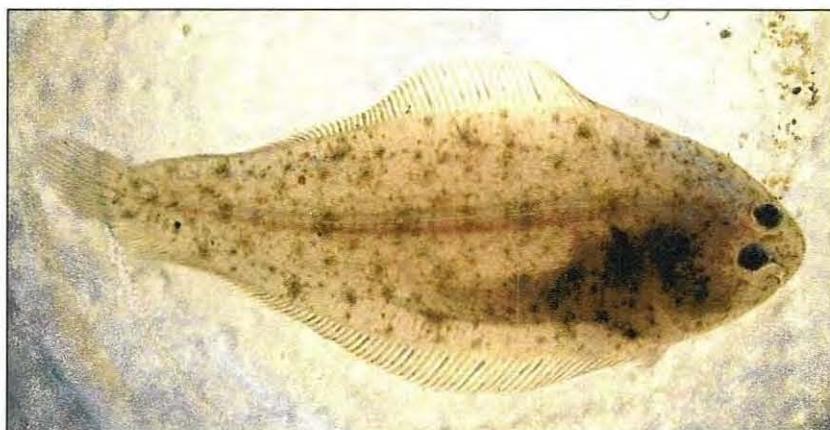




UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour
DESS Dynamique des Ecosystèmes Aquatiques

Détermination de la condition des juvéniles de sole (*Solea solea*) dans les pertuis Charentais.
(suivi saisonnier d'avril à juillet)



Pinaudeau Graziella

Septembre 2004

Stage effectué du 1 Mars au 30 Septembre 2004
Au CREMA de l'Houmeau

Sous la direction scientifique de Marie-Laure Bégout Anras et Eric Durieux

Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Marins et Aquacoles de L'Houmeau
Place du Séminaire, BP 5, 17137 L'Houmeau

Ifremer



REMERCIEMENTS

Je remercie M. Patrick Gentien, Directeur de l'unité mixte du C.R.E.M.A de l'Houmeau de m'avoir accueillie en stage dans son laboratoire ainsi que Marie-Laure Bégout-Anras et Eric Durieux de m'avoir permis d'effectuer ce stage au sein de leur équipe.

Je tiens à remercier tout particulièrement Robert Galois, chercheur au C.N.R.S, pour sa patience et sa formation aux dosages de lipides ainsi qu'Hélène Thomas (L.B.E.M université de La Rochelle), Tristan Renault (IFREMER La Tremblade) et Anne Bado pour leur collaboration et leur accueil au sein de leurs structures.

Merci aussi à Christophe Arnaud pour ses conseils lors des extractions d'otolithes et pour m'avoir fait une petite place dans son bureau, ainsi qu'à Aurélie Prinnet pour ses tuyaux et son agréable présence.

Je souhaite aussi remercier ceux qui m'ont permis d'effectuer ce travail, tout particulièrement mes parents qui m'ont accueilli chez eux et supportée, et mes amis qui m'ont soutenue pendant cette période.

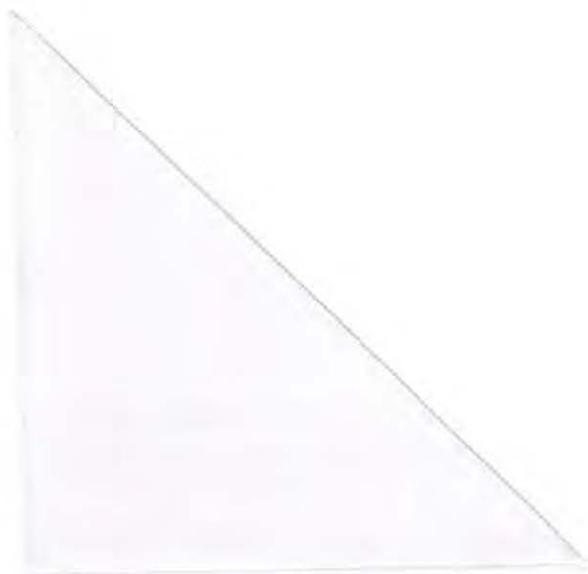


TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODE	4
1. Matériel biologique et échantillonnage :	4
1.1 Présentation de la sole (<i>Solea solea</i>).....	4
1.2 Provenance et échantillonnage des soles	4
2. Protocoles analytiques.....	5
2.1 Dissection-parasitologie	5
2.1.1 Relevés biométriques	5
2.1.2 Parasitologie : extraction des kystes, identification et localisation des métacercaires.....	5
2.1.3 Quantification de l'infestation	6
2.1.4 Identification du sexe.....	6
2.1.5 Extraction des otolithes.....	6
2.2 Mesure des réserves lipidiques	7
2.2.1 Préparation des échantillons	7
2.2.2 Extraction des lipides	7
2.2.3 Concentration des lipides totaux	7
2.2.4 Dosage des lipides au Iatrosan	7
a. Dosage des lipides totaux	7
b. Dosage des classes de lipides	8
2.3 Mesure de l'effet du parasitisme sur les systèmes de défenses non spécifiques	8
2.3.1 Prise de sang	8
2.3.2 Etude des leucocytes par la cytométrie en flux.....	9
a. Préparation des échantillons	9
b. Etude de la taille complexité par la cytométrie de flux	10
c. Etude de l'activité estérasique des leucocytes	10
2.3.3 Etude de différentes activités immunitaires par spectrophotométrie	10
a. Dosage de l'activité hémolytique spécifique du complément (Voie classique).....	10
b. Dosage de l'activité hémolytique spécifique du complément (Voie alterne).....	12
2.4 Analyse des données.....	13
RESULTATS.....	15
1. Suivi saisonnier	15
1.1 Mesures biométriques	15
1.2 Infestation parasitaire	15
1.3 Identification du sexe	17
1.4 Les indices lipidiques	17
1.5 Les défenses immunitaires non spécifiques.....	17
1.5.1 Composition de la communauté leucocytaire (taille-complexité)	17
1.5.2 Dosage de l'activité hémolytique du complément (voie classique et alterne).....	17
2. Effet du parasitisme sur les variables indicatrices de condition	19
DISCUSSION	20
CONCLUSION.....	23
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	24
ANNEXES.....	26

INTRODUCTION

Les habitats essentiels d'une espèce sont définis comme des zones géographiques ou physiques indispensables à la réalisation du cycle biologique. Chez la plupart des poissons marins ce cycle comprend quatre stades (embryon, larve, juvénile, adulte) correspondant aux différentes étapes du développement de l'individu. Les besoins des organismes varient au cours de leur développement et le passage d'un stade ontogénique au suivant s'accompagne le plus souvent de la recherche d'un biotope particulier dit aussi habitat essentiel. Si toutes les étapes et les habitats essentiels associés sont indispensables à la réalisation complète du cycle biologique, certaines phases sont critiques et déterminent le recrutement, c'est à dire la participation d'une classe d'âge au renouvellement de la population adulte. C'est le cas pour les poissons plats des zones tempérées comme la sole commune du Golfe de Gascogne (*Solea solea* (L.)), pour lesquels les stades larvaires et **juvéniles** déterminent la variabilité du recrutement.

Si le cycle de cette espèce est connu, il est néanmoins important d'étudier de plus près les stades critiques et tout particulièrement la période juvénile. En effet, la sole exploite au cours de son cycle biologique les milieux côtiers et estuariens où la production est élevée : ce sont les zones de nourriceries pour les juvéniles (Van der Veer et al., 2000). Les conditions de survie et de croissance y sont normalement optimales (Miller et al., 1998). Cependant, ces zones côtières subissent des pressions anthropiques croissantes qui risquent d'affecter la qualité de ces habitats-clés nécessaires au déroulement du cycle biologique. Ceci peut affecter le recrutement et finalement la taille de la population (Ferber, 2001). Or, la sole est une espèce d'intérêt majeur pour le Golfe de Gascogne, tant en raison de son abondance que pour son importance économique. Cette espèce de 1^{er} rang en valeur marchande, pour les pêcheries atlantiques soutient aussi une activité de petits métiers en particulier dans les pertuis Charentais. Depuis les années 90, la biomasse féconde et le recrutement annuel sont en diminution et actuellement, le stock de cette espèce est déclaré en danger.

Les pertuis Charentais représentent une zone de nourricerie majeure pour la population de sole du Golfe de Gascogne. Les abondances et les densités de juvéniles y sont parmi les plus fortes (Le Pape et al., 2003 a). Cependant, la taille moyenne automnale des juvéniles d'âge 0 semble être parmi les plus faibles des nourriceries du Golfe de Gascogne (Le Pape et al., 2003 b) alors que les facteurs climatiques ne sont pas limitant à la croissance. Il semble donc que d'autres facteurs interviennent, d'autant plus que le site des pertuis Charentais soutient de nombreuses activités humaines notamment la conchyliculture. De possibles interactions entre ces activités conchylicoles et le fonctionnement de la nourricerie des pertuis sont d'ailleurs en cours d'étude. Ceci a mené à la découverte chez les juvéniles d'un parasitisme important par un digène du genre *Proserhynchus* de la famille des Bucéphalidés (Laffargue et al., 2004) déjà connu pour infester et stériliser les moules (Coustau et al., 1990). Comme tous les Digènes, ce parasite a un cycle biologique complexe (Matthews, 1973) passant par trois hôtes différents (figure 1).

Dans les pertuis Charentais un des hôtes définitifs est le congre (*Conger conger*). Il est parasité en consommant la sole, l'un des seconds hôtes intermédiaires existants. Nos campagnes dans les pertuis ont permis de confirmer le parasitisme du premier hôte intermédiaire (*Mytilus edulis* (L.)) déjà identifié dans la littérature.

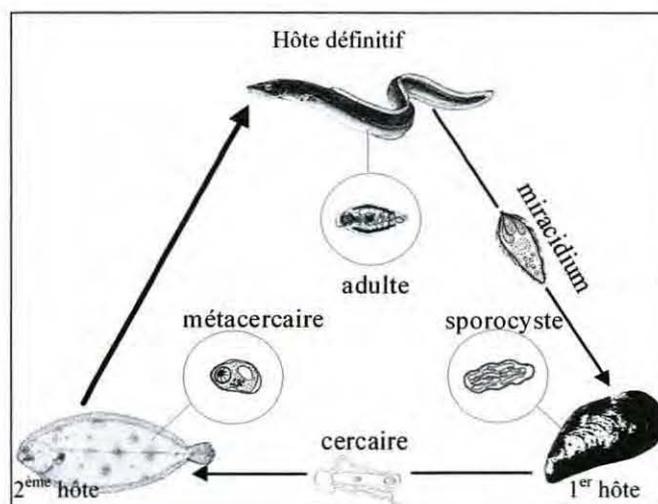


Figure 1 : Schéma du cycle biologique de Prosorhynchus spp. dans les pertuis Charentais.

On se propose d'estimer la condition générale des soles à leur arrivée sur le pertuis Breton. Dans un premier temps l'analyse lipidique et l'immunologie sont étudiés et mis en relation avec le parasitisme afin de trouver un effet éventuel du parasitisme sur les juvéniles.

Ce travail s'intègre donc dans un ensemble de travaux initiés en 2002 sur le parasitisme des juvéniles de sole et plus particulièrement dans le contexte d'une thèse sur les « Performances biologiques et écologiques de la sole dans les pertuis Charentais ». L'objectif de mon stage est de déterminer la condition, au sens large, des juvéniles de soles à leur arrivée dans les pertuis et de suivre son évolution saisonnière.

Pour ce, différentes analyses sont menées en utilisant la biométrie, l'épidémiologie, l'étude des réserves lipidiques et l'immunologie.

La biométrie permet de suivre la **croissance** des individus depuis leur arrivée sur la zone de nourricerie et de suivre leur **condition** grâce à l'indice de condition de Fulton.

L'**épidémiologie** permet d'évaluer, de qualifier et de suivre l'**infestation** des juvéniles. Le parasitisme entraîne souvent un surcoût métabolique pour l'hôte ce qui peut provoquer une altération physiologique non négligeable. De plus il a été montré que de nombreuses espèces de digènes peuvent altérer le phénotype du 2^{eme} hôte intermédiaire (ici la sole) en influençant différentes fonctions physiologiques (système nerveux central, communications hormonales) de façon à modifier le comportement ou la morphologie. Ainsi l'hôte intermédiaire est plus facilement soumis à la prédation par l'hôte définitif du parasite.

Les dosages lipidiques permettent d'évaluer l'**état nutritionnel** des juvéniles de sole à partir du rapport triglycérides sur stérols libres. Il y a différentes familles ou classes de lipides qui assurent plusieurs fonctions biologiques importantes. Elles contribuent en effet à la structure des membranes cellulaires, ce sont des formes de réserves et de transport des métabolites énergétiques, ils ont un rôle de protection à la surface des organismes et participent à l'immunité cellulaire.

Les lipides de réserve sont essentiellement des triglycérides, encore appelés triacylglycérols. Ils constituent une source d'énergie très importante pour l'individu et selon leurs besoins, les animaux vont soit les dégrader soit les stocker.

Les lipides de structure sont essentiellement les phospholipides et les stérols. Ces molécules entrent dans la composition des diverses membranes et enveloppes cellulaires des êtres vivants. Pour un individu donné la quantité de stérols varie peu car ils ne sont dégradés

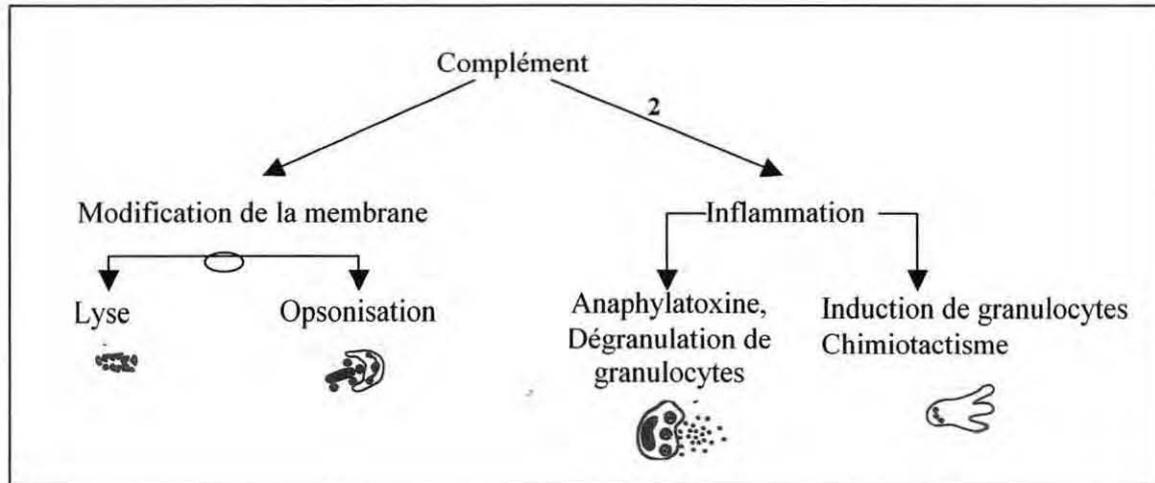


Figure 2 : Les différentes fonctions du complément.

La première fonction du complément est d'altérer les membranes de pathogènes par lyse ou opsonisation (1).

La seconde fonction du complément est de déclencher l'inflammation (2).

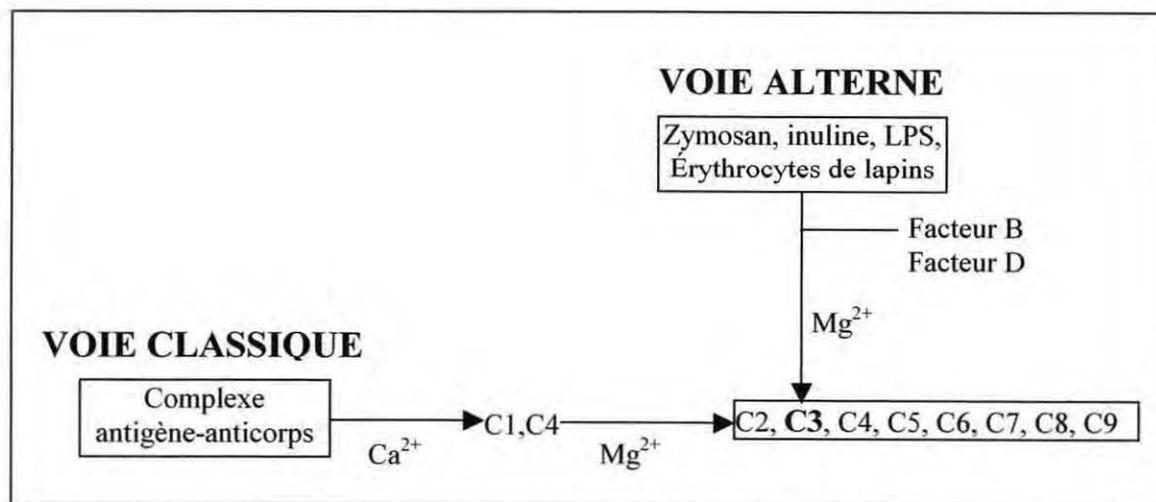


Figure 3 : La voie classique et la voie alterne du complément chez la carpe (*Cyprinus carpio*) d'après Yano (1996).

qu'en dernier recours lors d'un jeûne prolongé et les stérols sont bien corrélés au poids sec des individus.

