UNIVERSITE RENNES I
U.F.R. S.V.E.
Campus de Beaulieu
Avenue Général Leclerc
F35042 RENNES Cedex

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
AGRONOMIQUE DE RENNES
Sciences Animales
65, rue de Saint-Brieuc
F35042 RENNES Cedex

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

pour l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

Biologie et Productions Animales
Option : Biologie Aquacole

EFFET DE LA QUALITE LIPIDIQUE DU REGIME NUTRITIF SUR LA COMPOSITION DES MEMBRANES DES HEMOCYTES DE *C. GIGAS*. IMPACT SUR LES CAPACITES DE DEFENSE.

De Melle DELAPORTE Maryse

Soutenu le 31 Août 2001
devant le jury composé de :

Nathalie LE FLOCH - INRA-	**Rapporteur**
Pierre-Guy MARNET - ENSAR-	**Examinateur**
Olivier KAH - UMR CNRS 6026-	**Examinateur**
Jean-François SAMAIN - IFREMER-	**Maître de stage**

Ifremer
Direction des Ressources Vivantes
Laboratoire de Physiologie des Invertébrés
Centre de Brest
BP 29280 PLOUZANE

Institut Universitaire Européen de la Mer
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
UMR 6539-Technopôle Iroise de Brest
29280 PLOUZANE

UNIVERSITE RENNES I
U.F.R. S.V.E.
Campus de Beaulieu
Avenue Général Leclerc
F35042 RENNES Cedex

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES
Sciences Animales
65, rue de Saint-Brieuc
F35042 RENNES Cedex

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

pour l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

Biologie et Productions Animales
Option : Biologie Aquacole

EFFET DE LA QUALITE LIPIDIQUE DU REGIME NUTRITIF SUR LA COMPOSITION DES MEMBRANES DES HEMOCYTES DE *C. GIGAS*. IMPACT SUR LES CAPACITES DE DEFENSE.

De Melle DELAPORTE Maryse

Soutenu le 31 Août 2001
devant le jury composé de :

Nathalie LE FLOCH - INRA-	**Rapporteur**
Pierre-Guy MARNET - ENSAR-	**Examinateur**
Olivier KAH - UMR CNRS 6026-	**Examinateur**
Jean-François SAMAIN - IFREMER-	**Maître de stage**

Ifremer
Direction des Ressources Vivantes
Laboratoire de Physiologie des Invertébrés
Centre de Brest
BP 29280 PLOUZANE

Institut Universitaire Européen de la Mer
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
UMR 6539-Technopôle Iroise de Brest
29280 PLOUZANE

Remerciements

Je remercie sincèrement :

Les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.

Jean-Claude Cochard de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés au centre Ifremer de Brest.

Jacques Clavier de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin à l'Institut Universitaire Européen de la Mer.

Jean-François Samain de m'avoir confié ce sujet d'étude.

Jeanne Moal d'avoir encadré mes recherches et de m'avoir apporté ses conseils, son soutien lors des prélèvements et son sens critique pendant toute la durée du stage.

Philippe Soudant pour avoir réalisé les analyses immunologiques et pour m'avoir fait profiter de ses compétences scientifiques dans le domaine des micro-dosages d'acides gras.

Sans oublier Claudie Quéré pour son aide très précieuse tout au long du stage, sa gentillesse et son attention à mon égard ; Philippe Miner pour avoir pris en charge la gestion des cultures d'Algues ; Gwenäelle Choquet et Christophe Lambert pour leur participation dans l'analyse des échantillons immunologiques.

Et enfin, l'ensemble des membres de l'équipe: Jean-René Le Coz, Jean-yves Daniel, Arnaud Huvet, Solène Dubois et les autres stagiaires pour leur sympathie à mon égard.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

GLOSSAIRE **2**

INTRODUCTION **3**

MATERIELS ET METHODES **5**

I. MATERIEL BIOLOGIQUE 5
II. CHRONOLOGIE DE L'EXPERIENCE 5
III. PRELEVEMENTS 5
III.1. Hémolymphe *5*
III.2. Branchies *6*
IV. ANALYSES LIPIDIQUES 6
IV.1. Extractions lipidiques *6*
IV.2. Analyses des acides gras *6*
V. ANALYSES IMMUNOLOGIQUES 7
V.1. Comptage, typage et viabilité *7*
V.2. Phagocytose *8*
V.3. Activité métabolique - « Oxidative Burst » *8*
V.4. Adhésion *9*
VI. INDICE DE CONDITION 9
VII. ANALYSES STATISTIQUES 9

RESULTATS **10**

I. DONNEES RELATIVES AU CONDITIONNEMENT 10
I.1. Température et algues *10*
I.2. Mortalité au cours de l'expérimentation *10*
I.3. Index de condition *10*
II. ANALYSES LIPIDIQUES 10
II.1. Composition des algues *10*
II.2. Composition lipidique des hémocytes et branchies *11*
II.3. Composition en acide gras des hémocytes *11*
II.4. Composition en acide gras des branchies pour les deux espèces *12*
III. ANALYSES IMMUNOLOGIQUES 13
III.1. Concentrations hémocytaires *13*
III.2. Caractérisation des populations d'hémocytes des huîtres et des palourdes *14*
III.3. Caractéristiques des granulocytes et hyalinocytes d'huître *14*
III.4. Viabilité des hémocytes *15*
III.5. Pouvoir de phagocytose des hémocytes *15*
III.6. Production d'espèces actives de l'oxygène *16*
III.7. Adhésion *16*

DISCUSSION **17**

PERSPECTIVES **23**

BIBLIOGRAPHIE **24**

ANNEXES **28**

GLOSSAIRE

FAO : **F**ood and **A**griculture **O**rganization

MOREST : **MOR**talités **EST**ivales

SATMAR : **S**ociété **AT**lantique de **MAR**iculture

MEAG : **M**éthyl **E**ster d'**A**cides **G**ras

HPLC : **C**hromatographie **L**iquide de **H**aute **P**erformance

LEMAR : **L**aboratoire des sciences de l'**E**nvironnement **MAR**in

SAAH : **S**olution **A**nti-**A**ggrégante pour **H**émocytes

DCFH-DA : 2'-7'**D**i**C**hlorodi**H**ydro**F**luorescein **D**i**A**cétate

PMA : **P**horbol 12-**M**yristate 13-**A**cétate

AGPI : **A**cide **G**ras **P**oly-**I**saturés

INTRODUCTION

L'huître *Crassostrea gigas* est l'espèce de bivalve la plus importante pour la conchyliculture française du fait de sa production (150 milliers de tonnes, FAO 1999) et de sa valeur marchande. En France, sa production est essentiellement assurée par l'aquaculture (90%). Cette dernière se caractérise par l'utilisation de juvéniles obtenus par captage naturel et élevés ensuite sur des parcs selon des techniques traditionnelles. Depuis la disponibilité de triploïdes, la production d'écloserie augmente régulièrement mais sa participation annuelle dépend surtout de l'abondance du naissain naturel.

Depuis 1994, des mortalités estivales anormales de naissain issu de captage naturel et d'écloserie sont observées sur les parcs après la mise en place des jeunes huîtres. Ces mortalités peuvent atteindre 30 à 50% de la population et sont un sujet de préoccupation pour la profession. Des études préliminaires tendent à montrer que la variabilité de survie du naissain pourrait avoir une composante génétique et pathologique mais aussi avoir pour origine des déséquilibres physiologiques associés à l'interaction entre des conditions environnementales limites (température, oxygène, nourriture) et des étapes critiques du cycle annuel (première maturation sexuelle). Ces déséquilibres favoriseraient alors les infections par des pathogènes toujours présents dans le milieu. Dans le cadre du projet MOREST visant à comprendre et expliquer les mortalités estivales, le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés étudie l'impact de l'alimentation sur la santé et la survie du naissain.

Chez la plupart des mollusques, le système circulatoire est en circuit ouvert, il n'existe pas de distinction entre le sang et le liquide interstitiel : on parle d'hémolymphe. L'hémolymphe comme le sang des vertébrés joue un rôle spécifique dans le système de défense. Celui-ci agit via des réponses à médiation cellulaire et des réponses humorales. Les mécanismes de défenses internes des bivalves ont été étudiés pour quelques espèces d'intérêt économique telles l'huître américaine *Crassostrea virginica*, l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas*, la palourde *Ruditapes philippinarum* et la moule bleue *Mytilus edulis*. Différentes revues font le point sur ce qui est connu sur les défenses cellulaires et humorales chez les bivalves (Fisher, 1986 ; Cheng, 1996 ; Ford and Tripp, 1996 ; Chu, 1997). Contrairement aux vertébrés, les invertébrés ne possèdent pas d'immunoglobulines ni de cellules mémoires (Roch, 1999). Les défenses de l'organisme sont non spécifiques et pour l'essentiel basées sur les activités des hémocytes circulant dans les tissus (Cheng, 1996). L'activation des hémocytes se traduit par des réactions de chimiotactisme, d'encapsulation et de phagocytose. Le rôle des membranes dans ces réactions est donc primordial. Sachant que l'empreinte lipidique du régime nutritif se répercute sur la composition lipidique des animaux (Soudant *et al.*,1999), le laboratoire s'est interrogé pour savoir si ces modifications pouvaient également concerner les cellules du système immunitaire. L'importance de la nutrition dans ce phénomène se pose avec d'autant plus d'acuité dans les écloseries qui utilisent un régime alimentaire peu

diversifié par rapport à la nature. De nombreuses études ont montré que la composition lipidique des aliments avait des répercussions sur la croissance, le développement et la résistance au stress des animaux en modifiant leur composition lipidique (Soudant *et al.*, 2000 ; Albentosa et al., 1996a et b ; Lingerfelser *et al.*, 1995 ; Sasaki *et al.*, 2000 ; Lin et *al.* ; 1998 ; Jeffery et *al.*, 1997). Par conséquent, les mortalités observées pourraient être en partie dues à l'alimentation utilisée en nurserie. L'alimentation en créant des déséquilibres physiologiques au niveau des membranes des hémocytes (structure, fonction) perturberait le système de défense de ces bivalves et affecterait ainsi leur survie. Lingerfelser *et al.* (1995) et Sanderson *et al.* (1995) ont montré qu'une telle relation existait chez les vertébrés pour la réponse immunitaire non spécifique. Mais pour les bivalves, rien n'est connu à ce jour.

