**2' Mesure de la salinité lors du test 2 *in vivo***

**Tableau 1'**

		Hyposalinité	Témoin	Hypersalinité
J0	nouvelle eau	15	34,4	45,2
J1	eau de la veille			
J1	nouvelle eau	14,7	34,2	45
J2	eau de la veille			
J2	nouvelle eau	15,2	34,3	44,8
J3	eau de la veille	16,3	34,2	44
J3	nouvelle eau	15,1	33,8	44,9
J4	eau de la veille	17,1	33,9	43,9
J4	nouvelle eau	14,3	33,8	44,2
J5	eau de la veille	14,2	33,7	43,8
J5	nouvelle eau	13,8	34,1	44,3
J6	eau de la veille	13,8	34	45
J6	nouvelle eau	15,2	34,1	44,1
J7	eau de la veille	15,1	34,2	44,3

**Tableau 2'**

		Hyposalinité	Témoin	Hypersalinité
J0	nouvelle eau	5,1	34,6	59
J1	eau de la veille	7,4	34,5	56,7
J1	nouvelle eau	5,4	34,7	58,8
J2	eau de la veille	7,6	34,3	57
J2	nouvelle eau	4,6	33,4	59
J3	eau de la veille	6,6	33,2	56,1
J3	nouvelle eau	5,2	34,2	60,9
J4	eau de la veille	5	34,3	60
J4	nouvelle eau	7,3	34,5	55,9
J5	eau de la veille	7,5	34,5	55,4
J5	nouvelle eau	7,3	33,1	57,3
J6	eau de la veille	7,5	34,6	68,9
J6	nouvelle eau	5,3	34,5	61,7
J7	eau de la veille	7,3	34,3	60



**ANNEXE 8 : Pourcentage d'hémocytes présentant des mortalités et des activités enzymatique et phagocytaires (cellules maintenues in vivo et exposées durant 7 jours à différentes salinités). Expérience 2**

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Test 1 témoin J0	6,2	9,5	70,9	72,7	34,4
Test 2 témoin J0	10,5	9,7	59,8	62,4	35,9
Test 3 témoin J0	16,1	10,7	60,3	42,4	25,2
Test 1 Hyposalinité J1	1,9	8,8	88,5	65,6	23,9
Test 2 Hyposalinité J1	4,4	6,4	73,9	69,2	24,7
Test 3 Hyposalinité J1	5	2,4	83,9	63,4	26,2
Test 1 témoin J1	14,7	5,1	57,7	44,9	22,6
Test 2 témoin J1	22,9	8,2	62,1	57,9	30,1
Test 3 témoin J1					
Test 1 Hypersalinité J1	25	0,5	36,5	36,1	16,2
Test 2 Hypersalinité J1	7,2	2,4	37,8	81,2	57,4
Test 3 Hypersalinité J1					
Test 1 Hyposalinité J3	42	6,7	29	27,3	25,3
Test 2 Hyposalinité J3	36,3	13,7	36,3	51,2	38,2
Test 3 Hyposalinité J3					
Test 1 témoin J3	5,1	16,6	90,6	73,9	17,4
Test 2 témoin J3	4,6	14,7	56,7	55,8	21,5
Test 3 témoin J3	3,3	23,9	73	65,8	25,1
Test 1 Hypersalinité J3	59,9	31,9	45,2	26,4	14,9
Test 2 Hypersalinité J3	19,9	36,3	37,3	50,7	19,6
Test 3 Hypersalinité J3	13,6	32,8	49,9	34	7,6
Test 1 Hyposalinité J7					
Test 2 Hyposalinité J7					
Test 3 Hyposalinité J7					
Test 1 témoin J7	22,3	91,7	9,4	29,2	8,2
Test 2 témoin J7	7,7	94,3	72,4	66,8	21,9
Test 3 témoin J7	6,9	91,6	79,4	56,3	8,6
Test 1 Hypersalinité J7					
Test 2 Hypersalinité J7					
Test 3 Hypersalinité J7					

**MOYENNE**

	Mortalité	Granulocytes	Phagocytose	Estérases	Lysosomes
Témoin J0	<b>10,93</b>	<b>9,97</b>	<b>63,67</b>	<b>59,17</b>	<b>31,83</b>
Hyposalinité J1	<b>3,77</b>	<b>5,87</b>	<b>82,10</b>	<b>66,07</b>	<b>24,93</b>
Témoin J1	<b>18,80</b>	<b>6,65</b>	<b>59,90</b>	<b>51,40</b>	<b>26,35</b>
Hypersalinité J1	<b>16,10</b>	<b>1,45</b>	<b>37,15</b>	<b>58,65</b>	<b>36,80</b>
Hyposalinité J3	<b>39,15</b>	<b>10,20</b>	<b>32,65</b>	<b>39,25</b>	<b>31,75</b>
Témoin J3	<b>4,33</b>	<b>18,40</b>	<b>73,43</b>	<b>65,17</b>	<b>21,33</b>
Hypersalinité J3	<b>31,13</b>	<b>33,67</b>	<b>44,13</b>	<b>37,03</b>	<b>14,03</b>
Hyposalinité J7					
Témoin J7	<b>12,30</b>	<b>92,53</b>	<b>53,73</b>	<b>50,77</b>	<b>12,90</b>
Hypersalinité J7					