L'**immunologie** permet d'évaluer l'**état des défenses immunitaires** non spécifiques par l'étude des différentes populations de leucocytes en cytométrie en flux et par le dosage de l'activité du complément en spectrophotométrie.

Les leucocytes ou globules blancs, malgré leur diversité ont tous pour fonction principale de défendre l'organisme contre l'invasion par des corps étrangers. Leur rôle est très important dans la défense immunitaire de l'organisme : les granulocytes, les monocytes et les macrophages (différenciation des monocytes dans les tissus) éliminent directement par phagocytose les agents infectieux tels que les bactéries. Les lymphocytes synthétisent les anticorps spécifiques dirigés contre les agents infectieux.

Le complément est un élément du système humoral non spécifique. Il joue un rôle très important dans les systèmes de défense de l'organisme contre les pathogènes. En effet il est constitué d'un ensemble de protéines plasmatiques capables de tuer les pathogènes par lyse cellulaire et de déclencher les mécanismes d'inflammation (figure 2). De plus le complément peut être activé avant que n'apparaisse la réponse immunitaire.

Alors que le système du complément est bien défini chez les mammifères, sa caractérisation chez les poissons est encore incomplète. Son activité a été décrite chez le poisson en 1945 par Cushing. Plus récemment, une étude sur les poissons osseux a permis d'isoler et de purifier 11 composants du complément chez la carpe, *Cyprinus carpio* (Yano, 1996) (figure 3). Le système du complément est constitué de deux voies principales :

- la voie alterne est indépendante du complexe antigène-anticorps mais dépendante de constituants chimiques présents à la surface des cellules étrangères.
- la voie classique activée par le complexe antigène-anticorps.

En cas d'activation persistante du complément, les granulocytes sortiront des réserves situées dans la moelle osseuse pour circuler dans le sang. Aussi les composants du complément forment un enzyme puissant (la phospholipase) qui perce les parois cellulaires des pathogènes, ce qui les rend très vulnérables aux attaques chimiques des phagocytes.

L'état des défenses immunitaires des individus est très important. En effet une déficience immunitaire peut fortement affaiblir les individus (infections répétées, maladies). L'énergie normalement allouée pour la croissance est alors utilisée pour la survie ce qui peut être fatal aux jeunes stades de développement.

Mon travail a donc consisté à faire un suivi saisonnier de ces critères indicateurs de la condition des juvéniles de sole : croissance, infestation parasitaire, réserves lipidiques, composition de la communauté leucocytaire, activité du complément. Ainsi nous avons réalisé une première évaluation de l'impact du parasitisme sur les performances biologiques et écologiques des juvéniles de sole. Ce travail permet d'obtenir les premiers résultats pour des animaux aussi petits (très jeunes G0) et permet ainsi de voir quelle approche est la mieux adaptée à ce genre de matériel biologique.

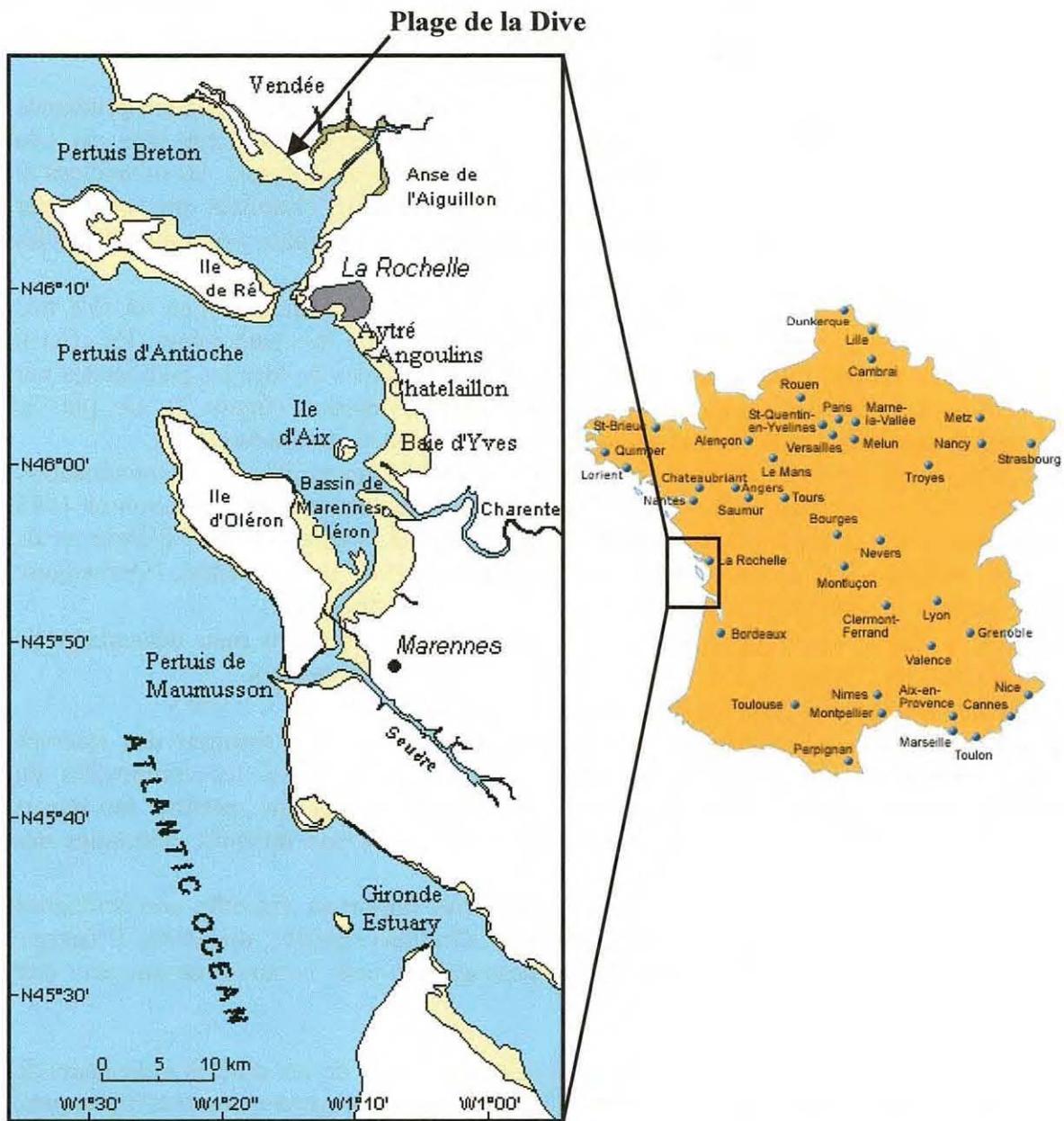


Figure 5 : Localisation géographique des pertuis Charentais et de la zone de prélèvements.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. Matériel biologique et échantillonnage :

1.1 Présentation de la sole (*Solea solea*) :

La sole commune, *Solea solea* (Linné, 1758), est un Vertébré de la classe des Osteichthyens, de l'ordre des Pleuronectiformes et de la famille des Soleidae. Son aire de répartition s'étend de la Norvège jusqu'au nord de l'Afrique ainsi qu'en Méditerranée. Ce poisson plat a perdu sa symétrie latérale en raison de la migration de l'œil gauche sur la face opposée afin d'adopter une vie benthique. La face aveugle et blanche (flanc gauche) est posée à plat sur le substrat. L'autre face, dite zénithale, est pourvue de pigments lui permettant une homochromie avec le milieu dans lequel il évolue. Ce poisson vivant sur les fonds de sables fins, sablo-vaseux ou vaseux présente une bonne tolérance à la dessalure des eaux ce qui permet de le rencontrer toute l'année en zone côtière et dans les estuaires. D'une manière plus générale, les habitats essentiels de la sole se retrouvent sur l'ensemble du plateau continental. A maturité sexuelle, 3 ans pour les femelles et 4 ans pour les mâles, la reproduction a lieu sur des frayères situées sur des fonds de 30 à 100 m de profondeur. En ce qui concerne le Golfe de Gascogne, elle se déroule au large des pertuis Charentais, de l'estuaire de la Loire et de la Gironde ainsi que le long des côtes landaises. Après éclosion, les larves pélagiques migrent passivement 1 à 2 mois avant de devenir benthiques suite à une métamorphose complexe. Dans le Golfe de Gascogne les juvéniles rejoignent des zones de nourriceries côtières localisées soit dans des baies (**pertuis Charentais**, Bourgneuf) soit dans des estuaires (Vilaine, Loire, Gironde) susceptibles de leur apporter des conditions plus favorables à leur croissance (zones riches en nourriture, refuges contre les prédateurs...). A maturité sexuelle, les jeunes quittent ces zones pour rejoindre les frayères (figure 4).

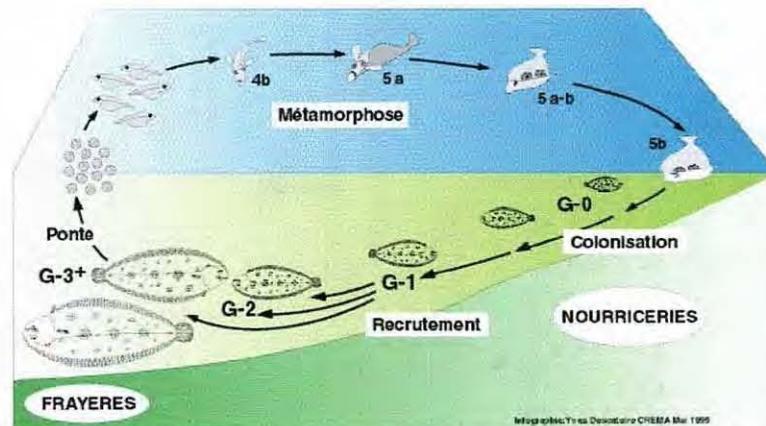


Figure 4 : Schéma du cycle biologique de la sole commune.

1.2 Provenance et échantillonnage des soles :

Le matériel biologique de cette étude provient des eaux peu profondes des pertuis Charentais. Ces pertuis (**pertuis Breton**, pertuis d'Antioche et pertuis de Maumusson) sont situés à proximité de l'importante frayère de Rochebonne. Nos échantillonnages ont eu lieu plus précisément dans le pertuis Breton. Ce dernier est un détroit de 360 km² de superficie qui se situe entre la côte vendéenne et la côte nord est de l'île de Ré (figure 5). Les soles



Figure 6 : La plage de la Dive : zones de pêches en fonction de la technique utilisée.

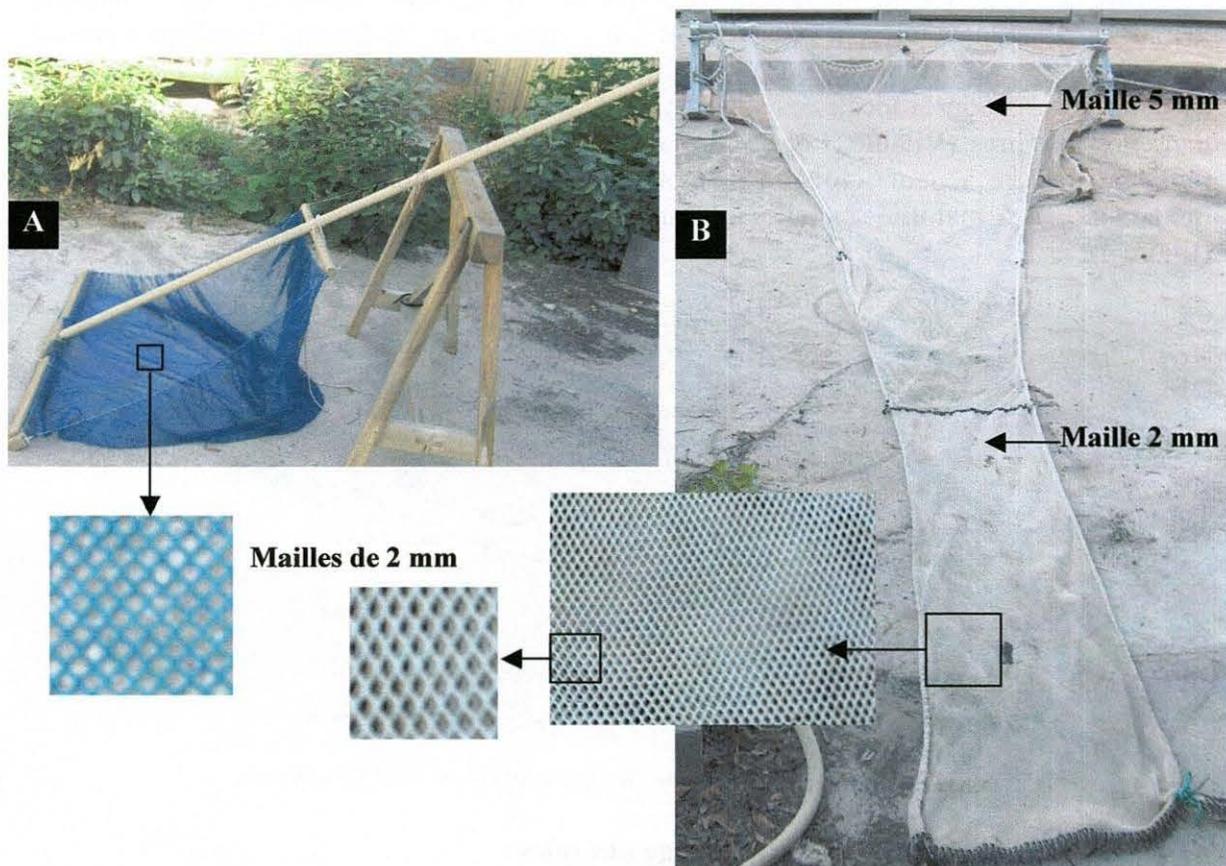


Figure 7 : A. Haveneau utilisé pour la pêche à pied. Maillage : 2 mm.

B. Chalut utilisé pour la pêche en bateau. Maillage 5 mm en tête, 2 mm au niveau de la poche terminale.

sont pêchées en Vendée à proximité de la plage de la Dive (figure 6), zone où l'activité mytilicole est importante.

Deux techniques de pêche sont utilisées :

– *A pied* : cette méthode est utilisée à marée basse au début des coefficients de vives eaux (coefficient supérieur à 80). Un haveneau de maille 2 mm (figure 7) permet de capturer les juvéniles posés sur le substrat depuis le milieu de la zone de bouchots jusqu'au bord de la plage de la Dive au fur et à mesure que la marée monte. Cette technique permet de capturer les jeunes soles dès leur arrivée sur la zone de nourricerie bien qu'elles soient encore très petites et très proches des côtes.

– *En bateau* : le chalutage permet de pêcher les animaux à la limite de la zone de bouchots, coté océan. Cette technique permet de pêcher les juvéniles alors qu'ils commencent à s'éloigner de la zone intertidale. Elle est mise en œuvre à partir d'août et le maillage du filet est de 5 mm et 2 mm en fond de chalut (figure 7).

Afin d'établir un suivi, les prélèvements sont effectués tous les débuts de mois à l'occasion des grands coefficients de marée. La période d'échantillonnage commence au mois de mai, avec l'arrivée des juvéniles, jusque fin septembre 2004.

Le présent rapport ne traite pas l'ensemble des campagnes, mais uniquement les trois premières pêches à la suite desquelles deux lots sont constitués :

- le premier lot comporte les soles destinées aux **dosages de lipides** soit environ 20 soles G0 sur lesquelles sont effectuées les mesures biométriques, la parasitologie et les dosages lipidiques. Les soles sont congelées à -80°C dès le retour de la pêche afin d'éviter toute dégradation des tissus.

- le second lot comporte les soles destinées à **l'analyse de certains paramètres immunitaires** soit environ 20 soles sur lesquelles sont effectuées les mesures biométriques, la parasitologie, l'étude de l'activation hémolytique du système du complément (voie alterne et classique) et l'étude de la taille complexité des cellules immunitaires. Ces animaux sont conservés vivants en aquarium jusqu'au moment de la prise de sang, cinq jours après la pêche. Ils sont ensuite congelés à -20°C jusqu'à la dissection.