L'objectif de cette étude est de savoir si la composition lipidique membranaire des hémocytes - cellules clés du système immunitaire des bivalves- peut-être modifiée par l'alimentation ; et de voir si cela a des répercussions dans leurs fonctions de défense. Dans ce cadre, nous allons comparer deux espèces de bivalves : l'huître et la palourde. Des juvéniles d'huîtres *C. gigas* et de palourdes *R. philippinarum* ont été nourris avec trois régimes mono-algaux (*T-Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica*) connus pour avoir des proportions variables d'acides gras en particulier le 22:6(n-3), 20:5(n-3) et le20:4(n-6) considérés comme essentiels au développement des bivalves.

Bacs	1	2	3
Algues	*C. calcitrans*	*T. suecica*	*I. galbana*
Nombre d'huîtres	286	294	293
Nombre de palourdes	85	85	90

Tableau 1: Organisation des bacs de l'expérimentation

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les juvéniles d'huîtres utilisés dans notre expérimentation proviennent de la SATMAR. Ils sont issus d'une ponte ayant eu lieu au printemps 1999, puis ils ont été pré-grossis en Irlande pour être mise en eau à Brouënnou (Nord Finistère) en février 2000. Ces huîtres de 18 mois, de taille hétérogène pesaient en moyenne 25 g. Les palourdes ont été récoltées sur le site de Clères de Marennes.

II. CHRONOLOGIE DE L'EXPERIENCE

Un gradient de température de 1°C/jour a été appliqué pour adapter les animaux de la température *in situ* (8°C) à la température d'expérience (17°C), choisie pour assurer une croissance tissulaire et favoriser ainsi une modification de composition. Pendant cette période, les animaux ont été entretenus dans les bacs d'élevage avec un mélange d'algues constitué de T-*Isochrysis galbana* et de *Chaetoceros calcitrans*. Puis pendant deux mois, les animaux de chaque bac sont nourris avec une seule espèce d'algue à raison d'une ration alimentaire de 6% de poids sec d'algue par poids sec d'huître. C'est la période d'imprégnation. Le jour 0 (Jo) de l'expérience correspond au moment où les trois modalités expérimentales, décrites dans le Tableau 1, sont mises en place.

Au cours de cette période, trois prélèvements ont été réalisés. Les prélèvements ont eu lieu comme suit : au point J_0, à J_{28-29} après 1 mois d'imprégnation et à J_{58-59} après 2 mois d'imprégnation. L'ensemble des animaux a été maintenu à jeun la veille et durant toute la durée des prélèvements.

III. PRELEVEMENTS

III.1. Hémolymphe

L'hémolymphe des huîtres et des palourdes a été directement prélevée dans le muscle adducteur. Pour les huîtres, une brèche est réalisée à hauteur du muscle à l'aide d'une meule électrique deux jours avant les prélèvements. De plus, l'ensemble des animaux sont mis à jeun la veille des prélèvements. Le jour J, l'hémolymphe est prélevée à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml montée avec une aiguille de 0,5x16 mm (Annexe I.A).

La réalisation des dosages lipidiques des hémocytes et des analyses choisies pour caractériser le système immunitaire des animaux nécessitent respectivement 4 ml et 2 à 3 ml d'hémolymphe ce qui impose de travailler par pool d'animaux. Trois réplicats (pools) d'hémolymphe sont récoltés pour chaque type d'analyse (lipides et caractérisation du système immunitaire). Ils sont conservés dans de la glace jusqu'à l'extraction lipidique des hémocytes ou aux analyses immunologiques.

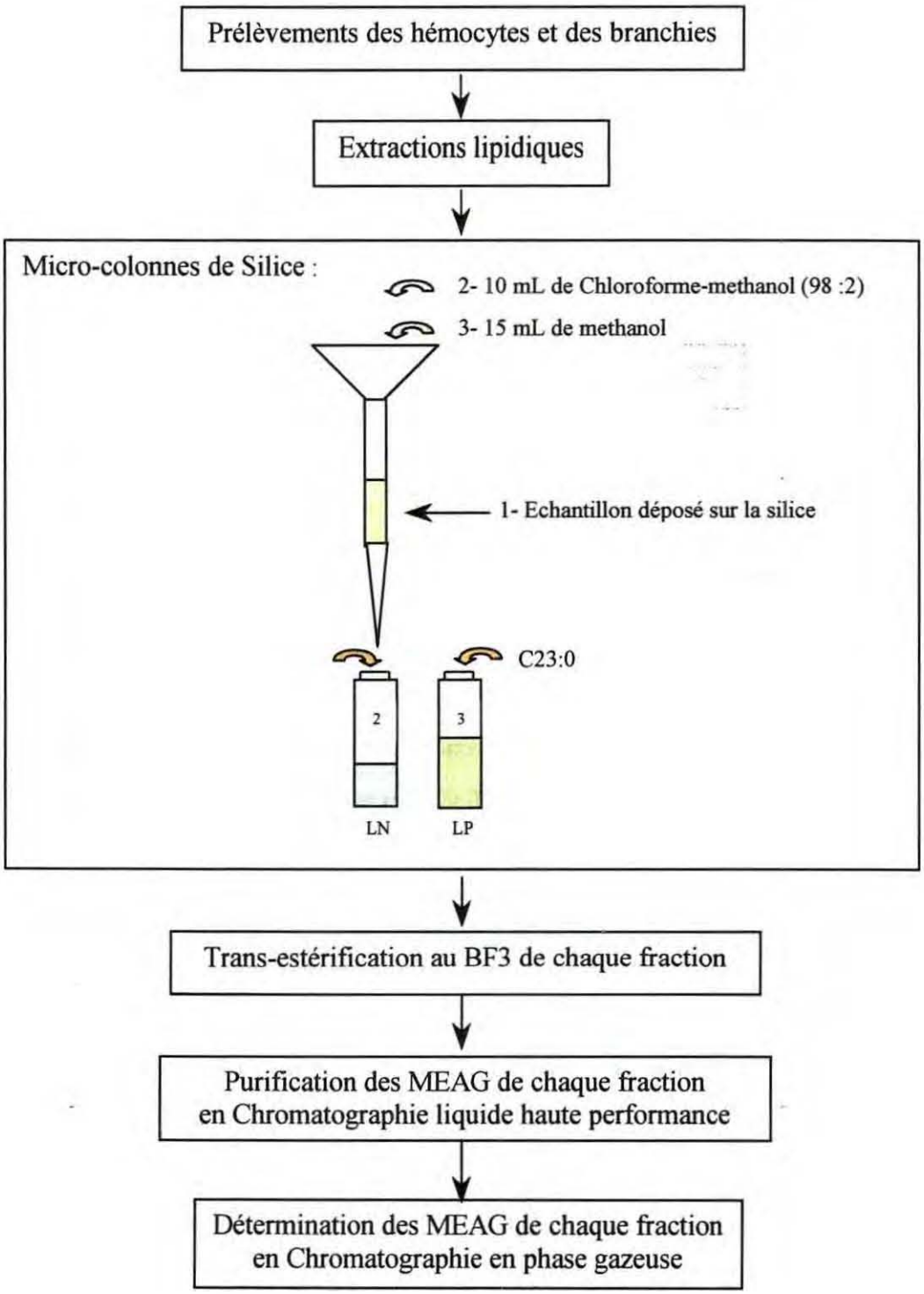


Figure 1 **:** Schéma des différentes étapes nécessaires pour l'analyse lipidique d'un échantillon

III.2. Branchies

Les branchies sont récupérées sur les animaux ayant été prélevés pour les analyses lipidiques. Après dissection, les branchies sont égouttées, rassemblées par pool et conservées dans de l'azote liquide.

IV. ANALYSES LIPIDIQUES

Les différentes étapes des protocoles sont présentées en détail dans l'Annexe I.B.

IV.1. Extractions lipidiques

IV.1.a. Hémocytes

Afin d'obtenir des échantillons d'hémocytes propres (libérés des débris éventuellement récoltées lors du prélèvement), chaque prélèvement d'hémolymphe est filtré au travers d'une maille de 53 µm. Puis, les tubes sont centrifugés à 1500 tours par minute pendant 10 minutes. Après la centrifugation, le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette pasteur. Les hémocytes sédimentés sont repris dans 2 ml de chloroforme-méthanol 2 :1 v/v et passés à l'ultrason. L'extrait ainsi obtenu est conservé sous azote à –20°C.