2. Protocoles analytiques :

La figure 8 récapitule chronologiquement l'ensemble des analyses effectuées. La totalité des animaux subissent les mesures biométriques et la parasitologie. Les lipides sont uniquement dosés sur les animaux du premier lot alors que l'approche immunologique se fait sur le second.

2.1 Dissection parasitologie

2.1.1 Relevés biométriques

La longueur totale (Lt en mm), la longueur standard (Ls en mm) ainsi que le poids frais (Pf en g) sont mesurés avec une précision respective de 0,5 mm et de 10^{-4} g. Une seconde mesure du poids frais est effectuée après retrait du bol alimentaire. L'indice de condition de Fulton ($K=100 \text{ Pf (en g) / Ls (en cm)}$) est ensuite calculé à partir de la seconde valeur de poids frais. Un second indice de condition est calculé à partir du poids sec ($K_S=100 \text{ Pf (en g) / Ls (en cm)}$).

2.1.2 Parasitologie : extraction des kystes, identification et localisation des métacercaires

PECHE
(récolte de juvéniles de sole G0 dans le Pertuis Breton)

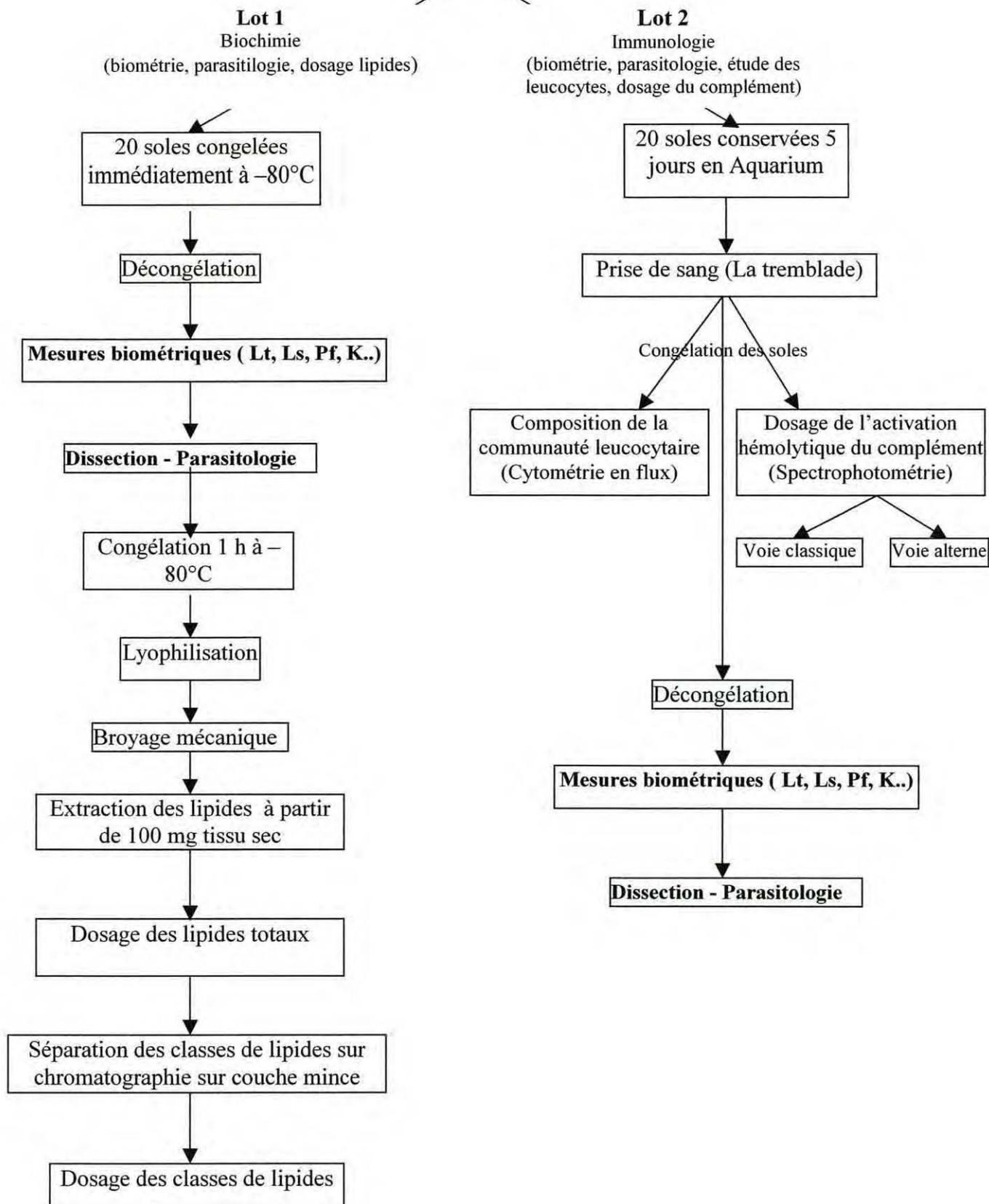


Figure 8 : Schéma récapitulatif des manipulations exercées sur les soles depuis la pêche.
En gras apparaissent les étapes identiques pour les deux lots.

La peau des soles est retirée, puis l'ensemble des tissus est examiné, sous la loupe binoculaire (grossissement 16), afin d'en extraire tous les kystes. Pour chaque individu les kystes sont stockés dans une boîte de pétri avec de l'eau distillée selon cinq zones d'extraction :

- la tête : kystes localisés dans les joues, le museau, la gorge, les yeux.
- les nageoires
- les muscles ptérygiens
- les muscles latéraux
- autres : cette catégorie regroupe toutes les autres localisations rencontrées (cavité abdominale ...) qui sont précisées sur la feuille de relevé associée à chaque individu.

Le contenu de chaque kyste est examiné et la métacercaire est identifiée à l'espèce. Les observations sont notées sur une feuille de relevé (annexe 1).

Ainsi il est possible de déterminer les tissus infestés pour chaque individu et d'établir une cartographie d'infestation pour chaque zone grâce à un indice d'occurrence (O) tel que :

- $O_{zone\%} = (N/Pé) * 100$ où N = nombre de poissons parasités au moins une fois dans la cible
 $Pé$ = nombre de poissons parasités

2.1.3 Quantification de l'infestation

Différentes caractéristiques de l'infestation sont prises en compte :

- son *intensité* (I) c'est à dire le nombre de parasites par individu parasité.
 $I = Pa / Pé$ où Pa est le nombre de parasites et $Pé$ le nombre de poissons parasités
- son *abondance* (A) c'est à dire le nombre moyen de parasites dans chaque individu.
 $A = Pa / T$ où T est la taille de l'échantillon.
- sa *prévalence* (P) qui est le pourcentage de poissons parasités dans l'échantillon.
 $P\% = (Pé/T) * 100$ ou $P\% = A/I * 100$

2.1.4 Identification du sexe

Le sexe, très dimorphique, est facilement identifiable chez les adultes lors de la dissection. Les femelles possèdent des ovaires tubulés logés le long du prolongement de la cavité abdominale. Les mâles ont des testicules plus antérieurs, de petite taille et de forme ovoïde. Cependant il est assez difficile de sexer les individus G0 car, bien que le sexe soit déjà différencié, il n'était pas encore bien visible en raison du très jeune âge des animaux. Il est donc identifié à chaque fois que cela est possible.

2.1.5 Extraction des otolithes

Les otolithes, concrétions calcifiées de l'oreille interne des poissons, sont prélevées sous la loupe binoculaire et nettoyées des tissus adhérents. Deux des trois paires (Sagittae et Lapilli) sont extraites afin de déterminer l'âge journalier des juvéniles nécessaire pour la suite de l'étude.

Après la dissection, les soles destinées aux dosages lipidiques sont découpées en morceaux et replacés au congélateur à -80°C , avec leur tube digestif vidé du bol alimentaire.

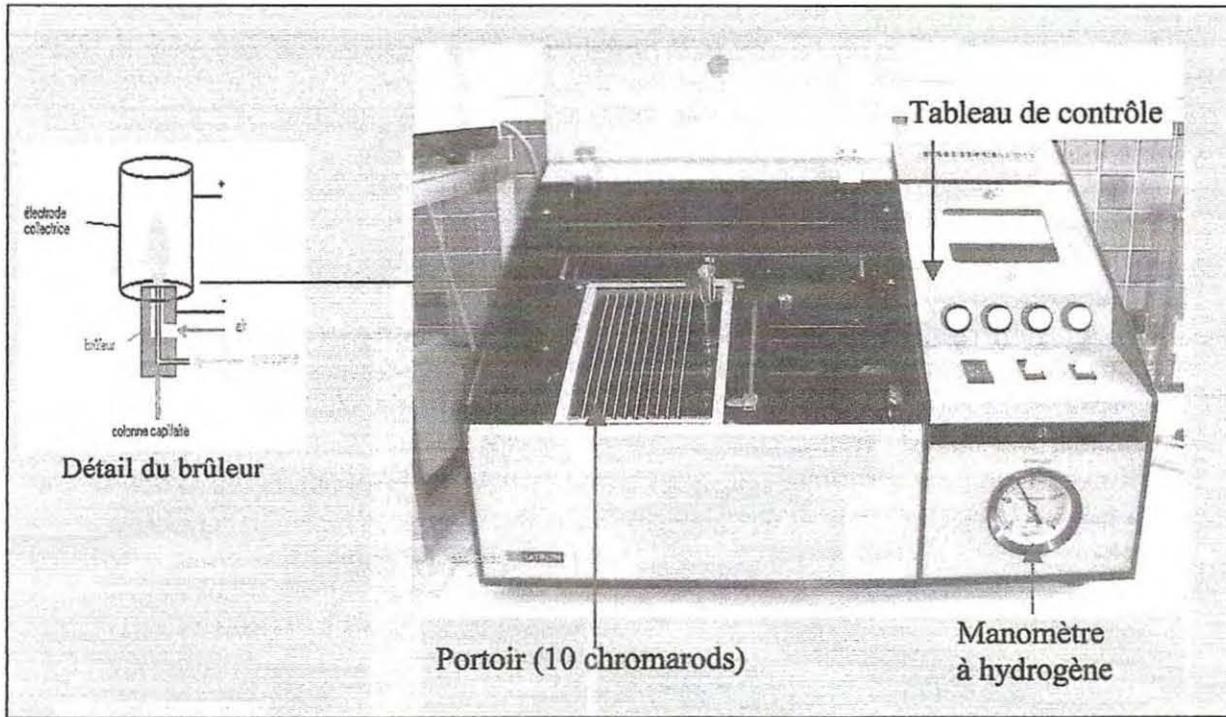


Figure 9 : Photo du Iatroscan utilisé en dosage de lipides pour la lecture des baguettes .

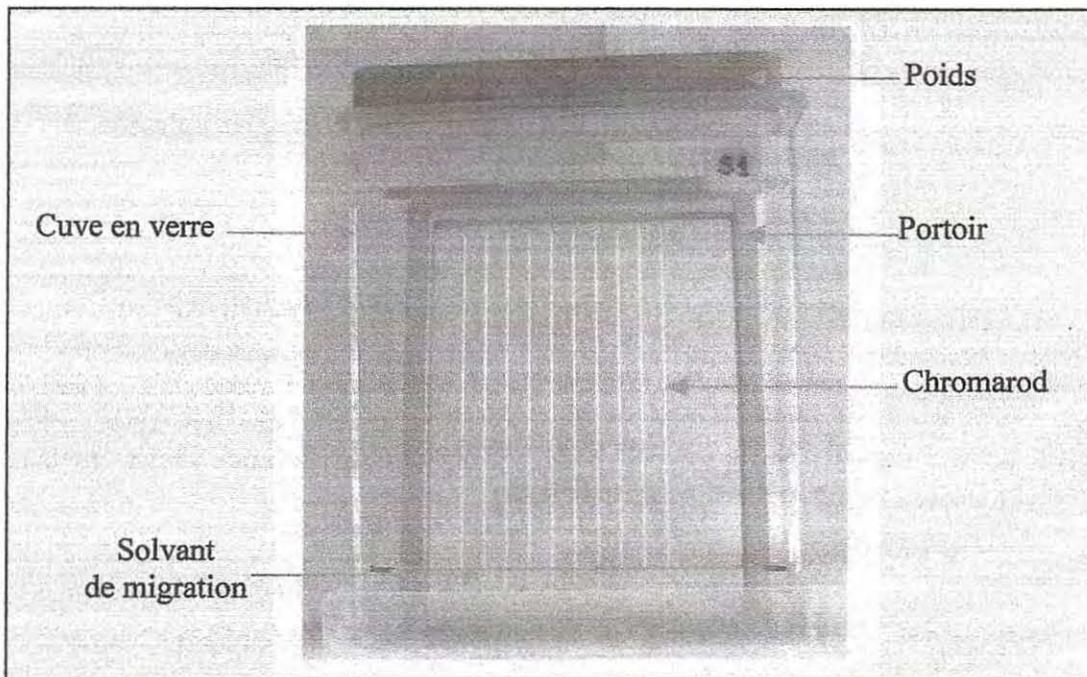


Figure 10 : Séparation des classes de lipides dans la cuve de migration.

2.2 Mesure des réserves lipidiques

2.2.1 Préparation des échantillons

Les soles découpées en morceaux après la dissection et placées à -80°C subissent une lyophilisation c'est à dire l'élimination de l'eau des échantillons par sublimation. Grâce à un vide poussé pendant au moins 48 heures, cette technique permet le passage direct de l'état de glace à celui de vapeur. La vapeur est aussitôt piégée sous forme de glace par un serpentin réfrigéré. Le poids sec des individus est alors mesuré puis les morceaux de sole sont broyés à sec jusqu'à obtenir une poudre très fine et homogène stockée dans un tube à -20°C jusqu'au moment de l'extraction.

2.2.2 Extraction des lipides

Les lipides étant des biomolécules organiques insolubles à l'eau, ils sont extractibles des cellules et des tissus par des solvants non polaires tel que le chloroforme.

L'extraction des lipides se fait à partir d'une masse sèche d'environ 100 mg. Les individus ayant une masse corporelle sèche inférieure à 100 mg sont totalement utilisés. A chaque fois la masse exacte prélevée est notée. Afin d'extraire l'ensemble des lipides de l'échantillon, la méthode de Folch et al. (1957) modifiée est utilisée. Le mélange des solvants apolaire utilisé est composé :

- d'un solvant organique hydrophobe, le chloroforme (polarité = 0,4) qui permet de retenir les lipides dans la phase apolaire.
- d'un alcool, le méthanol, (polarité = 0,95) qui permet de rompre les liaisons électrostatiques (forces de Van Der Waals) entre les lipides et les protéines. De plus il permet aussi de solubiliser les composés polaires.
- d'une solution de chlorure de sodium (polarité = 1) qui solubilise les composés non lipidiques, favorise la formation de deux phases et permet de maintenir les phospholipides dans la phase hydrophobe et non à l'interphase.

En respectant les proportions déterminées dans la méthode de Folch et al. (1957), on obtient après 4 heures de décantation un mélange biphasique constitué :

- d'une phase supérieure où l'on trouve l'eau et l'alcool et qui contient tous les contaminants non lipidiques
- d'une phase inférieure chloroformique contenant l'ensemble des lipides et qui est donc récupérée.

2.2.3 Concentration des lipides totaux

Cet extrait contient peu de lipide (environ 6,3%). Afin de le concentrer il est évaporé à chaud sous flux d'air et d'azote afin d'obtenir un culot. Le culot est ensuite redissout dans un volume de Chloroforme / Méthanol (9 : 1) calculé (Galois, communication personnelle) de façon à obtenir un extrait de concentration égale à $20 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$, valeur optimale pour le bon fonctionnement de l'appareil de lecture. La concentration exacte de l'échantillon est mesurée lors du dosage de lipides totaux.

2.2.4 Dosage des lipides au Iatroskan (Iatroskan TH 10)

a. Dosage des lipides totaux

Le Iatroskan permet le dosage des lipides grâce à un détecteur à ionisation de flamme (figure 9). Un dépôt de $1 \mu\text{l}$ d'extrait (soit environ $20 \mu\text{g}$ de lipides totaux) est déposé à l'aide d'une seringue Hamilton $2 \mu\text{l}$ sur des baguettes de quartz de $75 \mu\text{m}$ de

diamètre enrobées de silice micro granuleuse : ce sont des Chromarods. Dix baguettes disposées sur un portoir sont utilisées pour la lecture au Iatroscan. Chaque dépôt brûle en traversant la flamme, dégageant des ions. Le signal électrique induit est lu, amplifié et traduit lors de la sortie papier des dosages sous forme d'aire proportionnelle à la quantité de lipides brûlés.