IV.1.b. Branchies

Les échantillons de branchies congelés sont broyés à –180°C à l'aide d'un broyeur à bille de type Dangoumeau (qui permet d'obtenir un broyat homogène). Un aliquote homogène du broyat est pesé, mis dans un tube avec 6 ml de chloroforme-méthanol 2 :1 v/v et conservé dans de la glace. Les échantillons sont ensuite passés à l'ultraturrax (broyeur) pour compléter l'extraction. Les différents tubes sont alors centrifugés à 1500 tours par minute pendant 10 minutes. L'extrait lipidique de branchies correspondant au surnageant est récupéré dans un tube et conservé sous azote à –20°C.

IV.2. Analyses des acides gras

Les différentes étapes sont schématisées dans la Figure 1.

IV.2.a. Séparation sur micro-colonne des lipides neutres et polaires

La séparation des fractions lipidiques se réalise sur une micro-colonne de silice (Marty *et al.*, 1992). Les lipides neutres (triglycérides, stérols libres et esters de stérols) sont élués à l'aide de 10 ml de chloroforme-méthanol (98:2 v/v), les lipides polaires (glycolipides et phospholipides) sont ensuite récupérés par 15 ml de méthanol. Les fractions sont collectées dans des tubes contenant 2,3 µg de C23:0 (standard interne). Puis, elles sont évaporées à sec sous azote avant d'être reprises avec 2 ml de chloroforme-méthanol 2 :1 v/v.

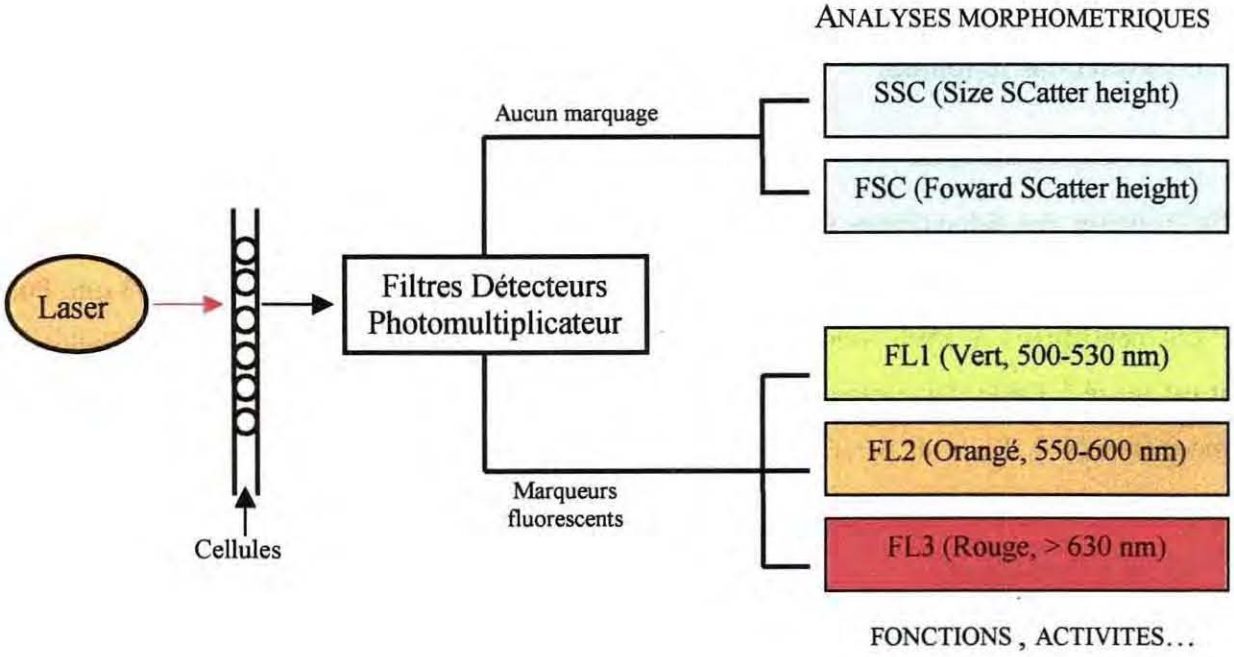


Figure 2 : Schéma des différentes possibilités d'analyse multiparamétrique de cellules isolées par le cytomètre en flux

Le cytomètre en flux permet l'étude de cellules isolées. La diffraction de la lumière selon un petit ou un grand angle donne respectivement une information sur la taille (ou diamètre en FSC) et la granularité (ou densité en SSC) de chacune des cellules. La source lumineuse permet en outre l'excitation de molécules fluorescentes présentes dans la cellule. Ces molécules peuvent être constitutives de la cellule (auto-fluorescence), mais peuvent aussi résultées d'une étape de marquage. Les signaux de diffusion et de fluorescence sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques, puis ils sont traités par un système informatique. Chaque cellule est ainsi caractérisée par plusieurs coordonnées (taille, granularité, fluorescence 1, fluorescence 2...).

IV.2.b. Trans-estérification

La moitié des fractions de lipides neutres et polaires (1 ml) issue de la micro-colonne est trans-estérifiée. L'autre moitié est conservée sous azote à –20°C. La trans-estérification des acides gras est obtenue par adjonction de BF_3 (à 14% dans le méthanol), pendant 10 min à 95°C et traité selon Marty *et al.* (1992). La solution est ensuite purifiée pour obtenir les méthyl ester d'acides gras (MEAG).

IV.2.c. Purification en Chromatographie Liquide de Haute Performance (HPLC)

La purification a été réalisée à l'aide d'un système HPLC à gradient L6200 équipé d'un détecteur U.V (Merck-Hitachi) et d'un collecteur de fraction (Modèle 203 - Gilson). Elle est basée sur l'utilisation de deux colonnes de caractéristiques différentes : une colonne de silice greffée OH (Lichrosorb DIOL, 5 µm ; 25 cmX0.4 cm, 4 cm ID, Merck) et une colonne Silice classique (Lichrospher Si100, 5 µm ; 25 cmX0.4 cm, 4 cm ID, Merck), et d'une phase mobile binaire composée d'un solvant A (hexane) et d'un solvant B (hexane-isopropanol, 90 :1 v/v) à débit de 1 ml par minute.

Les échantillons de MEAG des différentes fractions (neutres et polaires) sont injectés manuellement dans la boucle du système HPLC. La purification se réalise à température ambiante et les acides gras sont détectés en U.V à 205 nm. Les MEAG purifiés sont collectés automatiquement dans des fioles Wheaton.

IV.2.d. Chromatographie en phase gazeuse

Les MEAG sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse (CPG) Chrompak 9001 (Chrompak, Middleburg, Netherlands) équipé d'un injecteur on-colonne et d'un détecteur FID. Ils sont séparés sur une colonne capillaire DBWAX (25m x 0,32 mm ; 0,2 µm epf), programmée en température de 150 à 250°C à 3°C/min^{-1} avec de l'hydrogène comme gaz vecteur.

Les acides gras sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec celui de standards. Les données sont analysées sur un ordinateur équipé du logiciel HP ChemStation.

V. ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

Les analyses ont été effectuées au LEMAR à l'aide d'un cytomètre en flux FACScalibur (Becton-Dickinson) relié à un ordinateur équipé du logiciel CellQuest. Le fonctionnement du cytomètre en flux est schématisé dans la Figure 2. Comme pour les analyses lipidiques, les différents protocoles sont présentés en détail en annexe (Annexe I.C).

V.1. Comptage, typage et viabilité

Les analyses se font sur de l'hémolymphe fraîchement prélevée. Un aliquote d'hémolymphe est préalablement filtré sur une maille de 80µm et maintenu dans une solution anti-aggrégante (SAAH). Puis 10 minutes avant leur passage au cytomètre en flux, les échantillons sont incubés avec de l'iodure de propidium. Ce produit -un intercalant des acides nucléiques double brin- ne pénètre que dans les cellules présentant des lésions de membranes cytoplasmiques. L'iodure de propidium présent dans les cellules

mortes est détecté à 600 nm (FL2) par le cytomètre en flux. Au cours de l'acquisition des données, le cytomètre en flux enregistre simultanément les informations concernant la fluorescence, la taille et la complexité des cellules analysées (vivantes et mortes).

V.2. Phagocytose

V.2.a. Protocole pour les prélèvements du T_0 et T_1

L'étude de la phagocytose des hémocytes d'huître et de palourde à T_0 et T_1 a été réalisée selon un protocole établi pour la palourde (C. Paillard, communication personnelle). La phagocytose des hémocytes a été testée sur micro-plaques de 24 puits. Les hémocytes sont mis en contact avec un tapis de billes fluorescentes de 2µm de diamètre. Après dépôt des hémocytes, le surnageant est retiré. On réalise deux rinçages à l'eau de mer filtrée avant de décoller le tapis d'hémocytes à l'aide d'une solution de trypsine à 0.4%. Les hémocytes sont fixés au formol 6% et passés au cytomètre en flux. Les hémocytes présentant une intensité de fluorescence détectée en FL1 sont comptabilisés comme des cellules ayant phagocytées des billes. Dans ce protocole, un contrôle avec de la cytochalasine (10 µg/ml) -un inhibiteur de la phagocytose- est réalisé et permet de soustraire le phénomène d'adhésion des billes sur les membranes des hémocytes. Le pourcentage de phagocytose des hémocytes est alors calculé par la différence des deux mesures : Test - Cytochalasine. Les résultats de phagocytose des hémocytes à T_0 montrent que la mesure de fluorescence (présence de billes dans les hémocytes) est significativement plus élevée dans le surnageant chez les huîtres et inversement chez les palourdes (Annexe II). Ces résultats se sont confirmés à T_1. Au vu de ces résultats, le protocole de phagocytose a été modifié pour le point final.