Les lipides totaux de l'extrait sont dosés afin de savoir quel volume exact doit être prélevé pour faire le dosage des classes de lipides tout en restant dans la gamme de concentrations optimales à la détection (de 20 à 40 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$).

b. Dosage des classes de lipides

Après le dosage des lipides totaux l'extrait est de nouveau évaporé puis redissout dans un volume de Chloroforme / Méthanol (9 : 1) de façon à déposer exactement 20 μg sur chaque baguette. Le Iatroscan est aussi utilisé pour la lecture des classes de lipides mais les lipides totaux doivent préalablement être séparés en différentes classes (hydrocarbures, acides gras libres, **triacylglycérols**, **stérols libres**, lipides polaires, diacylglycérols). Cette séparation se fait par chromatographie sur couche mince selon la polarité des composés pour deux phases :

- une phase stationnaire (polaire) qui est la phase siliceuse recouvrant les chromarods
- une phase mobile (apolaire) qui est un mélange de solvants dans les proportions :
 - Hexane à 85%, polarité 0
 - Diéthyléther à 15%, polarité 0,28
 - Acide formique à 0,05%, polarité 0,98

Sur chaque baguette est déposé 1 μl d'échantillon grâce à une seringue Hamilton de 2 μl . Le portoir est déposé pendant 30 minutes dans une cuve de migration contenant 100 ml de solvant (figure 10).

La lecture se fait ensuite grâce au Iatroscan de la même façon que pour les lipides totaux (annexe 2).

2.3 Mesure de l'effet du parasitisme sur les systèmes de défenses non spécifiques

Les manipulations décrites ci-dessous s'effectuent avant la dissection pour la parasitologie (2.1) car les animaux doivent être vivants. Ils sont ensuite conservés congelés jusqu'à la dissection.

2.3.1 Prise de sang

Les soles destinées aux analyses immunitaires sont transportées vivantes au laboratoire IFREMER de La Tremblade (17). Le sang de chaque animal est prélevé au niveau de l'aorte dorsale grâce à une seringue 1 ml (munie d'une aiguille de 0,45 mm) contenant 0,2 ml d'héparine (héparine choay®, 25000 U.I /5 ml, Sanofi-synthelabo). Le sang est ensuite transféré dans un tube stérile contenant 0,2 ml d'héparine et auquel il est de nouveau ajouté 0,2 ml d'héparine pour éviter la coagulation des hématies. Le tube est plongé dans la glace tout au long des manipulations afin d'éviter la dénaturation du prélèvement.

⇒ Pour chaque individu un volume de 165 μl de ce mélange sang-héparine est transféré dans un tube conique stérile. Une centrifugation de 15 min est effectuée à 1500 tours min^{-1} à 4°C. Le surnageant, contenant les globules blancs, est récupéré dans un tube conique stérile aussitôt placé dans l'azote liquide (-183°C). Dès le retour au CREMA ces échantillons sont conservés à -80°C afin de ne pas dénaturer les cellules. Ce prélèvement est utilisé par la suite pour le **dosage du complément** en spectrophotométrie.

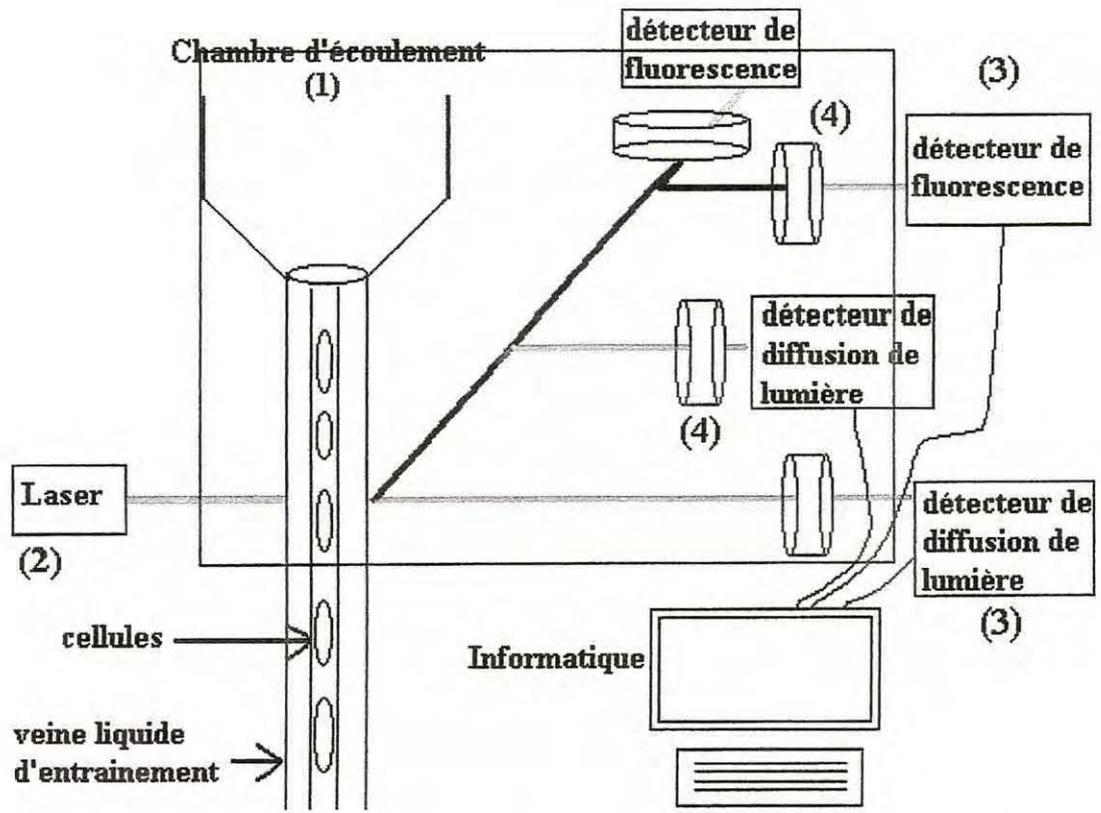


Figure 11 : Schéma simplifié d'un cytomètre en flux.

⇒ Le mélange sang-héparine restant est dilué au $10^{\text{ème}}$ avec du milieu Leibowitz 15 (L15, VWR International) stérile. Ce milieu présente des caractéristiques similaires à celles du milieu interne du poisson. La solution obtenue est utilisée pour l'étude **taille-complexité** des leucocytes et leur activité estérasique en cytométrie en flux.

2.3.2 Etude des leucocytes par la cytométrie en flux (Logiciel Expo 2XL4)

La cytométrie en flux est une technique d'analyse qualitative et quantitative qui permet de discriminer des cellules en suspension selon plusieurs paramètres simultanément.

Un cytomètre en flux est constitué d'un système d'écoulement des fluides, d'une source lumineuse excitatrice, d'une chambre de mesures, de circuits optiques acheminant les faisceaux lumineux et de photodétecteurs (figure 11). Le cytomètre est relié à un système informatique permettant le stockage des données, leur analyse ainsi que la représentation des résultats.

Les cellules en suspension (des leucocytes dans notre étude) sont injectées dans une veine liquide. Elles sont ainsi guidées et défilent individuellement devant un faisceau laser. Les cellules émettent alors différents types de signaux lumineux. Chaque cellule va d'une part diffracter la lumière et d'autre part émettre des fluorescences. La fluorescence peut être naturelle ou résulter de l'incorporation ou de la fixation de sondes spécifiques (fluorochromes, anticorps marqués...). Lorsque la diffusion de la lumière est mesurée selon un petit angle par rapport à l'axe du rayon incident alors l'intensité lumineuse est corrélée à la taille de la cellule. Lorsque la diffusion de la lumière est mesurée selon un angle droit par rapport à l'axe du rayon incident alors l'intensité lumineuse est corrélée au contenu interne de la cellule. Les signaux optiques émis par chaque cellule sont ensuite séparés par un jeu de miroirs et de filtres puis acheminés vers les photodétecteurs où les signaux optiques sont convertis en signaux électriques. Les paramètres étudiés sont représentés à l'écran sous forme graphique (histogrammes et cytogrammes). Sur les cytogrammes (taille-complexité par exemple) chaque cellule est représentée par un point. Les histogrammes indiquent en abscisse l'intensité du signal et en ordonnée le nombre de cellules.

L'analyse morphologique des leucocytes (basée sur leur propriété de diffusion de la lumière) est réalisée sur un cytogramme représentant la taille en fonction du contenu interne de la cellule (cytogramme taille-complexité). Cette analyse permet de séparer les leucocytes en différentes sous-populations (monocytes, granulocytes, lymphocytes) et d'en obtenir les proportions respectives pour chaque individu (en %) (annexe 3).

Un essai sur l'activité estérase des leucocytes est également effectué afin d'essayer d'encore mieux discriminer les différentes sous populations de leucocytes à partir d'une fluorescence induite par marquage.

Les étapes suivantes se sont déroulées au laboratoire de génétique et pathologie de l'IFREMER de La Tremblade en collaboration avec T. Renault.

a. Préparation des échantillons

→ *Elimination préalable des hématies, isolement des leucocytes :*

Grâce à une pipette graduée 10 ml stérile et une pipetboy chaque solution est déposée lentement sur un coussin de 3 ml de Percoll 40% (Percoll 40%, tampon phosphaté PBS 60%). L'ensemble est centrifugé à 2000 tours min^{-1} pendant 20 min à une température de 3°C . Les leucocytes sont alors prélevés à l'interface Percoll-milieu grâce à une aiguille montée sur une seringue. Ils sont remis en suspension dans 5 ml de milieu L15 puis

centrifugés (10 minutes à 1500 tours min^{-1} à 4°C) afin d'éliminer le surplus de Percoll. Les leucocytes sont de nouveau récupérés et remis en suspension dans 0,5 ml de milieu L15.

→ *Calibration des échantillons*

40 μl de chaque échantillon est déposé sur une cellule de Malassez afin d'effectuer un comptage cellulaire. Chaque concentration est ainsi ajustée à l'aide de L15 stérile à 1,5 million de leucocytes par millilitre.

b. Etude de la taille complexité par la cytométrie de flux (logiciel Expo 2XL4)

Un volume de 200 μl de suspension cellulaire est testé pour chaque échantillon. Le nombre d'événement est réglé à 3000. Les cellules sont discriminées en fonction de leur taille et de leur contenu cellulaire plus ou moins complexe.

c. Etude de l'activité estérasique des leucocytes

A un volume de 200 μl de suspension cellulaire de leucocytes est ajouté 1 μl de substrat de l'enzyme estérase (solution mère de Fluoresceine diacétate : FDA, 400 μM , DMSO comme solvant, 490/514 nm, Molecular probes). Ce substrat, la fluoresceine diacétate (FDA), est associé à une molécule qui devient fluorescente lorsqu'il est hydrolysé par l'estérase. La réaction a lieu pendant 30 minutes à l'obscurité à température ambiante. Le tube est ensuite placé 5 min dans la glace afin d'arrêter la réaction. La fluorescence verte (FL1) est alors dosée par le cytomètre ce qui permet d'estimer l'activité estérase des cellules. Cette activité étant différente pour chaque type cellulaire, ceci devrait permettre de discriminer les différentes sous populations de leucocytes sur un cytogramme.

2.3.3 Etude de différentes activités immunitaires par spectrophotométrie

Ces dosages, réalisés au L.B.E.M (Université de La Rochelle) en collaboration avec H. Thomas, sont effectués sur les échantillons mis de côté à -80°C après la prise de sang (chap.2.3.1) destinés aux dosages de l'activité hémolytique du complément. Il y a donc 1 échantillon de plasma par individu.

a. Dosage de l'activité hémolytique spécifique du complément : Voie classique

Ce dosage permet d'évaluer la capacité du sérum à lyser des globules rouges de moutons sensibilisés (GRMs), c'est à dire recouvert d'anticorps de sole anti-GRM. Ici la CH50 est le volume de plasma en ml nécessaire pour lyser 50% des GRM pendant 1 heure à 20°C.

→ *Préparation des tampons et solutions (Yano, 1992)*

Deux solutions mères (solution mère de tampon-véronal (5VB) et solution mère de calcium et magnésium) ainsi que trois solutions tampons (tampon gélatine-véronal (GVB²⁺), tampon glucose-gélatine-véronal (GGVB²⁺), tampon EDTA-gélatine-véronal (EDTA-GVB) sont préalablement préparées (annexe 4).

Les tampons sont conservés à 4°C et utilisés dans la semaine suivant leur préparation.

→ *Préparation du sérum spécifique anti-Globules Rouges de Moutons (GRM)*

Les GRM 50% sont lavés et leur concentration est ajustée à 10% dans de l'eau physiologique stérile. Cinq poissons adultes reçoivent chacun 0,5 ml de suspension de GRM par voie intrapéritonéale. Trois inoculations sont réalisées à une semaine d'intervalle. Deux semaines après la dernière injection le sang de ces animaux est prélevé à l'aide d'une seringue stérile non héparinée. Le sang est laissé une heure à 20°C puis 16 h à 4°C. Les sérums (surnageants) sont alors récupérés, regroupés, filtrés par passage sur un filtre stérile de porosité 0,2 µm puis répartis en flacons stériles (0,5 ml par flacon) et placés à -80°C.

→ *Préparation d'une solution de GRM à 2% :*

Trois lavages de GRM 50% sont effectués dans de l'EGTA-GVB selon la même méthode que pour la voie alterne. Une solution de GRM à 2% est ensuite préparée dans le tampon EGTA-GVB.

→ *Sensibilisation des GRM*

Cette étape permet la fixation des anticorps anti-GRM sur les globules rouges de mouton.

La suspension de GRM 2% est mélangée à volume égal avec le sérum hémolytique spécifique anti-GRM préalablement décomplémenté selon la méthode suivante :

→ un flacon de sérum est placé au bain-marie à 45°C pendant 30 min afin d'inactiver l'activité du complément de façon à empêcher la lyse des GRM pendant l'étape de sensibilisation. Le sérum est ensuite dilué au 1/200^{ème} dans l'EDTA-GVB.

Le mélange sérum décomplémenté - GRM est ensuite incubé 30 min à 30°C. Une agitation régulière est nécessaire pour optimiser le contact entre les anticorps et la surface des hématies de moutons. La solution est ensuite centrifugée 5 min à 3000 tours min⁻¹ à 4°C. Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé deux fois avec du GGVB²⁺ afin d'éliminer les anticorps en excès dans le mélange.

Une solution à 2% est préparée dans du GGVB²⁺ à partir du culot obtenu au dernier lavage : c'est la solution de globules rouges de moutons sensibilisés (GRMs).

→ *Méthode de dosage*

- Dilution des plasmas

Les échantillons sont conservés dans la glace pillée tout au long des manipulations, le complément étant très thermolabile.

Afin d'éviter l'activité hémolytique naturelle du plasma il est dilué au 1/4 dans du GVB²⁺.

- Préparation des plaques

Des dilutions progressives de plasma dans un volume total de 100 µl sont effectuées dans les puits d'une microplaque à fond rond comme suit :

Tableau 1 : Dilutions progressives du plasma avec le tampon GVB²⁺. Huit lignes comme celles ci sont réalisées sur une même plaque.

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Plasma dilué au 1/4 (µl)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	0	0
Tampon GVB ²⁺ (µl)	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0	0	100

Le 12^{ème} puits est le témoin 0% d'hémolyse. Le 11^{ème} puits est le témoin 100% d'hémolyse qui sert de référence pour les calculs de l'ACH50. Ce puits contient 100 µl d'un mélange d'eau distillée et 0,1 ml de sérum de truite arc-en-ciel anti globule rouge de mouton (SH, fabrication artisanale de l'Agence Française de Sécurité des Aliments (AFSSA)).

Ensuite 50µl de GRMs sont ajoutés dans chaque puits. La plaque ainsi préparée est incubée une heure à 20°C puis centrifugée 5 min à 800 t min⁻¹.

- Lecture de la densité optique

75 µl du surnageant de chaque puits est transféré sur une microplaque à fond plat contenant 75 µl de GVB²⁺ dans chaque puits.

La densité optique (DO) est mesurée à 540 nm grâce à un spectrophotomètre (iEMS, Labsystems) piloté par le logiciel GENESIS.

- Détermination de l'activité hémolytique 50% du complément (CH50)

La lecture de la DO permet de déterminer pour chaque échantillon et dans chaque puits le pourcentage d'hémolyse h tel que :

$$h = \frac{\text{valeur de l'absorbance à 540 nm dans un puits}}{\text{moyenne des absorbances à 540 nm du 100\% d'hémolyse (colonne 11)}}$$

Une régression linéaire sur les quatre valeurs encadrant le 50% d'hémolyse (soit h=0.5) est effectuée. L'équation de cette régression est de la forme y=ax+b où x = log(h/(1-h)) et où y est le log du volume de plasma dans chaque puits.