V.2.b. Protocole pour les prélèvement du T_2

Dans ce second protocole, chaque échantillon d'hémocytes est traité selon trois conditions d'analyses. Dans la première condition, les hémocytes sont directement mis au contact avec les billes fluorescentes dans un tube eppendorf. Puis, après 60 min d'incubation à 18°C, ils sont fixés et passés au cytomètre en flux. Pour les deux autres, on a effectué une pré-incubation de 2 heures à deux températures (18°C et 30°C) avant l'addition des billes fluorescentes dans l'objectif d'évaluer l'influence de la température et du délai de la mesure sur le maintien des capacités de phagocytose. Puis, les fractions sont passées au cytomètre en flux. Comme précédemment, c'est l'intensité de fluorescence des hémocytes qui nous renseigne sur leur capacité de phagocytose.

V.3. Activité métabolique - « Oxidative Burst »

La mesure de cette activité a été réalisée sur les échantillons du point final de notre expérimentation (T_2). Chaque pool d'hémolymphe est divisé en quatre fractions. Dans chaque fraction, on a ajouté du 2'-7'dichlorofluorescéine d'acétate (DCFH-DA) et incubée 20 min à 18°C ou 30°C en présence ou non de phorbol myristate acétate (PMA). Le PMA est un « activateur » de la NADPH oxydase. Après pénétration dans la cellule, le DCFH-DA est clivé en DCFH par des estérases. Puis le

DCFH -une molécule non fluorescente- est converti en DCF sous l'action d'H_2O_2. Cette conversion est fortement accélérée en présence de peroxydases. Le DCF possède une fluorescence verte (détectée en FL1) dépendante de la quantité d'H_2O_2 et de la présence de peroxydase dans les hémocytes. Les échantillons sont analysés au cytomètre en flux. La production d'espèces actives de l'oxygène correspond alors à la différence de production de H_2O_2 entre des échantillons stimulés ou non par le PMA. Or dans notre étude, la mesure de l'oxydation du DCFH-DA n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif du PMA. Nous avons donc décidé de grouper les intensités de fluorescence des cellules des deux lots (avec ou sans PMA) pour chaque température d'incubation et de considérer la mesure comme une activité métabolique de base des hémocytes.

V.4. Adhésion

La capacité d'adhésion des hémocytes a été testée au point T_2 à deux températures différentes (18°C et 30°C). Elle se mesure par la différence entre le nombre d'hémocytes déposés et le nombre d'hémocytes récupérés dans le surnageant après deux heures d'incubation. C'est le surnageant qui est analysé au cytomètre en flux.

VI. Indice de condition

La mesure de l'indice de condition a été réalisée sur les animaux prélevés pour les analyses immunologiques à T_0 et T_2. Après ponction de l'hémolymphe, nous avons mesuré individuellement le poids total, le poids de chair fraîche et enfin le poids de coquille sèche. Dans notre étude, l'indice de condition a été calculé selon la méthode de Lawrence et Scott (1982) qui permet de mettre en évidence des phénomènes physiologiques (augmentation ou diminution du matériel de réserve). Cet indice est le rapport du poids sec sur le poids intervalvaire, ce dernier correspondant à la différence entre le poids total et le poids de la coquille. A chaque donnée est appliqué un coefficient multiplicateur de 1000.

VII. Analyses statistiques

Toutes les données ont été traitées statistiquement à l'aide du logiciel Statview.

Une analyse de variance et un test *a posteriori* (test PLSD de Fisher) ont été effectués pour montrer l'existence ou non de différence significative entre les moyennes des données au cours de l'expérimentation. Une transformation Arcsinus($\sqrt{}$) a été faite sur les données exprimées en pourcentage avant de procéder à l'analyse ANOVA.

	C. calcitrans	*I. galbana*	*T. suecica*
Huîtres	26.6	31	42
Palourdes	0	1	2.3

Tableau 2 : Pourcentages de mortalité de *C. gigas* et *T. philippinarum* pour chaque conditionnement à la fin de l'expérimentation.

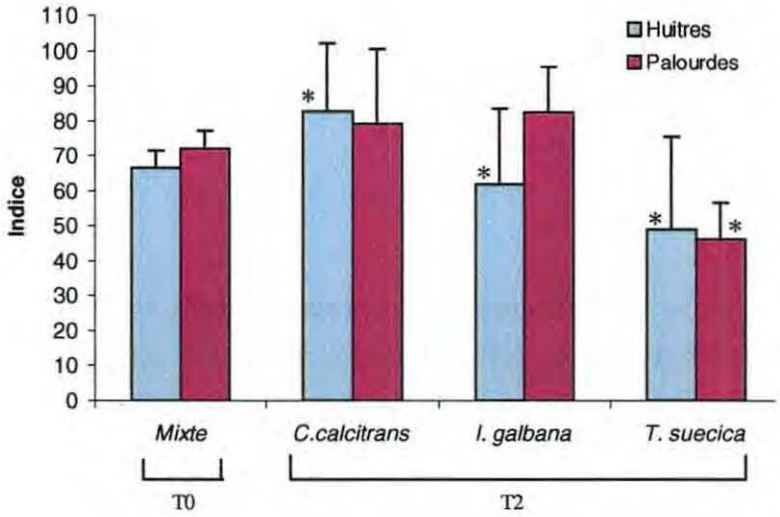


Figure 3 : Indice de Lawrence et Scott (1982) de *C. gigas* et *T. philippinarum* au début et à la fin de l'expérimentation. * l'astérisque indique les lots significativement différents des autres à T_2 (ANOVA, $p<0.001$).

	C.calcitrans	*T. suecica*	*I. galbana*
14:0	16.1	0.0	20.9
16:0	5.5	36.4	11.6
18:0	1.5	1.25	2.7
16:1(n-7)	15.7	0.4	6.1
18:1(n-9)	1.0	24.7	10.6
18:1(n-7)	0.4	3.2	1.1
16:2(n-7)	2.7	0.0	0.3
16:3(n-4)	14.4	0.0	0.2
18:2(n-6)	1.0	2.9	9.6
18:3(n-3)	0.1	6.4	6.8
18:4(n-3)	1.5	3.4	14.7
20:4(n-6)	**2.5**	**0.4**	**0.1**
20:5(n-3)	**28.6**	**3.75**	**0.5**
22:5(n-6)	**0.0**	**0**	**1.4**
22:5(n-3)	0.1	0.0	0.2
22:6(n-3)	**2.2**	**0.05**	**7.3**
Total Saturés	23.6	38.8	35.7
Total Mono-insaturés	17.3	32.75	18.1
Total Poly-insaturés	59.0	27.2	46.1
(n-3)/(n-6)	7.8	5.7	2.3
22:6(n-3)/20:5(n-3)	0.1	0.01	14.9
22:5(n-6)/20:4(n-6)	0.0	0.0	11.6

Tableau 3 : Principaux acides gras des algues utilisées dans notre expérimentation. Données exprimées en % du total et issues de la littérature (Soudant, 1995) et des cultures Ifremer.

RESULTATS

I. DONNEES RELATIVES AU CONDITIONNEMENT

I.1. Température et algues

Pour les trois conditionnements nutritionnels dont l'apport algal est équivalent en biomasse, nous avons respecté la consigne théorique à savoir : $0.6*10^9$ cellules par huître et par 24 heures de *C. calcitrans* et de *I. galbana*, et $0.06*10^9$ cellules/huître/24 heures de *T. suecica*.

I.2. Mortalité au cours de l'expérimentation

Les pourcentages de mortalité à la fin de l'expérimentation pour les différents lots sont indiqués dans le Tableau 2. Les huîtres présentent des taux de mortalité très élevés en comparaison des palourdes. De plus, on remarque l'existence d'un gradient en fonction du régime nutritif. Les huîtres nourries avec l'algue *T. suecica* présentent un taux de mortalité important. Il est de 42% contre 31% et 26.6% pour les deux autres conditionnements. Néanmoins, un test de χ^2 effectué sur ces résultats ne montre aucune différence ($p>0.05$).

I.3. Index de condition

L'histogramme représente les valeurs des indices de Lawrence et Scott pour les deux espèces au début et à la fin de l'expérimentation (Figure 3). Les huîtres nourries avec *C. calcitrans* présentent le meilleur indice de condition à T_2 (ANOVA, $p<0.001$). Chez la palourde, il n'existe pas de différences entre les animaux des conditionnements *I. galbana* et *C. calcitrans*. Seuls les animaux nourris avec *T. suecica* ont un indice significativement plus faible par rapport aux autres (ANOVA, $p<0.001$). De plus, on remarque une baisse de l'indice de condition pour les huîtres comme pour les palourdes nourries avec l'algue *T. suecica* entre T_O et T_2, mais elle est significative uniquement pour les palourdes (ANOVA, $p<0.001$). Au contraire avec les deux autres conditionnements, les animaux ont une croissance ou se maintiennent par rapport à leur état initial. Seules les huîtres du conditionnement *C. calcitrans* ont une croissance significative (ANOVA, $p<0.05$).

II. ANALYSES LIPIDIQUES

II.1. Composition des algues

La composition en acides gras de chacune des algues utilisées dans notre expérimentation est présentée dans le Tableau 3. Les trois algues présentent des proportions variables en acides gras essentiels. Ainsi, l'algue *I. galbana* est celle qui apporte en abondance l'acide gras poly-insaturé (AGPI) 22:6(n-3) (7.3%). Mais, elle contient aussi 0.1% de 20:4(n-6) et 0.5% de 20:5(n-3). Au contraire, l'algue *C. calcitrans* apporte principalement du 20:5(n-3) (28.6%), mais du 20:4(n-6) à 2.5% et du 22:6(n-3) à

	T0	T1			T2		
	Mixte	*C. calcitrans*	*T. suecica*	*I. galbana*	*C. calcitrans*	*T. suecica*	*I. galbana*
Palourdes							
Saturés	23.89	28.57	23.11	26.19	23.92	20.77	22.28
Mono-insaturés[b]	12.83	14.58	15.80	16.60	16.70	14.73	16.84
Poly-insaturés	54.30	48.16	51.58	49.33	50.95	54.69	54.85
22:6(n-3)/20:5(n-3)[b]	3.38	1.72	3.36	8.47*[a]	0.87	2.30	13.56*[a]
22:5(n-6)/20:4(n-6)[b]	0.25	0.19	0.20	1.03*[a]	0.08	0.19	1.32*[a]
Huîtres							
Saturés[b]	20.36	23.59	26.43	24.04	30.39	35.47	25.68
Mono-insaturés[b]	12.20	16.33	14.80	14.92	17.63	16.14	17.09
Poly-insaturés[b]	60.08	52.16	49.70	51.58	45.52	43.04**	50.91**[a]
22:6(n-3)/20:5(n-3)	0.97	0.48	0.58	1.02*[a]	0.28	0.72	1.93*[a]
22:5(n-6)/20:4(n-6)[b]	0.14	0.07	0.07	0.33*[a]	0.30	0.50	0.97

Tableau 4 : Distribution moyenne des classes d'acides gras dans les hémocytes de *T. philippinarum* et *C. gigas* au cours du temps et en fonction du régime algal. a : il existe un effet de l'alimentation (* l'astérisque indique le lot responsable des différences significatives, ** la double astérisque indique les deux lots qui diffèrent l'un par rapport à l'autre). b : il existe un effet de la date de prélèvement (ANOVA, $p<0.05$).

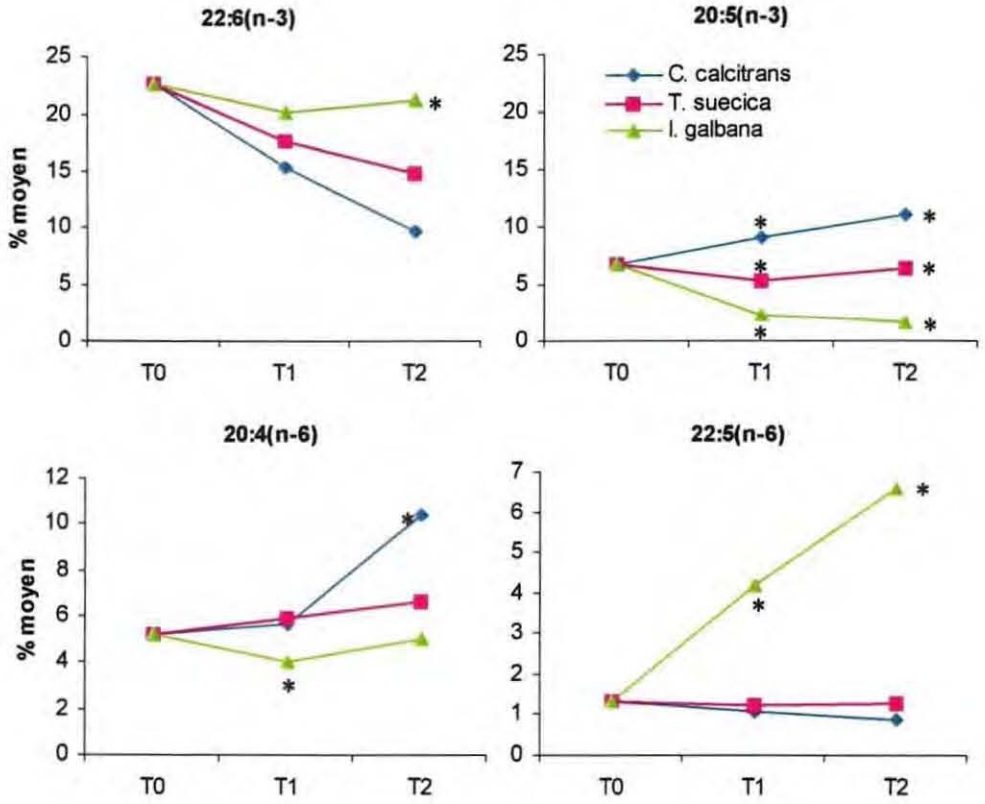


Figure 4 : Evolution des principaux acides gras dans la composition lipidique des membranes des hémocytes de *T. philippinarum* au cours de l'expérimentation. * l'astérisque indique les lots responsables des différences significatives pour les temps de prélèvements T_1 et T_2 (ANOVA, $p<0.01$).

2.2%. L'algue *T. suecica* présente une composition intermédiaire aux deux précédentes pour le 20:4(n-6) avec 0.4% et le 20:5(n-3) avec 3.75% et elle n'apporte que très peu de 22:6(n-3) (0.05%).

II.2. Composition lipidique des hémocytes et branchies

Les pourcentages de lipides neutres et de lipides polaires ont été calculés pour les hémocytes et les branchies. Ces pourcentages sont très stables au cours du temps dans les branchies pour les deux espèces, huîtres et palourdes (88% et 94% respectivement). Cependant, on observe pour l'huître des différences significatives entre les conditionnements, notamment entre le régime *T. suecica* (93%) et les deux autres (85.6% et 86.9% pour les régimes *C. calcitrans* et *I. galbana* respectivement, $p<0.05$). Pour les hémocytes, on observe une augmentation significative de 8% des lipides polaires dans les hémocytes d'huître entre T_1 et T_2 (73% à 81%, $p<0.05$). Par contre, chez la palourde, la proportion de lipides polaires en moyenne 84% est stable au cours du temps et quel que soit le régime algal ($p>0.05$).

Comme l'objectif de notre expérimentation était de savoir si l'alimentation pouvait modifier la composition des membranes constituées principalement par des phospholipides, seules les données relatives aux lipides polaires seront présentées dans ce mémoire.

II.3. Composition en acide gras des hémocytes

II.3.a. Palourdes

II.3.a.1) Distribution des classes d'acides gras

A T_2, le régime algal mono-spécifique semble marquer la composition membranaire globale des hémocytes. On observe un gradient dans les proportions en AGPI entre les conditionnements (Tableau 4). En effet, on a plus d'AGPI dans les hémocytes des animaux nourris avec *I. galbana* et *T. suecica* par rapport à ceux nourris avec *C. calcitrans*. Cependant, une analyse de variance montre qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'alimentation sur les proportions de cette classe d'acides gras ($p>0.05$). On a en moyenne 24% d'acides gras saturés, 15.5% de mono-insaturés et 52% d'AGPI dont 30% de la série (n-3).

II.3.a.2) Composition en AGPI

Bien que les proportions des AGPI ne soient pas significativement affectées par le régime algal, des changements internes de la composition en AGPI dans les membranes des hémocytes peuvent exister et résulter de réarrangements entre acides gras. Dans ce paragraphe, seules les variations des acides gras essentiels : 22:6(n-3), 20:5(n-3), 20:4(n-6) et 22:5(n-6) seront présentées.

Sur la Figure 4 est représentée l'évolution de ces quatre acides gras essentiels au cours de l'expérimentation. A T_0, les lipides polaires membranaires des hémocytes sont constitués de 22.6% de 22:6(n-3). Puis, cette proportion diminue pour les conditionnements *C. calcitrans* et *T. suecica* pour arriver au point final à des taux de 9.7% et de 14.7%. Au contraire, la proportion de cet acide gras reste relativement stable pour les animaux nourris avec l'algue *I. galbana* (21.3%). Les proportions de 20:5(n-3) et de 20:4(n-6) caractéristiques de l'algue *C. calcitrans* sont supérieures et augmentent au cours du