Lorsque h=0.5, y=b donc b correspond au log du volume nécessaire pour lyser 50% des GRMs.

Le nombre d'unités CH50 est calculé par la formule de Sakaï (1981) en prenant en compte un terme correctif (0,15 ml / 7,5 ml) car le volume total de la réaction a été modifié pour s'adapter aux microplaques. Soit :

$$\text{Unités ACH50} = \frac{1 \text{ (ml)} \cdot 0,15 \text{ (ml)}}{\text{Volume de plasma nécessaire pour lyser 50\% (ml)} \cdot 7,5 \text{ (ml)}}$$

b. Dosage de l'activité hémolytique spécifique du complément (ACH) : Voie alterne

Cette méthode est réalisée en évaluant la capacité du sérum de chaque individu à lyser les globules rouges de lapins (GRL). Ici l'unité ACH50 est le volume de plasma (en ml) nécessaire pour lyser 50% des GRL pendant une heure à 20°C (Köllner et al., 2002 ; Zarkadis et al., 2001). L'ACH est en effet activée en présence de GRL et de Mg²⁺ (Iwana et al., 1996 ; Nonaka et al., 1981 ; Ellis, 1981).

→ *Préparation des tampons et solutions (Yano, 1992)*

La solution mère de tampon Véronal (5 VB), une solution mère d'EGTA-Mg (0,1 M) et une solution tampon EDTA-Mg-gélatine-véronal (EGTA-Mg-GVB) sont préalablement préparées (annexes 4).

Les globules rouges de lapins (1 ml) sont lavés trois fois dans l'EGTA-Mg-GVB (24 ml) par centrifugation à 1500 tours min⁻¹ pendant 10min à 4°C. A chaque centrifugation le

surnageant est éliminé et le culot est repris dans 24 ml d'EGTA-Mg-GVB. Une solution à 2% de GRL est ensuite préparée dans ce tampon.

→ *Méthode de dosage :*

La méthode de dosage de l'activité du complément de la voie alterne est la même que pour la voie classique. Cependant, les échantillons de plasma sont préalablement dilués au 1/4 dans EDTA-Mg-GVB, puis sont dilués sur microplaque dans ce même tampon et 50 µl de la suspension de GRL à 2% sont ajoutés dans chaque puits. Lors du transfert sur microplaque à fond plat les 75 µl de GVB²⁺ sont remplacés par du PBS.

2.4 Analyse des données

L'ensemble des analyses n'a pu être effectué sur la totalité des individus ce qui explique les différents lots. Le traitement des données se fait de la même façon pour les différentes variables, cependant les effectifs des échantillons sont variables.

Cinq groupes sont définis selon le mois d'échantillonnage afin de faire le suivi mensuel :

- pêche du 4 mai ➤ **mai**
 - pêche du 1^{er} juin ➤ **juin**
 - pêche du 1^{er} juillet ➤ **juillet**
 - pêche du 30 juillet et 5 août ➤ **août**
 - pêche du 31 août ➤ **septembre**
- } Lot 1 (lipides)
- } Lot 2 (immunologie)

Le traitement se fait sur les trois premiers groupes sauf pour l'immunologie où les analyses sont faites pour juin, juillet, et août.

Afin d'examiner les liens avec l'infestation, des classes sont définies selon de la charge parasitaire des individus telles que :

- 0 parasite ➤ classe 0
- 1 à 20 parasites ➤ classe 1
- 21 à 40 parasites ➤ classe 2
- > 40 parasites ➤ classe 3

Les analyses multivariées

Les individus ayant des valeurs manquantes (tubes cassés...) ne sont pas pris en compte dans les analyses (soit 4 individus).

Afin d'explorer l'ensemble des variables de façon descriptive, de faire apparaître des variables discriminantes et des regroupements d'individus, deux ACP_s ont été réalisées. La première avec les individus et les variables du lot 1 (biométrie, parasitologie, indices lipidiques), la seconde avec les variables et les individus du lot 2 (biométrie, parasitologie, immunologie).

Les tests non paramétriques

Les variables sont comparées mois à mois. Les distributions de données ne suivant pas une loi normale, les échantillons sont comparés grâce à un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les hypothèses posées sont les suivantes :

H_0 = il n'y a pas de différence entre les échantillons

H_a = au moins un des échantillons diffère des autres

Le risque α est fixé à 5% et H_0 est rejetée si $p < 0,05$.

Ce test est utilisé pour diverses variables :

facteur mois

- comparaison des variables biométriques (Ls, Lt, Pf, Ps, indices de condition).
- comparaison des indices lipidiques (indices LT/Ps, TG/LT, STL/LT, PL/LT, TG/STL, TG/PL).
- comparaison des leucocytes (% lymphocytes, % granulocytes, % monocytes).

facteur « classe parasitaire »

Certaines variables (K, LT/Ps, TG/ST, % lymphocytes, % monocytes, % granulocytes) sont confrontées avec la classe parasitaire afin de voir si elles évoluent en fonction de la charge en parasites. Pour ce, les variables présentant des variations au cours des mois sont analysées mensuellement, pour les autres les données sont regroupées pour les trois mois.

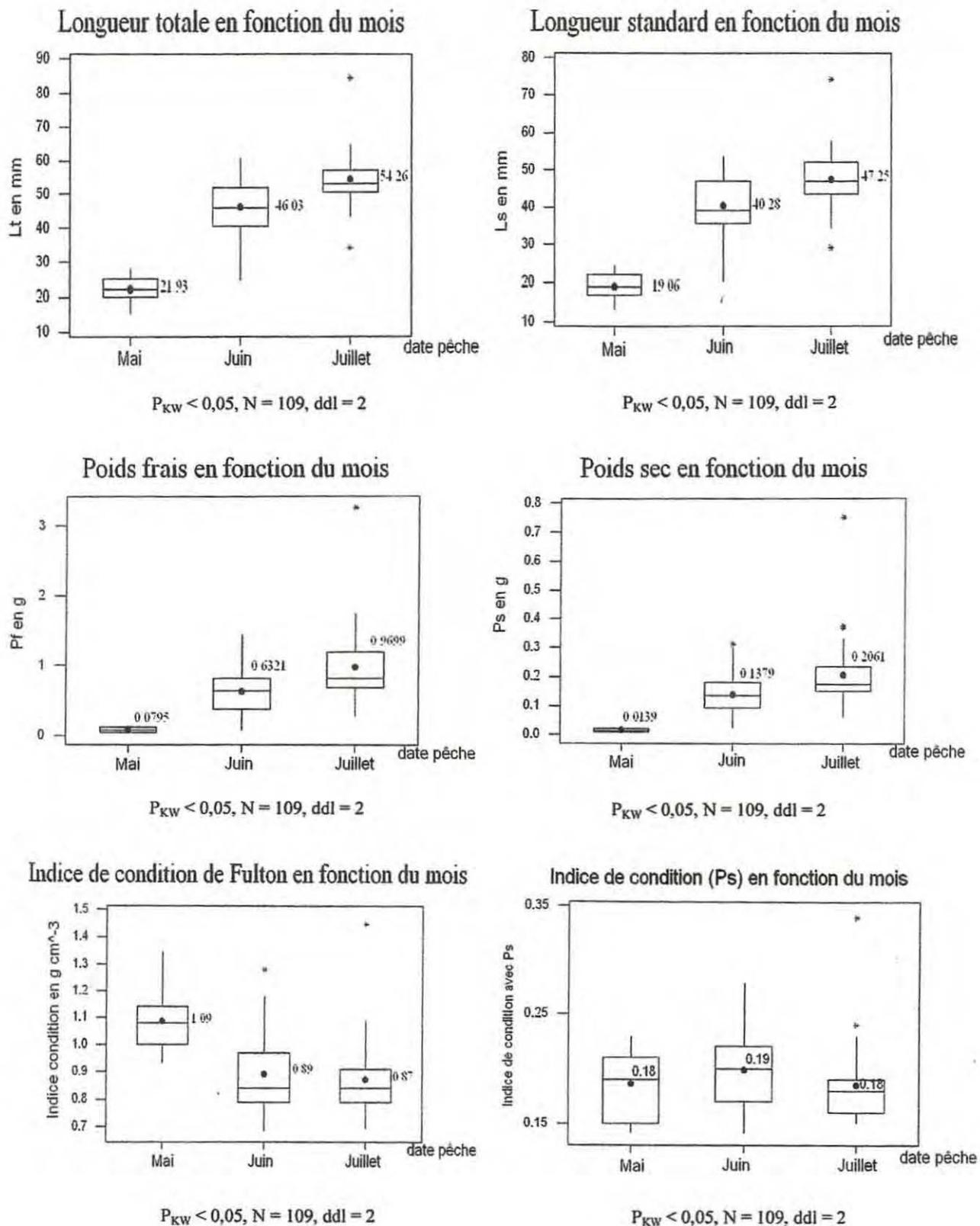


Figure 12 : Représentation graphique des variables biométriques sous forme de boxplots. Les points noirs ainsi que le chiffres correspondent aux moyennes mensuelles pour la variable concernée.

$n = 15, 55, 39$ respectivement pour mai, juin, juillet.

Les p-valeurs des tests de Kruskal-Wallis sont indiquées sous chaque graphique.

RESULTATS

Le suivi des données biométriques (109 individus), de l'infestation parasitaire (109 individus) et des indices lipidiques (67 individus) s'étend sur 57 jours. Le suivi des défenses immunitaires non spécifiques s'étend sur 60 jours.

1. Suivi saisonnier :

1.1 Mesures biométriques :

Les variables biométriques de taille et de masse ainsi que les indices de condition associés varient de façon significative ($P_{KW} < 0,05$, $N = 109$, $ddl = 2$) au cours des trois mois d'échantillonnage (figure 12).

La longueur totale des juvéniles (L_t) passe en moyenne de 21,93 mm en mai à 54,27 mm en juillet soit une croissance moyenne de $0,56 \text{ mm j}^{-1}$ sur la période considérée. La longueur standard augmente quant à elle en moyenne de $0,47 \text{ mm j}^{-1}$.

Sur cette même période le poids frais (Pf) augmente en moyenne de 79 mg à 969 mg soit un accroissement moyen journalier de la masse corporelle humide de 15 mg j^{-1} et de la masse sèche (Ps) de $3,37 \text{ mg j}^{-1}$.

L'indice de condition de Fulton diminue de $1,08 \text{ g cm}^{-3}$ en mai à $0,87 \text{ g cm}^{-3}$ en juillet. Bien que des différences significatives apparaissent, le second indice de condition, calculé à partir du poids sec des individus, reste assez stable autour de $0,18 \text{ g cm}^{-3}$ en moyenne.

Bien que la différence soit plus visible entre mai et juin, elle reste significative entre juin et juillet pour la longueur totale et standard, le poids frais et le poids sec ($P_{MW} < 0,05$). Seul l'indice de condition de Fulton tend à se stabiliser entre juin et juillet ($P_{MW} = 0,6758$).

1.2 Infestation parasitaire :

Lors des dissections, les métacercaires de deux espèces parasites (E. Plathelminthes, C. Trématodes, O. Digènes) ont été observées : *Prosorhynchus crucibulum* (famille des Bucephalidés) et *Timoniella praeteritum* (Looss, 1901) (famille des Acanthostomatidés). Sur 109 poissons étudiés, un total de 1321 kystes sont extraits, soit 141 kystes de *Prosorhynchus crucibulum* (figure 13) et 1180 de *Timoniella praeteritum*.

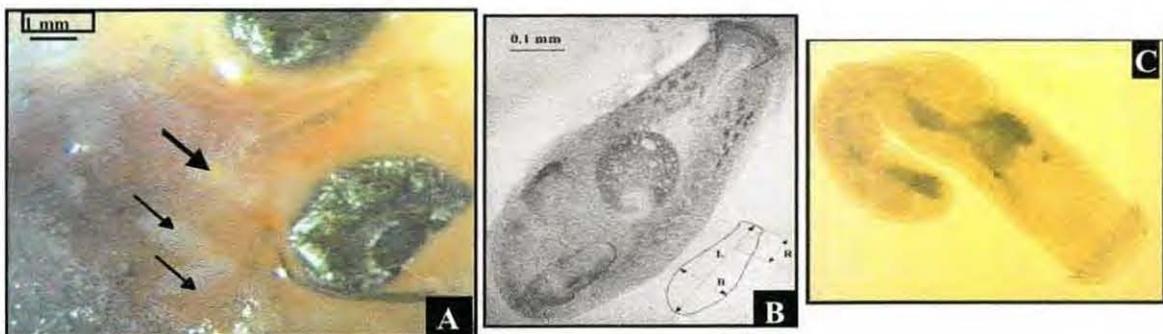
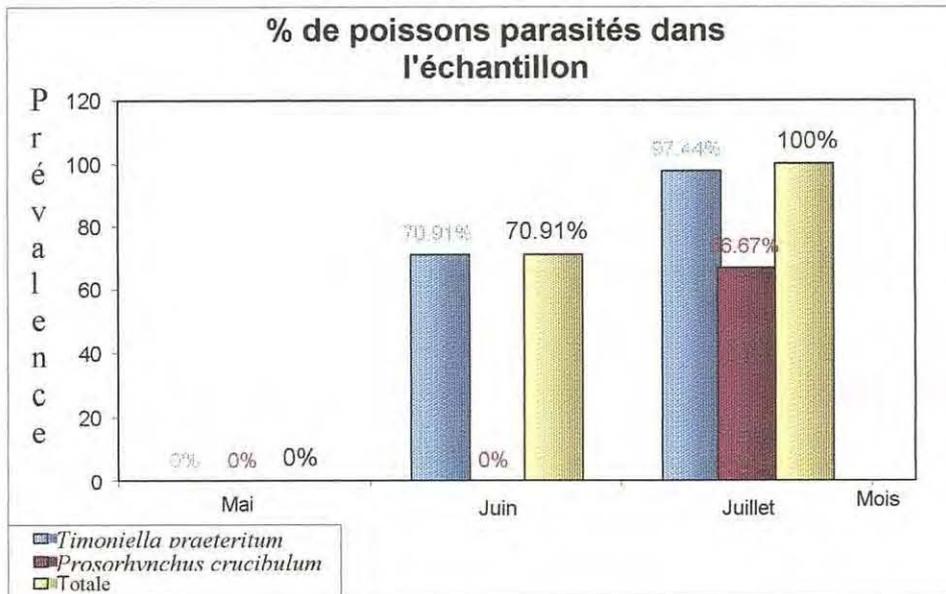
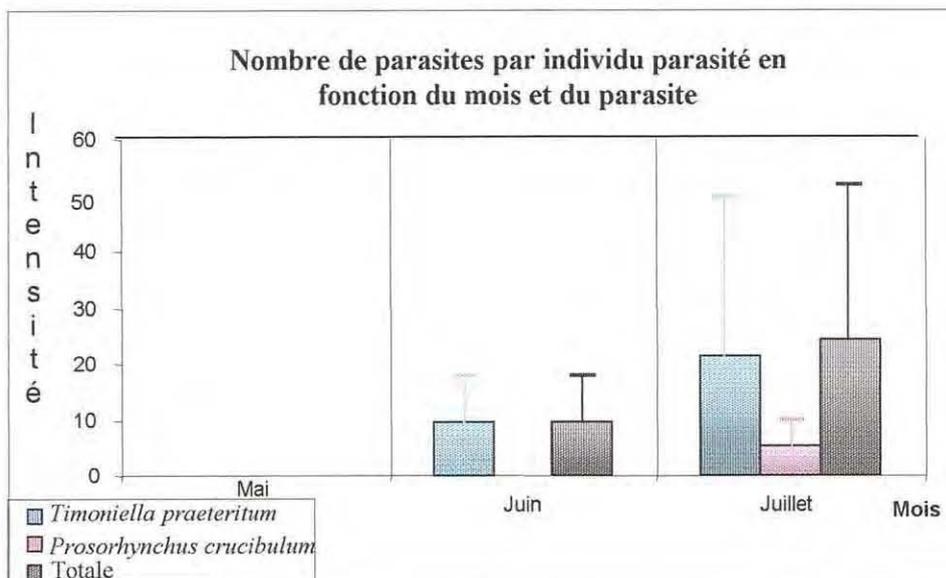


Figure 13 : Exemples de *Prosorhynchus crucibulum* à l'intérieur des tissus de soles d'après Laffargue et al., 2004. A. Kystes (x16) B. Métacercaire dékystée (x40) C. Métacercaire dékystée de *Timoniella praeterita*.

A



B



C

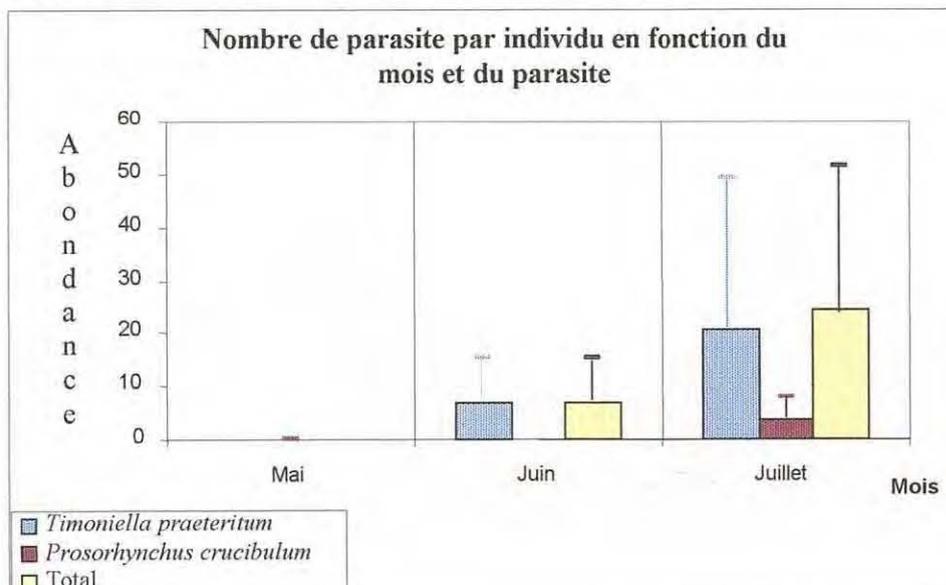


Figure 14 : Représentation graphique des caractéristiques de l'infestation.
 A. Prévalence ou pourcentage de poissons parasités dans l'échantillon.
 B. Intensité ou nombre moyen de parasites par individu parasité.
 C. Abondance ou nombre moyen de parasites par individu.

Alors qu'en mai, à leur arrivée sur la zone de nourricerie, aucun animal n'est parasité, l'infestation se fait de façon progressive jusqu'en juillet où tous les individus sont alors infestés.

Prévalences de l'infestation (P%):

La figure 14 met en évidence une infestation croissante qui débute par *Timoniella praeteritum* courant mai pour atteindre des pourcentages de juvéniles parasités dans l'échantillon de 70,91 % en juin et 97,44 % en juillet. La seconde espèce, *Prosorhynchus crucibulum*, apparaît en juillet avec une prévalence de 66,67 %. La prévalence de l'infestation globale est alors de 100 % : tous les individus présentent au moins un parasite.

Intensité de l'infestation (I):

→ Pour *Timoniella praeteritum*

Le nombre de parasites par individu parasité passe en moyenne de 0 en mai à $9,62 \pm 8,14$ en juin et $21,18 \pm 28,71$ en juillet. Les écarts types très élevés s'expliquent du fait que, pour juillet par exemple, la sole la moins parasitée a 2 kystes et la plus parasitée en a 151.

→ Pour *Prosorhynchus crucibulum*

L'infestation apparaît en juillet avec une intensité de $5,38 \pm 4,36$ parasites par individu parasité.

→ Pour les deux espèces réunies

L'intensité globale du parasitisme croît progressivement de mai (où il est nul) à juin ($9,62 \pm 8,14$) puis juillet ($24,23 \pm 27,23$).

Abondance de l'infestation (A):

Le nombre de kystes de *Timoniella praeteritum* par individu est multiplié par 3,4 de juin à juillet. En juillet, cette abondance est de $3,59 \pm 4,38$ pour *Prosorhynchus crucibulum* contre $20,64 \pm 28,53$ pour *Timoniella praeteritum*. De façon plus globale, il y a 4,3 fois plus de parasites par individu en juillet qu'en juin, toutes espèces confondues.

Occurrence de l'infestation par cible (O%) :

Le calcul de l'occurrence de l'infestation montre une implantation variable des kystes selon la cible. Il se dégage trois cibles d'infestation majeures : les muscles latéraux, la tête et les muscles ptérygiens (tableau 2).

Tableau 2 : Occurrence de l'infestation (nombre de poissons parasités au moins une fois dans la cible / nombre de poissons parasités) pour l'ensemble des mois.

	O (tête) en%	O (nageoires) en%	O (muscles ptérygiens) en %	O (muscles latéraux) en %	O (autre) en %
<i>Timoniella praeteritum</i>	71,42	16,88	76,62	90,90	7,79
<i>Prosorhynchus crucibulum</i>	57,69	11,54	34,61	80,76	0
Globale	78,20	19,23	79,48	91,02	7,69

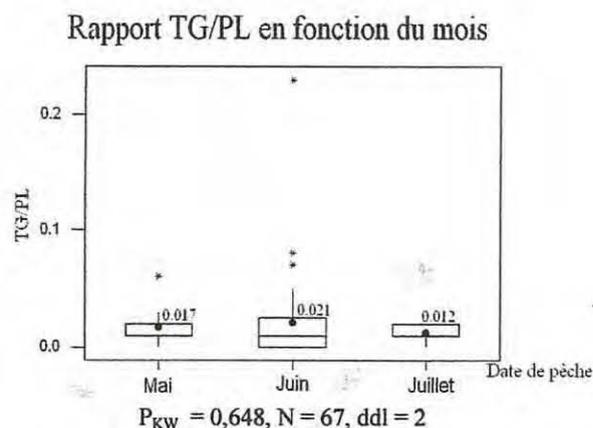
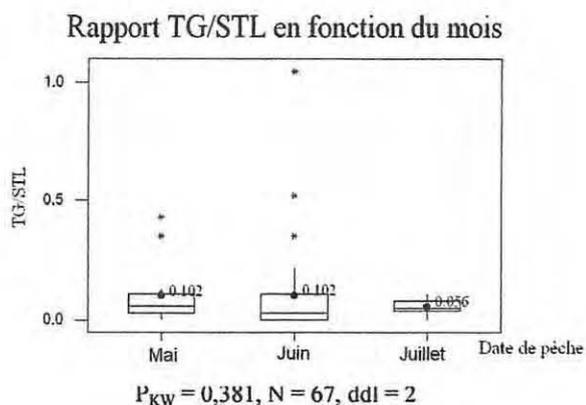
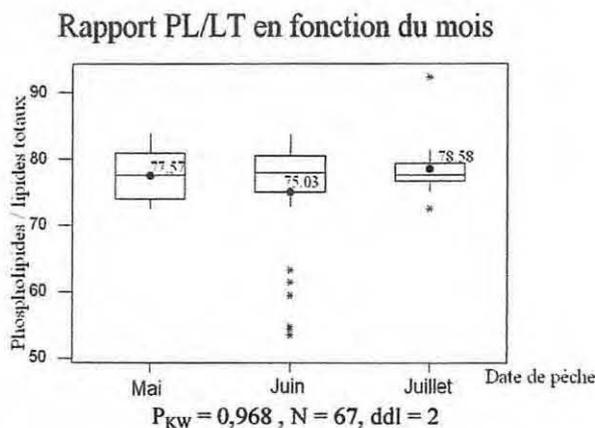
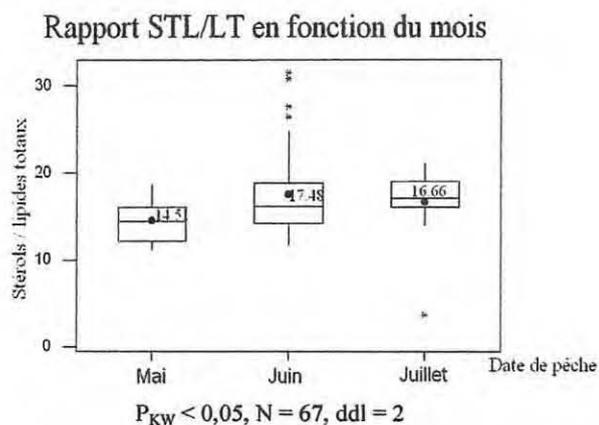
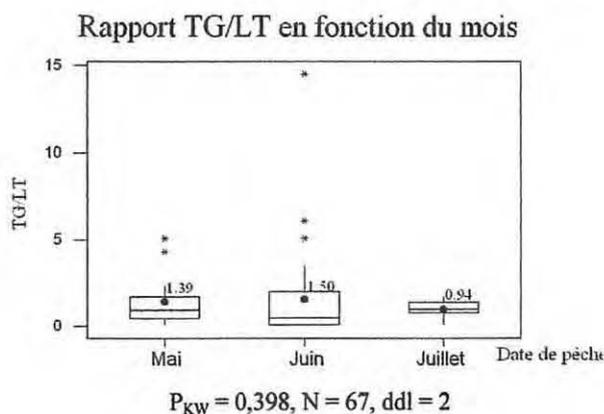
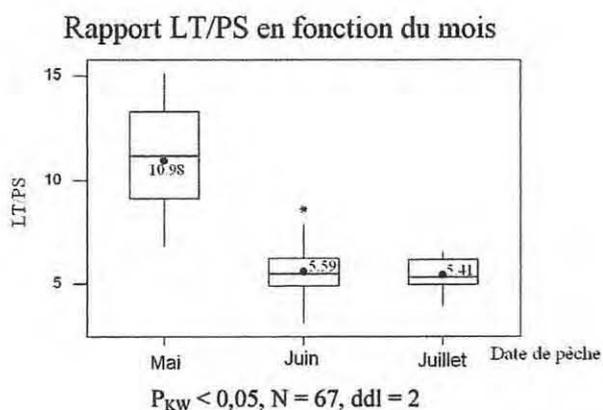


Figure 15 : Représentation graphique des indices lipidiques sous forme de boxplots. Les points noirs ainsi que les chiffres correspondent aux moyennes mensuelles pour le rapport concerné.

$n = 15, 33, 19$ respectivement pour mai, juin, juillet.

Les p -valeurs des tests de Kruskal-Wallis sont indiqués sous chaque graphique.

1.3 Identification du sexe :

Moins de la moitié des individus ont pu être sexés. En effet, les gonades se sont avérées très petites et encore peu reconnaissables. Cette donnée n'est donc pas exploitable.

1.4 Les indices lipidiques :

Les lipides totaux et les classes de lipides ont été dosés sur 70 poissons au total. Trois individus (D19, D34, D54) ont été retirés des analyses à cause de certaines valeurs manquantes.

La précision de dosage des acides gras libres (AGL) étant médiocre, ils ne sont pas retenus pour le calcul des différents indices lipidiques. Au cours de ces trois mois, la quantité de lipides totaux par rapport au poids sec (LT/Ps) diminue de moitié (figure 15), alors que la proportion de stérols par rapport aux lipides totaux augmente de 14%. L'ensemble des rapports des classes de lipides sur poids sec (TG/Ps, STL/Ps, PL/Ps) diminue de manière identique à celle des lipides totaux par rapport au poids sec. Pour ces indices, les tests de Kruskal-Wallis sont tous significatifs ($P_{KW} < 0,05$, $N = 67$, $ddl = 2$) mettant en évidence une différence significative sur cette période, la variation la plus brutale se situant entre mai et juin.

Cependant, il n'y a pas de différence significative (figure 15) ni des triglycérides, ni des phospholipides par rapport aux lipides totaux (TG/LT et PL/LT). Aussi, la proportion de triglycérides par rapport aux phospholipides et aux stérols reste très faible (TG/PL $< 0,025$ et TG/STL $< 0,11$). A titre indicatif, ces valeurs, pour des animaux G0 du pertuis Breton pêchés en octobre, sont deux fois plus élevées pour TG/PL et trois fois plus élevées pour TG/STL.

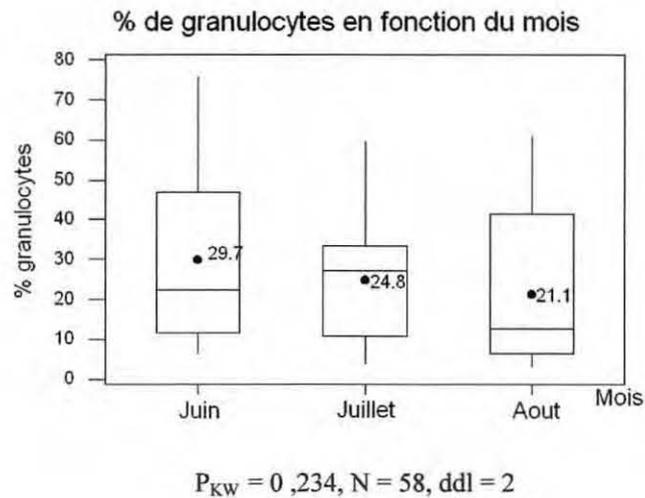
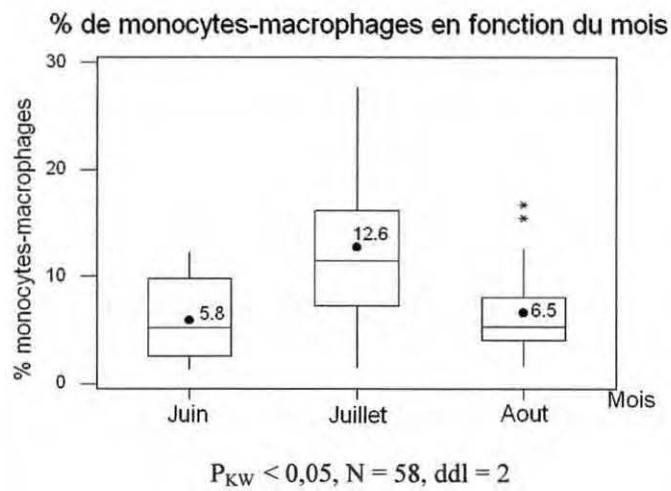
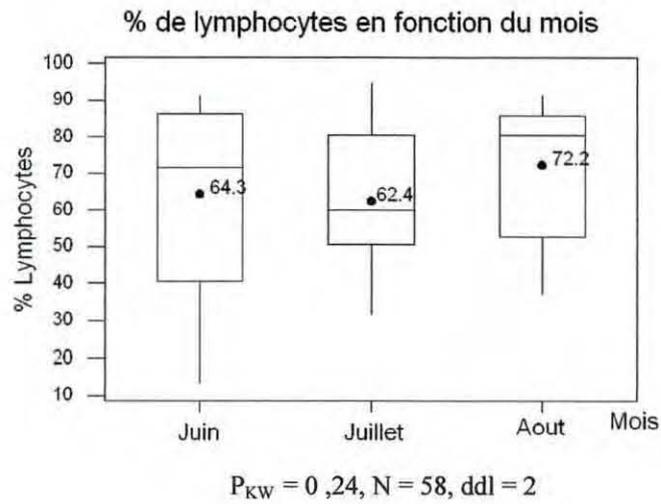
Les rapports des lipides par rapport au poids sec présentent donc des différences significatives en fonction du mois, entre mai et juin principalement, alors que les indices de condition nutritionnelle ne semblent pas être dépendants du mois sur cette période d'observation.

1.5 Les défenses immunitaires non spécifiques :

1.5.1 Composition de la communauté leucocytaire (taille-complexité)

Les relevés de cytométrie en flux permettent d'estimer le pourcentage de chaque sous population de leucocytes. Il est ainsi mis en évidence que les proportions de lymphocytes (en moyenne $66,3\% \pm 5,2\%$) et de granulocytes (en moyenne $25,2\% \pm 4,31\%$) ne varient pas significativement entre juin et août (figure 16). Seule la proportion de monocytes-macrophages diffère significativement ($P_{KW} < 0,01$, $N = 58$, $ddl = 2$). Cependant, au mois de juillet, la moyenne plus élevée de $12,6\%$ est due à 3 individus présentant des valeurs supérieures à 21% .

A titre indicatif, il apparaît que l'estimation de la population de monocytes-macrophages par l'activité estérasique des cellules est difficile. En effet elle peut être très correcte (variation de l'ordre de $0,3\%$) ou très différente (variation de l'ordre de $18,5\%$).