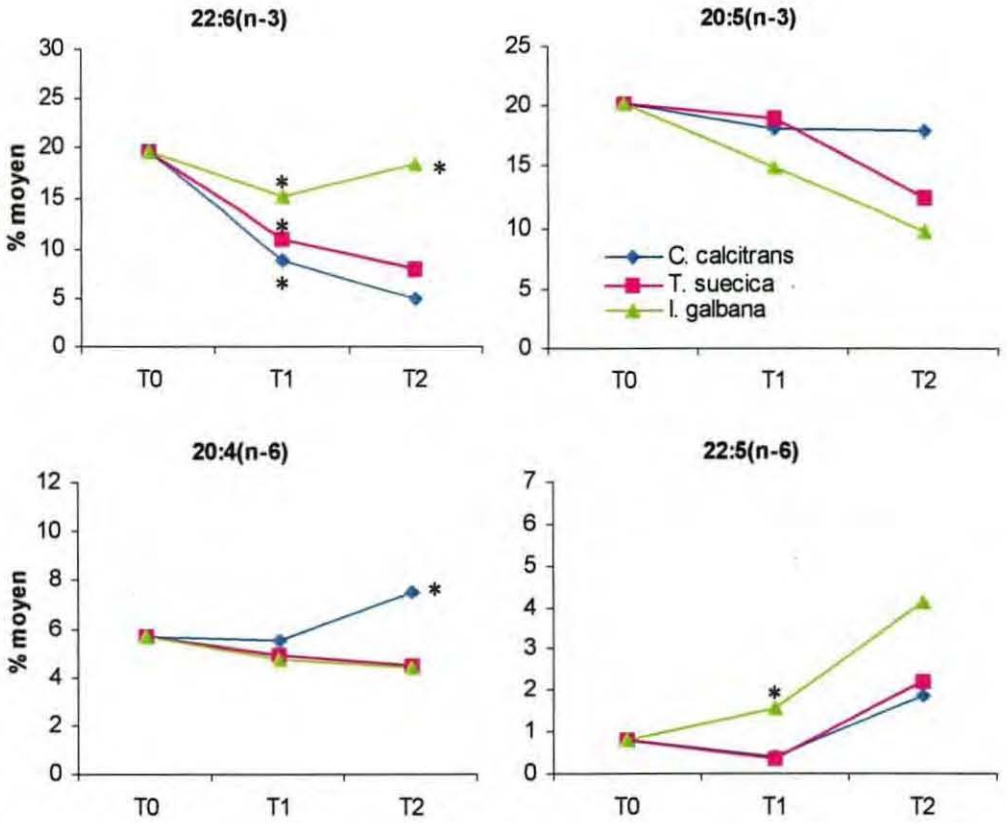


Figure 5 : Evolution des principaux acides gras dans la composition lipidique des membranes des hémocytes de *C. gigas* au cours de l'expérimentation. * l'astérisque indique les lots responsables des différences significatives pour les temps de prélèvements T_1 et T_2 (ANOVA, $p<0.01$ à T_1 et $p<0.05$ à T_2).

	T0	T1			T2		
	Mixte	*C. calcitrans*	*T. suecica*	*I. galbana*	*C. calcitrans*	*T. suecica*	*I. galbana*
Palourdes							
Saturés	18.10	18.21	16.73*	18.68[a]	17.32	15.79**	19.73**[a]
Mono-insaturés[b]	11.87	17.04	15.00	14.81	17.68**	15.83	14.30**[a]
Poly-insaturés[b]	58.38	53.49	55.44	56.30	46.88	48.63	52.29
Huîtres							
Saturés	16.01	15.43	15.95	16.32	17.20	16.17	17.17
Mono-insaturés[b]	14.99	21.54*	17.27*	18.71*[a]	20.89*	16.80	17.12[a]
Poly-insaturés[b]	58.35	52.16*	56.03	55.30[a]	51.57*	56.51	55.69[a]

Tableau 5 : Distribution moyenne des classes d'acides gras dans les branchies de *T. philippinarum* et *C. gigas* au cours du temps et en fonction du régime algal. a : il existe un effet de l'alimentation (* l'astérisque indique le lot responsable des différences significatives, ** la double astérisque indique les deux lots qui diffèrent l'un par rapport à l'autre). b : il existe un effet de la date de prélèvement (ANOVA, $p<0.05$).

conditionnement pour ce régime algal. On passe de 6.7 à 11.1% de T_0 à T_2 pour le 20:5(n-3) et de 5.2 à 10.3% pour le 20:4(n-6). Au contraire, on observe une diminution de 5% du 20:5(n-3) avec l'algue *I. galbana* et un maintien de cet acide gras pour le régime *T. suecica*. Pour le 20:4(n-6), les proportions restent relativement stables pour ces deux derniers régimes algaux. Enfin, il faut noter une augmentation très nette du 22:5(n-6) dans les compositions membranaires des hémocytes pour les animaux élevés avec *I. galbana* (5.2%). Les analyses de variance montrent un effet très significatif du régime alimentaire sur les proportions de chacun des acides gras dans les membranes des hémocytes et sur différents les rapports à T_2 ($p<0.01$). Cet effet était déjà détecté à T_1 pour certains acides gras.

II.3.b. Huîtres

II.3.b.1) Distribution des classes d'acides gras

La composition globale des membranes des hémocytes a évolué au cours de l'expérimentation et selon les conditionnements (Tableau 4). Ainsi de T_1 à T_2, on observe une diminution de 6.7% des AGPI pour les animaux du régime *T. suecica* et *C. calcitrans*. Seuls les hémocytes des animaux nourris avec l'algue *I. galbana* conservent des proportions en AGPI stables. Des analyses de variance confirment cet effet de la date de prélèvement sur les variations des AGPI et des acides gras saturés ($p<0.05$). Un effet significatif de l'alimentation à T_2 entre les proportions en AGPI des régimes *I. galbana* et *T. suecica* est à souligner ($p<0.05$).

II.3.b.2) Composition en AGPI

La composition spécifique des hémocytes d'huître est différente de celle des palourdes notamment pour le 20:5(n-3) : 20.2% chez l'huître contre 6.7% chez la palourde. Comme chez la palourde, l'abondance ou les déficiences des acides gras essentiels dans la nourriture marquent fortement les lipides membranaires des hémocytes des huîtres au cours de l'expérimentation (Figure 5). Ainsi, on observe une diminution de 14.5% en 22:6(n-3) pour les animaux nourris avec *C. calcitrans*, de 10.5% en 20:5(n-3) avec *I. galbana* et une baisse de 11.5% et 7.8% respectivement pour ces deux principaux acides gras avec le conditionnement algal *T. suecica*. Le niveau de 20:4(n-6) reste stable dans les hémocytes des animaux nourris avec les algues *I. galbana* et *T. suecica*. Au contraire, le régime algal *C. calcitrans* permet d'augmenter la proportion de cet acide gras dans les membranes des hémocytes. Ces résultats montrent que les contenus en 22:6(n-3), 20:5(n-3) et 20:4(n-6) des membranes des hémocytes ont été significativement modulée par les régimes algaux mono-spécifiques (ANOVA, $p<0.05$).

II.4. Composition en acide gras des branchies pour les deux espèces

II.4.a. Distribution des classes d'acides gras

Comme dans les hémocytes à T_0, les branchies d'huître et de palourde ont une composition riche en AGPI (58%). Les AGPI diminuent significativement au cours du temps au profit des autres classes d'acides gras, notamment les mono-insaturés (Tableau 5)(ANOVA, $p<0.001$).

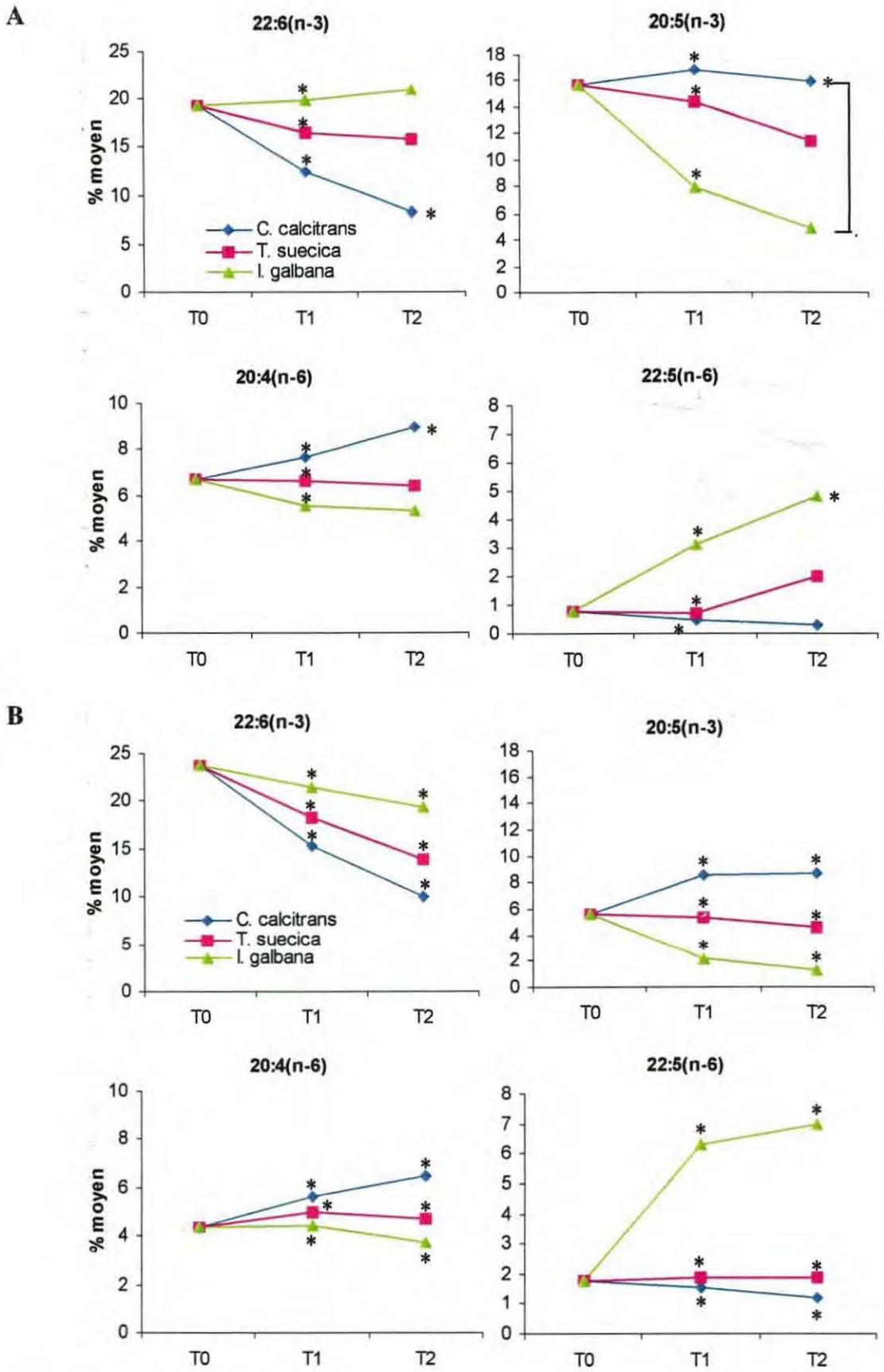


Figure 6 : Evolution des principaux acides gras dans la composition lipidique des membranes des branchies de *C. gigas* (A) et de *T. philippinarum* (B). * l'astérisque indique les lots responsables des différences significatives pour les temps de prélèvements T_1 et T_2 (ANOVA, $p<0.05$ pour les huîtres et $p<0.001$ pour les palourdes).