*Figure 16 : Evolution des différents types de leucocytes (en %) en fonction du mois.
 n = 19, 19 et 20 pour juin, juillet et août.
 Les p-valeurs des tests de Kruskal-Wallis sont indiquées sous chaque graphique.*

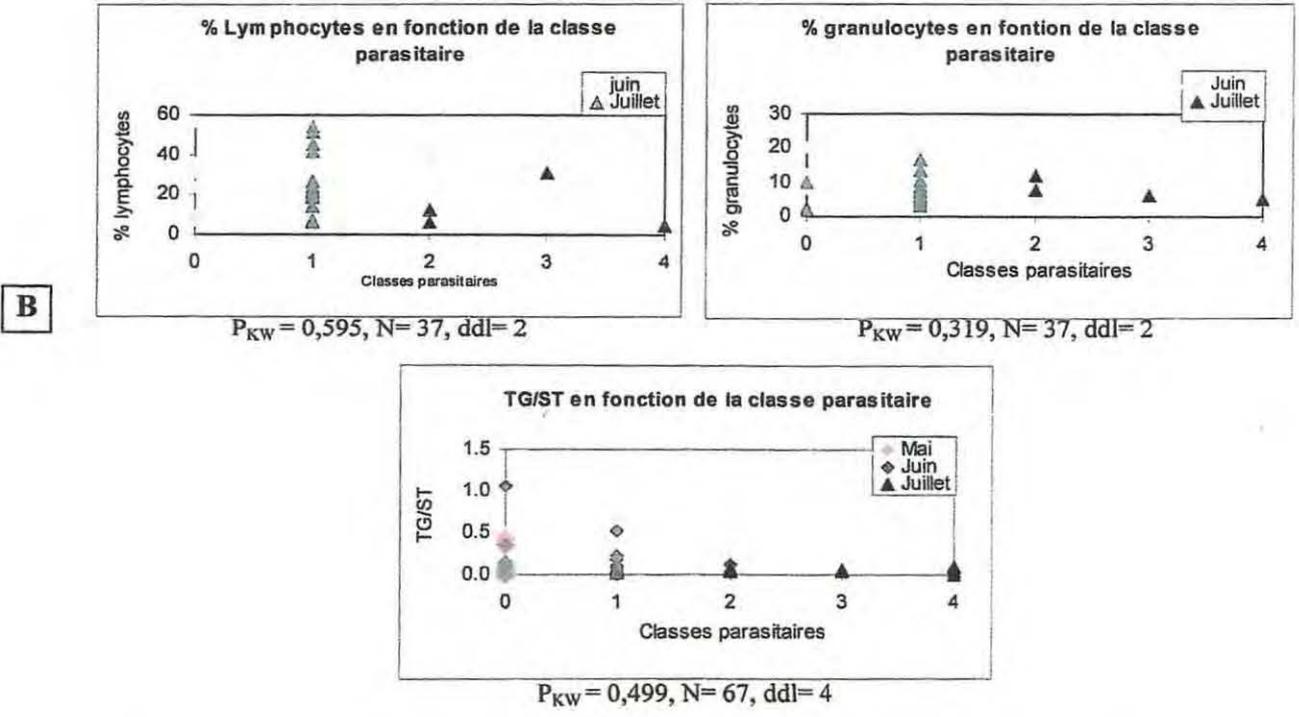
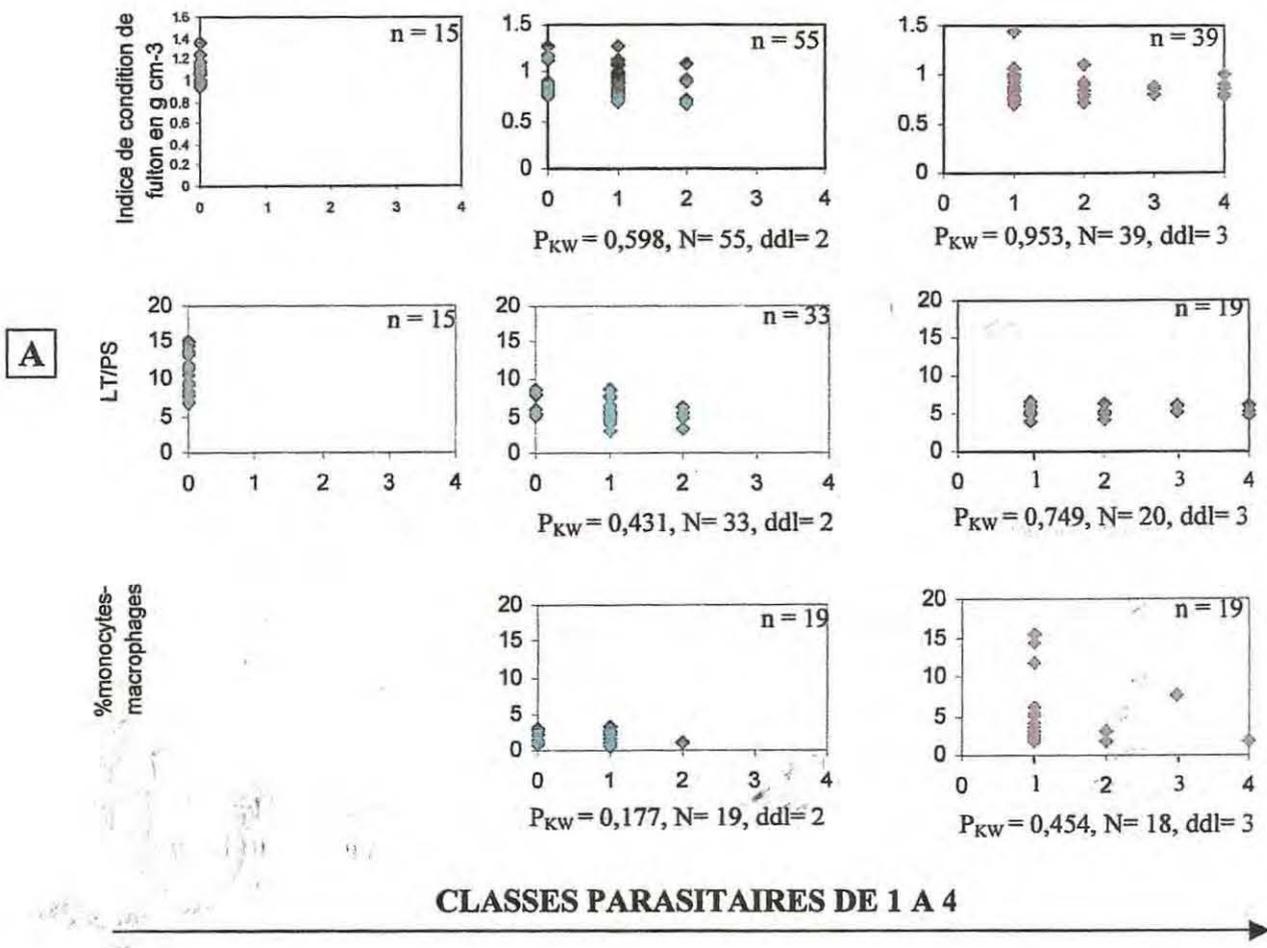


Figure 17 : Visualisation de certaines variables en fonction de la classe parasitaire.

A. Représentation mensuelle pour les variables ayant des différences significatives en fonction du mois.

B. Représentation groupée des individus pour les variables pour lesquelles le mois n'est pas discriminant.

1.5.2 Dosage de l'activité hémolytique du complément (voie classique et alterne)

Les dosages ont été effectués et les résultats sont actuellement en cours de traitement. Cependant, le volume de sang prélevé étant très faible (soles très petites) dosages ne se sont pas réalisés dans des conditions optimales et nous ne savons pas encore si ces données seront exploitables à partir d'animaux aussi jeunes.

2. Effet du parasitisme sur les variables indicatrices de condition :

Cette partie vise à mettre en évidence un éventuel effet du parasitisme global (c'est à dire les deux espèces confondues) sur les variables étudiées précédemment.

L'exploration des données par les deux ACP n'apporte pas d'information. Elles ne sont donc pas présentées car les individus parasités ne semblent pas discriminés par une ou plusieurs variables.

Les variations des variables sont examinées en fonction de la classe parasitaire. Les variables ayant une variation significative en fonction du mois sont représentées mensuellement (indice de condition, LT/Ps, % monocytes-macrophages), les autres, pour lesquelles le mois n'est pas discriminant sont groupées pour les trois mois (TG/ST, % lymphocytes, %granulocytes). Les graphiques montrent clairement qu'aucune relation n'apparaît entre le parasitisme et ce qui est confirmé par les tests de Kruskal-Wallis (figure 17).

DISCUSSION

La principale difficulté des dosages de cette étude vient de la petite taille des animaux. Néanmoins, ce travail permet de compléter l'étude effectuée par Laffargue (2000) d'août à décembre 1999. En effet, elle permet d'établir l'état initial des soles à leur arrivée et d'évaluer les premières évolutions saisonnières de la condition des juvéniles au sens large.

Aspects méthodologiques :

Les dosages effectués ayant beaucoup de contraintes différentes il n'a pas été possible d'effectuer l'ensemble des dosages (biométrie, lipides, immunologie et parasitologie) sur les même individus. En effet, les dosages lipidiques nécessitent de congeler immédiatement les animaux alors qu'il faut leur faire une prise de sang vivants pour la cytométrie en flux. De plus le CREMA étant situé à une heure au sud de la zone de pêche et à une heure au nord de l'IFREMER de La Tremblade il n'est pas envisageable de faire la pêche et les dosages dans une même journée. Il n'est donc pas possible d'étudier à la fois les réserves lipidiques et l'état des défenses immunitaires sur un même individu et donc pas possible de les mettre ensemble en relation avec le parasitisme. Cette étude nécessite d'adapter les dosages lipidiques à notre matériel biologique. De ce fait les animaux sont lyophilisés en entier pour obtenir assez d'extrait et de pouvoir doser les lipides de l'ensemble des animaux. Cela a pour conséquence que les fractions minérales (squelette) sont conservées et induisent un facteur de dilution.

La cytométrie en flux a permis de bien identifier trois sous populations de leucocytes. Cependant, les analyses ont été faites en se rapportant à un même volume et non à une même concentration de départ en leucocytes. L'homogénéisation n'a donc pas été faite à cause du peu de cellules comptables. Les analyses ont été faites en limite de technique et n'apportent qu'une première approche qualitative.

La mise au point méthodologique préalable du dosage hémolytique du complément avait été effectuée sur des soles adultes. L'application de cette méthode à des G0 aussi petits est délicate car elle ne permet pas d'effectuer toutes les dilutions nécessaires, le volume de sérum prélevé étant trop faible.

Condition des juvéniles : variations saisonnières.

Dès leur arrivée sur la nourricerie, les juvéniles ont une croissance très rapide le premier mois : les prises de poids et de longueur observées sont alors maximales. Le taux de croissance moyen ($0,56 \text{ mm j}^{-1}$) correspond aux valeurs préliminaires obtenues pour des campagnes estivales de 1999 et 2000 (Laffargue, 2000). Cette valeur est aussi légèrement inférieure aux taux de croissance obtenus en aquaculture ($0,60 \text{ mm j}^{-1}$) pour des soles de 5 à 10 cm (Howell, 1997). Cette croissance ralentit tôt, dès le mois de juin. Pour valider les tendances obtenues il faudrait un ou deux mois supplémentaires, actuellement en cours de collecte. Néanmoins une étude a montré un arrêt automnal de la croissance des juvéniles de sole (Amara, 2003) autour de 12 cm. Ceci a été confirmé dans les pertuis Charentais, la taille moyenne se stabilisant autour de 13 cm dès septembre (Laffargue, 2000). Le premier mois passé sur la zone de nourricerie semble donc déterminant pour les individus. En effet, un individu qui aura peu grandi pendant cette période commencera l'automne avec une moindre taille, une moindre masse. Il aura donc moins de chance de survivre à son premier hiver alors que les conditions environnementales se détériorent.

La condition des animaux à leur arrivée est bonne ($K > 1 \text{ g cm}^{-3}$). L'indice de condition (K) diminue assez rapidement pour se stabiliser autour 0,86, valeur inférieure à celle décrite par Laffargue et al (2000) à l'entrée en hiver ($K \approx 1.1 \text{ g cm}^{-3}$).

Cette étude a aussi permis d'étudier la dynamique d'infestation progressive des juvéniles pour la première fois dans le pertuis Breton. Deux espèces de parasites Digènes, *Proisorhynchus crucibulum* et *Timoniella praeteritum* sont ainsi suivis.

La première observation de *Proisorhynchus crucibulum* chez la sole a été effectuée par Papoutsoglou et al., (1977). Dans le pertuis Breton, il semble que la contamination des soles par *P. crucibulum* soit bien liée à la présence de la mytiliculture sur cette zone. L'infestation est donc locale et les premières métacercaires de *P. crucibulum* apparaissent dans les soles au moment de la deuxième maturation sexuelle des moules (*Mytilus edulis*) en juillet. Le sporocyste du parasite se développant aux dépens de la gonade sexuelle de la moule, les cercaires sont émises à cette période. Il semble donc que l'infestation soit assez rapide après la libération des cercaires dans le milieu. Ces dernières pénètrent alors les défenses externes (mucus, tissus épidermiques). La prévalence de juillet (66%) est identique à celle constatée par Baudouin (2002) dans le pertuis Breton et par Laffargue et al (2004) plus tard dans la saison (août à décembre). L'intensité moyenne de l'infestation de 5,38 parasites par individu parasité est aussi quasiment égale à celle observée par Baudouin (2002) qui était de 5,08 en août.

Timoniella praeteritum, déjà connu pour infester des poissons plats comme le flet, *Platichthys flesus*, (El-Darsh et al, 1999) n'avait pas encore été décrite comme une espèce parasite des juvéniles de sole. La contamination par cette espèce se fait via un mollusque (*Hydrobia ulvae* (Pennant, 1777)) présent naturellement en grande quantité sur les vasières des pertuis Charentais. L'émission de cercaires par les hydrobies coïncide vraisemblablement avec l'arrivée des juvéniles sur la zone de nourricerie pour qu'ils s'infestent aussi rapidement. Les prévalences et les intensités moyennes de ce parasite sont très élevées chez les juvéniles de soles étudiées avec respectivement de juin à juillet 70 % à 97 % des individus parasités et 9,62 à 24,23 parasites par individu parasité. Cette infestation est particulièrement intense comparée à l'infestation recensée par El-Darsh et al. (1999) chez le flet avec une prévalence de 18,8 et une intensité de 6,95.

Quelle que soit l'espèce décrite ci dessus, la pénétration du parasite s'effectue à l'endroit où la cercaire a pris contact avec le poisson. Elle s'enkyste d'abord puis elle se développe en métacercaire. Au début de l'infestation, l'implantation des kystes (les deux espèces confondues) se fait essentiellement au niveau des muscles latéraux (91%), des muscles ptérygiens (79%) et de la tête (78%). Pour *Proisorhynchus spp*, les G0 plus âgés ont des occurrences différentes avec 81% des poissons parasités qui le sont dans la région de la tête et 45% dans la région musculaire (Baudouin, 2002). Une étude sur des animaux encore plus âgés avait annoncé des occurrences de 90% au niveau de la tête. Les parasites digènes sont des espèces manipulatrices pouvant altérer les fonctions du système nerveux central et modifier le comportement de leur hôte (afin de faciliter le passage à l'hôte définitif par prédation), ce qui n'est pas étudié dans les pertuis. Aussi, il est intéressant de noter la faible diversité spécifique du parasitisme observés chez les juvéniles.

L'indice lipidique triglycérides sur stérols (TG : ST) n'évolue pas, ni en fonction du mois ni en fonction de l'intensité du parasitisme. Sa valeur reste très faible tout au long de l'étude à cause de la très petite quantité de lipides de réserves (triglycérides) contenus dans les échantillons. De si faibles valeurs sont normalement observées lors d'un jeun prolongé. A titre indicatif, les larves de soles abordant la métamorphose ont un rapport moyen de TG : ST de 1,2 (Galois R., communication personnelle), puis en fin de métamorphose de 1,03 (Amara et al, 2004), les triglycérides étant le substrat énergétique privilégié des larves.

Aussi, cette valeur est d'environ 0,33 (Galois R., communication personnelle) pour des G0 d'octobre pêchés dans le pertuis Breton. Le premier stade juvénile semble donc être une phase métabolique particulière où il y a très peu de lipides de réserves comparé aux autres stades. Dans ce contexte où, dès leur arrivée sur la zone de nourricerie, les animaux dépendent beaucoup d'énergie pour leur croissance plusieurs scénarios sont possibles :

1) Les animaux ne se nourrissent pas suffisamment, par manque de nourriture ou pendant une période qui correspondrait à l'adaptation à leur nouveau mode de vie. Cette hypothèse est écartée car l'étude du contenu stomacal permet d'affirmer que les animaux se nourrissent bien.

2) Le métabolisme nécessaire aux besoins des individus pendant cette période est trop élevée et ne permet pas de stocker de l'énergie sous forme de triglycérides qui seraient alors immédiatement utilisés. Ce peut être une stratégie de l'espèce d'utiliser d'abord son énergie pour la croissance (afin d'atteindre la taille optimale à sa survie hivernale), puis à l'automne de stopper sa croissance afin de faire de constituer des réserves nécessaires durant l'hiver.

3) Une autre possibilité est qu'à ce stade de développement, une autre forme d'énergie est mise en réserve comme des glucides par exemple.