A T_2 chez l'huître, les pourcentages des AGPI varient significativement sous l'influence du régime nutritif (ANOVA, $p<0.05$). Chez la palourde, les proportions des AGPI sont légèrement plus faibles (49.2% en moyenne) et statistiquement identiques quel que soit le régime algal.

II.4.b. Composition en AGPI

Comme pour les hémocytes à T_0, la composition des lipides membranaires des branchies de palourde se caractérise par un taux élevé de 22:6(n-3) (23.7%), et une faible représentation du 20:5(n-3) similaire à celle du 20:4(n-6) : 5.6% et 4.3% respectivement. Chez l'huître, les proportions des AGPI sont semblables à celles des hémocytes pour le 22:6(n-3) et le 20:4(n-6) avec 19.2% et 6.7% respectivement, mais différentes pour le 20:5(n-3) avec 15.7% dans les branchies pour 20.2% dans les hémocytes. A T_0, les deux espèces se distinguent donc essentiellement par leurs niveaux respectifs de 20:5(n-3) : 5.6% pour la palourde et 15.7% pour l'huître.

Dès T_1, après un mois de conditionnement, on observe l'effet du marquage nutritionnel dans la composition lipidique des branchies chez les deux espèces (Figure 6). Il se caractérise par la diminution des acides gras déficients ou en faible quantité dans chacune des algues en relation avec les conditionnements. En effet, pour les animaux nourris avec *C. calcitrans*, on observe une diminution du taux de 22:6(n-3) et le maintien des autres acides gras. Au contraire pour l'algue *I. galbana*, le taux de 20:5(n-3) diminue au cours du temps tandis que le pourcentage de 22:5(n-6) augmente. De plus, on remarque que le taux de 22:6(n-3) augmente chez l'huître, mais diminue légèrement chez la palourde. Enfin pour le conditionnement avec l'algue *T. suecica*, on a une baisse de 22:6(n-3) chez les deux espèces et une baisse de 20:5(n-3) uniquement pour les huîtres. A T_2, l'effet de l'alimentation sur les proportions de chacun de ces acides gras dans les membranes des branchies est significatif pour les deux espèces (ANOVA, $p<0.05$ pour les huîtres et $p<0.001$ pour les palourdes).

III. Analyses immunologiques

III.1. Concentrations hémocytaires

Chez la palourde, on observe des variations importantes du nombre total d'hémocytes comptés (THC) entre les conditionnements et au cours du temps (Tableau 6). En effet, les concentrations en hémocytes pour les animaux nourris avec *C. calcitrans* sont significativement supérieures par rapport à celles des autres conditionnements (ANOVA, $p<0.05$). De plus, une augmentation significative des concentrations augmentent entre T_1 et T_2 quel que soit le régime nutritionnel a été observée (ANOVA, $p<0.05$).

Au contraire chez l'huître, les différences de THC selon les régimes nutritionnels et au cours de l'expérimentation ne sont pas significatives (ANOVA, $p>0.05$).

	T0	T1			T2		
	Mixte	*C.calcitrans*	*T.suecica*	*I.galbana*	*C.calcitrans*	*T.suecica*	*I.galbana*
THC:							
Palourdes	$5,9.10^5$	11.10^5*	$4,4.10^5$	$5,1.10^5$	14.10^5*	$9,6.10^5$	8.10^5
Huîtres	$6,4.10^5$	$3,0.10^5$	$6,1.10^5$	$5,2.10^5$	$5,8.10^5$	$3,7.10^5$	$3,7.10^5$
Viabilité :							
Palourdes	3	2	2,5	2,2	3,6	2,6	4,8
Huîtres	2,8	2,6	2,6	3,6	4,1	3,3	3,9

Tableau 6 : Concentrations hémocytaires moyennes et viabilité des hémocytes (exprimée en pourcentage de cellules mortes) au cours de l'expérimentation. * l'astérisque indique les lots significativement différents des autres (ANOVA, $p<0.05$).

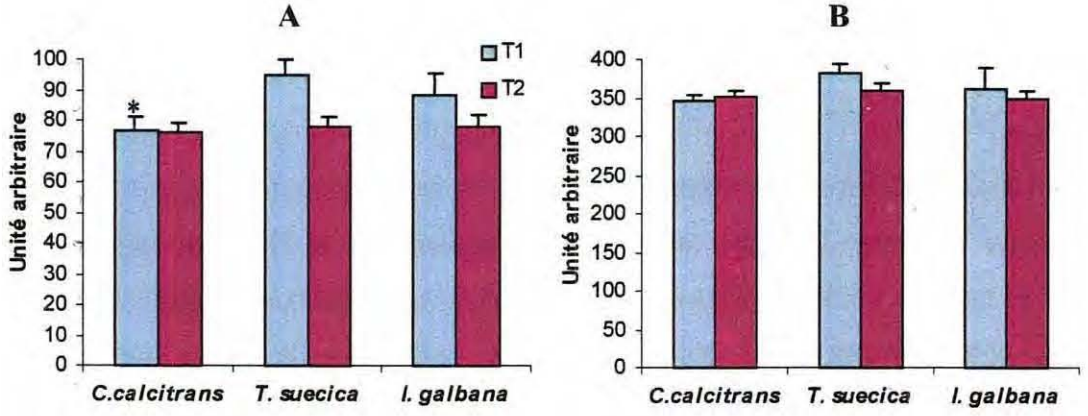


Figure 7 : Densité (A) et taille (B) des hémocytes de *T. philippinarum* analysés en cytomètrie en flux. * l'astérisque indique les lots responsables de différences significatives (ANOVA, $p<0.05$).

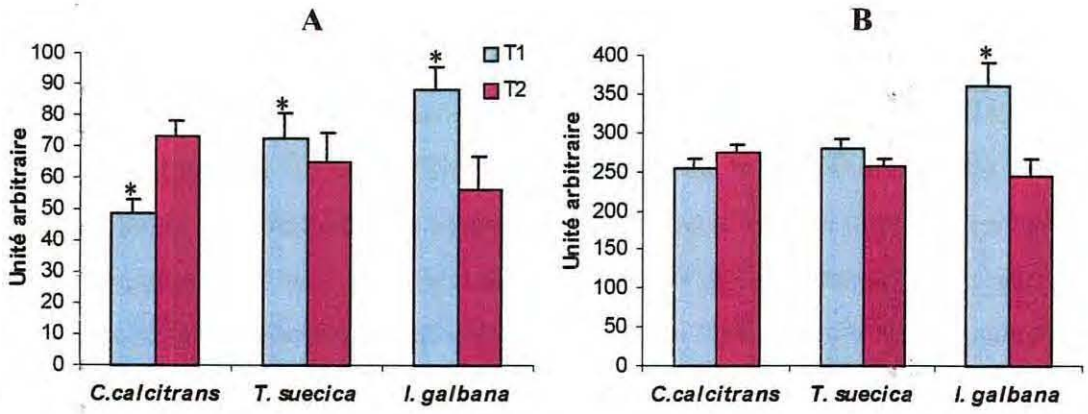


Figure 8 : Densité (A) et taille (B) des hémocytes de *C. gigas* analysés en cytomètrie en flux. * l'astérisque indique les lots responsables de différences significatives (ANOVA, $p<0.05$).

III.2. Caractérisation des populations d'hémocytes des huîtres et des palourdes

L'ensemble des paramètres biologiques mesurés au cytomètre en flux sont exprimés en unités arbitraires (U.A) sauf pour la phagocytose.

III.2.a. Palourdes

Chez la palourde, les caractéristiques morphologiques des hémocytes subissent peu de variations en fonction de l'alimentation et du temps. La densité et la taille des hémocytes du conditionnement *T. suecica* diminuent de 95 à 78 U.A et de 383 à 358 U.A pour chacun des paramètres respectivement entre T_1 et T_2 (Figure 7). Seuls les hémocytes de palourdes nourries avec l'algue *C. calcitrans* conservent leurs caractéristiques au même niveau à T_1 et T_2 avec en moyenne une taille de 348 U.A et une densité de 76.4 U.A. Les hémocytes du conditionnement *I. galbana* ont des caractéristiques morphologiques intermédiaires qui ont aussi diminué entre T_1 et T_2. Cependant, l'analyse de variance réalisée sur les données à T_2 révèle l'absence d'un effet significatif de l'alimentation sur la taille et sur la densité des hémocytes ($p>0.05$).

III.2.b. Huîtres

La taille des hémocytes d'huître est en moyenne plus petite que celles des palourdes. Au point final T_2, il n'y a pas de différence entre les conditionnements (ANOVA, $p>0.05$). Cependant, on peut noter à T_1 la taille significativement plus importante des hémocytes des animaux nourris avec *I. galbana* : 360 U.A (Figure 8).