Pour le moment nos données s'arrêtent en juillet et il est difficile de prévoir la future évolution de cet indice sur seulement trois mois. Les dosages des mois d'août, septembre et octobre devraient permettre de mieux comprendre ce qui se passe. De plus il sera ainsi possible de comparer ces résultats avec ceux déjà obtenus sur des animaux du pertuis Breton échantillonnés en octobre 2003.

Une considérable diminution des lipides totaux sur le poids sec est observée entre mai et juin. Cette variation est identique pour l'ensemble des classes lipidiques par rapport au poids sec. On ne peut donc pas utiliser ces indices lipidiques rapportés au poids sec car il semble y avoir des composants non lipidiques qui varient dans le poids sec (glucides, protéines, composés minéraux) entre mai et juin.

Cependant il faut rester prudent quant à l'utilisation des indices lipidiques. En effet, ils ne sont pertinents que si les animaux sont à l'équilibre et qu'ils ne subissent pas de crise physiologique. Pour que des comparaisons soient possibles, il faut donc que les animaux soient au même stade de leur vie et qu'ils ne subissent pas de perturbation majeure, ce qui ne semble pas être le cas lors de leur installation sur la zone de nourricerie.

L'étude mensuelle des leucocytes montre des valeurs assez stables qui ne semblent pas dépendre du parasitisme. Des études complémentaires par individu sont nécessaires afin de voir si la parasitose n'entraîne pas de changement dans la composition des leucocytes. Par exemple un individu parasité pourrait voir sa proportion en monocytes circulant diminuer. Il serait aussi intéressant de regarder l'évolution des leucocytes en différenciant les espèces de parasites.

A ce stade de développement il n'est pas encore possible d'établir un lien entre l'indice de condition et l'intensité du parasitisme. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Laffargue et al. (2004). Les mêmes observations sont faites pour les indices lipidiques et la composition des leucocytes. Il est possible que les outils utilisés ne soient pas suffisamment adaptés à de si petits animaux. En effet, le peu de cellules disponible ne permet pas de travailler dans des conditions optimales en cytométrie en flux. Il en est de même pour les dosages de l'activité du complément (résultats en cours d'exploitation).

CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence une infestation locale, qui a lieu sur la zone de nourricerie. Cependant, à ce stade, le parasitisme ne semble pas avoir d'impact négatif sur la **condition générale** des soles (état nutritionnel, croissance, cellules immunitaires). Les résultats du dosage du complément doivent apporter des informations supplémentaires sur l'état des défenses non spécifiques.

Il est envisageable que le parasitisme n'ait pas d'impact sur les soles à ce stade de l'infestation. En effet, il est probable que des effets apparaissent à un stade plus développé de l'infestation ou bien à un autre niveau tel que le comportement (recherche de nourriture, comportement cryptique, rythmes journaliers d'activité..) qui n'ont pas été étudiés ici. En conséquence, d'autres indicateurs pourraient être pris en compte. Des outils tels que le rapport ARN/ADN ou le dosage de glucides permettraient d'obtenir une image plus complète de l'état nutritionnel des juvéniles de sole.

Afin de pouvoir compléter ces premiers résultats, l'étude se poursuit sur une année (croissance, dosages de lipides, étude des sous populations de leucocytes, activité hémolytique du complément). Des indications supplémentaires seront recherchées au niveau du comportement (vidéo analyse), des hormones de croissance, de la croissance (estimation plus précise par otholitométrie) et un effet du parasitisme sur la physiologie au niveau de l'expression différentielle de gènes sera aussi étudié dans le contexte d'une thèse en cours. En parallèle, des infestations expérimentales seront réalisées afin de mieux contrôler le facteur parasitisme et de permettre des comparaisons entre les individus parasités et ceux non parasités.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amara R., 2003. Seasonal ichthyodiversity and growth patterns of juvenile flatfish on a nursery ground in the Southern Bight of the North Sea (France). *Environmental Biology of fishes*, **67**, 191-201.
- Amara R. & Galois R., 2004. Nutritional condition of metamorphosing sole : spatial and temporal analyses. *Journal of fish biology*, **64**, 72-88.
- Baudouin G., 2002. Etude épidémiologique de l'infestation des juvéniles de la sole commune (*Solea solea*) par un trématode digène Bucephalidae (*Prosohorhynchus spp.*). Rapport de Maîtrise, CREMA l'Houmeau. 20p.
- Cousteau C., Combes C., Maillard C., Renaud F. & Delay B., 1990. *Prosohorhynchus squamatus* (Trematoda) parasitosis in the *Mytilus edulis-Mytilus galloprovincialis* complex : specificity and host-parasite relationships. *Pathologie in Marine Science, Academic Press, San Diego*. 291-298.
- Cushing D-E., 1945. A comparative study of complement. I. The specific activation of components. *D. Immunology*. **50**, 61-74.
- El-Darsh H.E.M., & Whitfield P.J., 1999. The parasite community infecting flounders, *Platichthys flesus*, in the tidal Thames. *Journal of Helminthology*, **73**, 203-214.
- Ellis A. E., 1981. Nonspecific defense mechanisms in fish and their role in deases process. *Dev. Biol. Stand.* **49**, 337-352.
- Ferber, D., 2001. Keeping the stygian waters at Bay. *Science*, **291**, 968-273.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- Howell, B.R., 1997. A re appraisal of the potential of sole (*Solea solea*) for commercial cultivation. *Aquaculture*, **155**, 359-369.
- Iwana G. & Nakanishi T., 1996. The fish immune system : organism, pathogen and environnement. *Academic press*. **79**, 106-116.
- Köllner B., Wasserrab B., Kotterba G. & Fischer U., 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)—how can environmental influences be detected? *Toxicology Letters*, **131**, 83-85
- Laffargue P., 2000. Variations de la croissance des juvéniles de la sole, *Solea solea* (L). dans les nourriceries du pertuis Breton (Charente-Maritime) : Approche méthodologique et application au groupe 0. Rapport de D.E.A, CREMA l'Houmeau, France. 31p.

- Laffargue P., Baudouin G., Sasal P., Arnaud C., Begout Anras M.L. & Lagardère F., 2004. Parasitic infection of *Solea solea* by *Proserhynchus* spp. Metacercariae (Digenea, Bucephalidae) in Atlantic nurseries under mussel cultivation influence. *Diseases of Aquatic Organisms*, **58**, 179-184.
- Le Pape O., Chauvet F., Mahévas S., Lazure P., Guérault D. & Désaunay Y., 2003, a. Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea* L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *Journal of Sea Research*, **50**, 139-149.
- Le Pape O., Holley J., Guérault D. & Désaunay Y., 2003, b. Quality of coastal and estuarine essential fish habitats : estimations based on the size of juvenile common sole (*Solea solea* L.). *Estuarine, coastal and Shelf Science*, **58**, 793-803.
- Matthews R.A., 1973. The life-cycle of *Proserhynchus crucibulum* (Rodolphi, 1819) Odhner, 1905 and a comparison of its cercaria with that of *Proserhynchus squamatus* Odhner, 1905. *Parasitology*. **66**, 133-164.
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A. & Marshall E.A., 1998. Larval size and recruitment mechanisms in fishes : toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **45**, 1657-1667.
- Nonaka M., Natsuume-Sakai S. & Tamakahashi M., 1981. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
- I. Identification of serum lytic system homologous to mammalian complement. *J. Immunol.* **126**, 1489-1494.
 - II. Purification and characterization of the fifth component (C5). *J. Immunol.* **126**, 1495-1498.
- Papoutsoglou SE. & Papaparaskeva-Papoutsoglou EG., 1977. Metazoan parasites of *Solea solea* (L.) from Porto -Lago, North Aegean Sea, Greece. *Mem.Biol. Mar. Oceanogr*, **7**, 21-33.
- Sakaï, D. K., 1981. Spontaneous and antibody-dependant hemolysis activities of fish sea and inapplicability of Mammalian complements to hemolysis reaction in fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, (2), 979-991.
- Van der Veer H.W., Berghahn R., Miller J.M. & Rijnsdorp A.D., 2000. Recruitment in flatfish, with special emphasis on North Atlantic species : progress made by the flatfish symposia. *ICES Journal of Marine Science*. **57**, 202-215.
- Yano Tomoki 1996. The nonspecific Immune system : Humoral Defense. The fish immune system. 106-119.
- Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. *Techniques in fish Immunology. S.O.S Publications, Fair Haven, N.J.* 131-141.
- Zarkadis K., Mastellos D. & Lambris J.D., 2001. Phylogenetic aspects of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**, 745-762.

ANNEXES

DATE de l'analyse : 7 Juillet 2004
 N° MANIP : N° ECHANTILLON : DL.07.17

22 parasites { *Timonella praeterea*
Prosohynchus cucubulum
 (NB AUTRES PARASITES :)

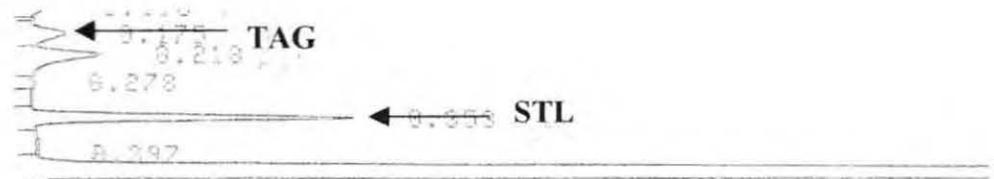
KYSTES PROSOHYNCHUS

Code & localisation	Surface KYSTES	Surface METACERCAIRES	Aspect ¹	Fixé ²	PHOTOS
1 <i>Timonella praeterea</i>					
2 "					
3 <i>Prosohynchus cucubulum</i>			~ opaque		
4 <i>Timonella p.</i>			transparent		
5 <i>Prosohynchus cucubulum</i>					
6 "					
7 <i>Timonella praeterea</i>					
8 "					
9 <i>Prosohynchus cucubulum</i>			transparent		
10 "					
11 "					
12 "					
13 "					
14 "					
15 "					
16 <i>Timonella praeterea</i>					
17 "					
18 "					
19 "					
20 "					
21 <i>Prosohynchus cucubulum</i>					
22 <i>Timonella praeterea</i>			transparent		

1 Préciser l'aspect translucide (on voit le métacercaire par transparence), +/- opaque ou totalement opaque du kyste.
 2 à l'alcool 70% (non dékysté ou métacercaire seul) ; autre ?

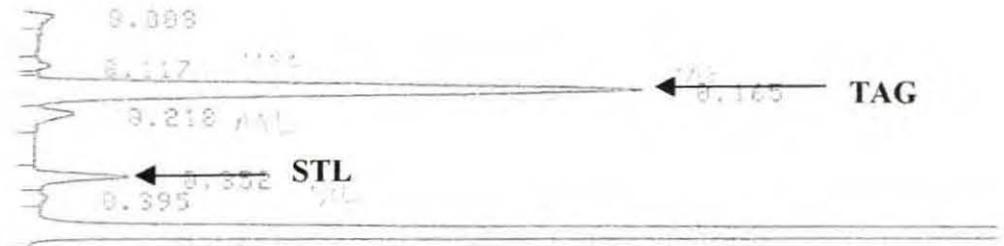
$L_T = 50 \text{ mm}$
 $L_S = 45 \text{ mm}$
 $M = 0,79 \text{ g}$
 $S = \text{♂?}$

Annexe 1 : Feuille de relevé de l'infestation parasitaire : localisation et identification des kystes.



A

TIME	AREA	NK	IDNO	CONC	NAME
0.091	274			0.1383	
0.118	337			0.1951	
0.175	722			0.4175	
0.218	1566	V		0.8789	
0.353	4519			2.6133	
0.397	397	V		0.2293	
0.467	165165	V		95.5157	
TOTAL	172919			100	



B

TIME	AREA	NK	IDNO	CONC	NAME
0.088	281			0.2043	
0.117	183			0.1387	
0.165	14714			10.6845	
0.218	714	V		0.5184	
0.352	1549			1.125	
0.395	337	V		0.2448	
0.467	119936	V		87.0902	
TOTAL	137714			100	

Annexe 2 : Exemple de lecture de classes de lipides :

A. Relevé obtenu pour les individus G0 de notre étude. Niveau de triglycérides (TAG) très bas.

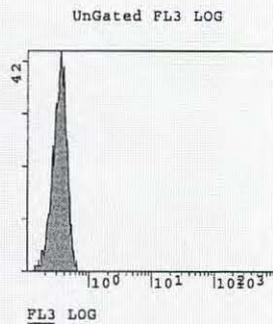
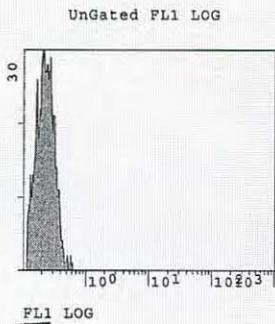
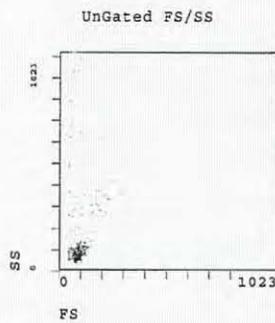
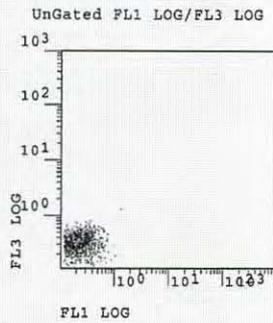
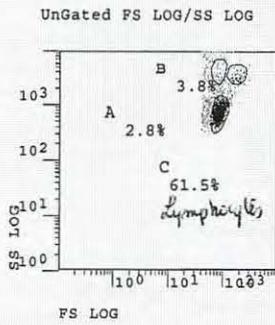
B. Relevé obtenu pour des individus G0 plus âgés. Niveau « normal » de triglycérides (TAG).

2010. 2004

C:\EXPO2XL4\LMD\SOLES064.LMD: EXPO

Protocol :soles
Acq Date :08-10-2004

Analysis Date : 08/10/04
Analysis Time : 17:46:13



HISTOGRAMMES DANS LES FLUORESCENCES
Fluor F₃

FL1 LOG
fluorescence verte

FL3 LOG
fluorescence rouge

*B = Using BaseLine Offset on Log Parameters = *B

REPORT ON: C:\EXPO2XL4\LMD\SOLES064.LMD

Mean Calculation Method: LOG-LOG

Statistic	Number	%Total	%Gated	X-Mean	X-CV	HP X-CV	Y-Me
UnGated-->A Monocytes	84	2.80	2.80	186.9	0.0	1.0	33'
UnGated-->B Granulocytes	113	3.77	3.77	83.8	0.0	0.4	40:
UnGated-->C Lymphocytes	1845	61.50	61.50	86.2	0.0	11.5	76:

↑ ↑
% de chaque sous population

Annexe 3 : Exemple de résultat obtenu en cytométrie en flux sous forme d'histogrammes et de cytogrammes.

Solution mère de tampon-véronal (5VB) : pour 1 litre de solution

- 41,5 g de chlorure de sodium
- 5,1 g de sodium barbiturate
- 17,5 mL d'1 solution molaire d'acide chlorhydrique
- 1 litre d'eau distillée
- Le pH de la solution est ajusté à 7,3-7,4.

Solution mère de calcium et magnésium

- 100 mL d'eau distillée
- 7,35 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 20,33 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Tampon gélatine-véronal (GVB²⁺) : pour 100 mL

- 0,1g de gélatine
- 20 mL de 5VB
- 0,1mL de CaMg
- 100 mL d'eau distillée

Tampon glucose-gélatine-véronal (GGVB²⁺) : pour 100mL

- 0,1 g de gélatine
- 10 mL de 5VB
- 2,5 g de glucose mono-hydraté
- 0,1 mL de CaMg
- 0,1 mL d'une solution d'azide de sodium (NaN_3)
- 100 mL d'eau distillée

Tampon EDTA-gélatine-véronal (EDTA-GVB) : pour 100mL

- 0,1 g de gélatine
- 20 ml de 5VB
- 10 mL d'une solution 0.1 molaire d'EDTA
- 100 mL d'eau distillée

Solution mère d'EGTA-Mg (0.1M)

- 38 g d'Éthylène gluco-bis (β -aminoéthylether) N,N,N',N'-tétraacetic acid (EGTA, Sigma)
- 20,3 g d'hexahydrate magnésium chlorique ($\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)
- 7 g de soude (NaOH)
- ajuster au litre
- ajuster le pH à 7,4 avec une solution de soude NaOH 1M.

Tampon EGTA-Mg-GVB

- 0,1 g de gélatine
- 20 mL de la solution 5VB
- 10 mL de EGTA-Mg
- ajuster à 100mL

Annexe 4 : Préparation de tampons et solutions utilisés pour le dosage de l'activité hémolytique du complément (voie alterne et classique) d'après Yano (1992).