La densité des hémocytes à T_1 varie significativement en fonction du régime alimentaire (ANOVA, $p<0.05$). Les hémocytes du lot *I. galbana* sont les plus denses (88 U.A). Puis, ceux sont les hémocytes des animaux du conditionnement *T. suecica* (72 U.A). Mais, les densités des hémocytes diminuent à T_2 pour l'ensemble des régimes. Ce sont alors les hémocytes du conditionnement *C. calcitrans* qui présentent la densité la plus élevée (72.8 U.A) et l'effet de l'alimentation n'est plus significatif.

III.3. Caractéristiques des granulocytes et hyalinocytes d'huître

La séparation des populations hémocytaires a été effectuée sur les cytogrammes des huîtres pour le point de prélèvement T_2. La constitution des échantillons d'hémolymphe est globalement la suivante : 70% de hyalinocytes et de petits agranulocytes, 18% de granulocytes et 12% de cellules indéterminées.
L'analyse séparée des données relatives à la densité et à la taille des sous-populations hémocytaires, nous permet de remarquer qu'elles sont affectées différemment par l'imprégnation alimentaire et la température d'incubation avant les analyses (Figure 9). En effet, la densité et la taille des hyalinocytes ne sont pas affectées par le régime alimentaire. Par contre, ils sont très sensibles à la température de pré-incubation ($p<0.001$). On observe une diminution des mesures relevées par le cytomètre en flux avec la température. Pour les granulocytes, la densité est influencée par le régime nutritionnel dans toutes les

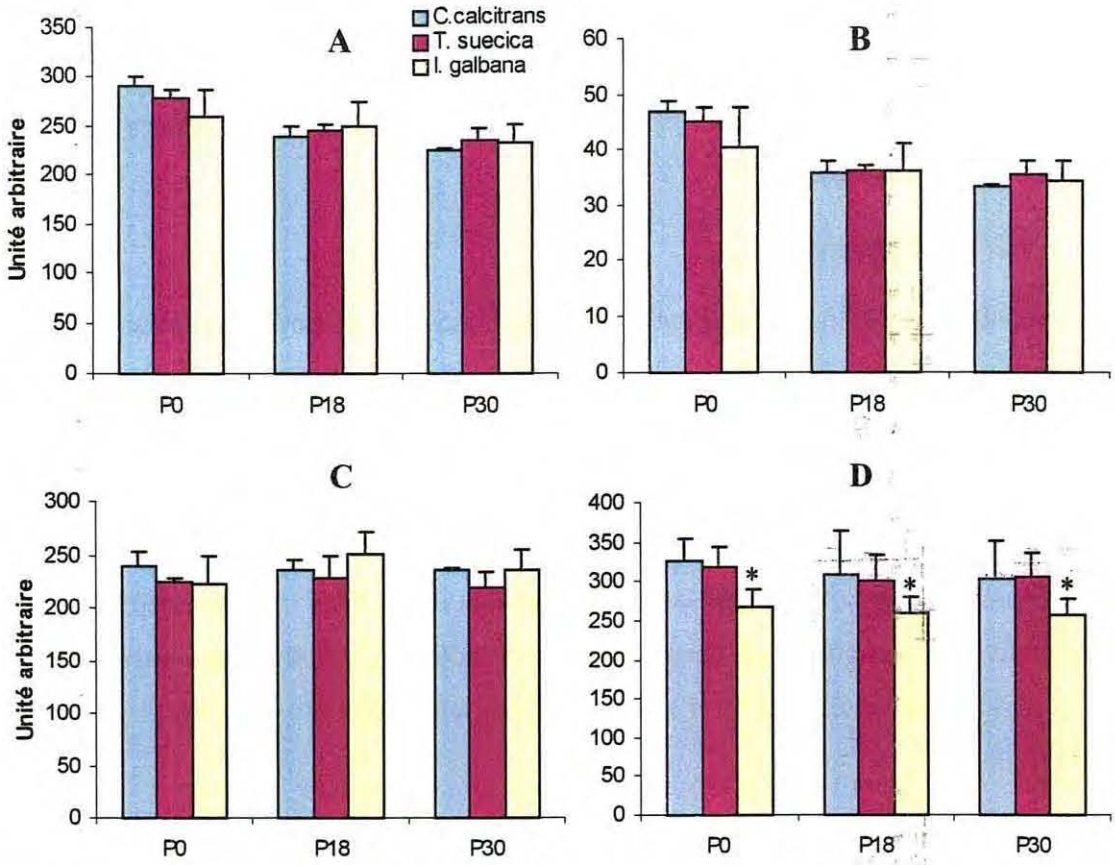


Figure 9 : Caractéristiques morphologiques des sous-populations hémocytaires de *C. gigas* en cytomètrie en flux au point T_2 en fonction de la température de pré-incubation. A : diamètre des hyalinocytes. B : densité des hyalinocytes. C : diamètre des granulocytes. D : densité des granulocytes.

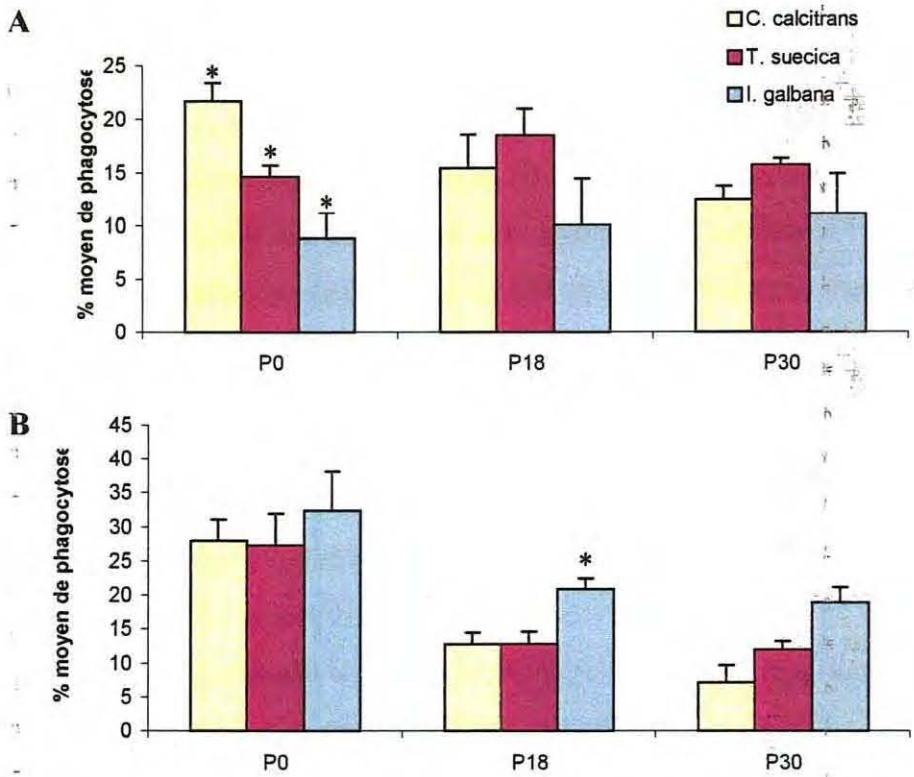


Figure 10 : Pourcentage moyen de phagocytose des hémocytes de *T. philippinarum* (A) et *C. gigas* (B) à T_2 pour différentes températures de pré-incubation : P0 (analyse immédiate), P18 (pré-incubation à 18°C) et P30 (pré-incubation à 30°C°. * l'astérisque indique les lots significativement différents à $p<0.05$.

conditions d'analyse ($p<0.01$) et ceci est principalement du à la faible densité des hémocytes des animaux du conditionnement *I. galbana* (261U.A).

III.4. Viabilité des hémocytes

Chez la palourde à T_2, on observe un gradient dans les pourcentages de mortalité en fonction du régime algal (Tableau 6). On a plus de mortalité dans les hémocytes des animaux du conditionnement *I. galbana* (4.8%), puis on a le lot *C. calcitrans* (3.6%) et enfin *T. suecica* avec 2.6%. Cependant, l'analyse de variance réalisée souligne l'absence d'un effet de l'alimentation ($p>0.05$). Par contre, elle met en évidence une augmentation significative des pourcentages de mortalité entre T_1 et T_2 ($p<0.05$).

En ce qui concerne les pourcentages d'hémocytes morts chez l'huître, malgré de légères fluctuations entre les régimes algaux, ils sont relativement constants au cours de l'expérimentation quel que soit le régime alimentaire des animaux ($p>0.05$).

III.5. Pouvoir de phagocytose des hémocytes

III.5.a. Analyse sans délai de la phagocytose (P0)

A température ambiante (analyse immédiate), on remarque que la capacité de phagocytose des hémocytes de palourde est différente selon le régime nutritionnel des animaux (Figure 10A). En effet, elle est statistiquement plus élevée pour les hémocytes des animaux nourris avec *C. calcitrans* (21.7%) par rapport aux hémocytes des deux autres conditionnements ($p<0.01$). On a des valeurs de 8.8% et 14.7% de taux de phagocytose pour *I. galbana* et *T. suecica* respectivement.

Pour l'huître, la capacité moyenne de phagocytose des hémocytes est similaire pour les conditionnements *T. suecica* et *C. calcitrans* : 27.3% et 27.9% respectivement (Figure 10B). Elle est plus importante avec I. *galbana* (32.4%). Cependant, les différences ne sont pas significatives ($p>0.05$).

III.5.b. Effet de la température de pré-incubation sur la phagocytose

Chez la palourde, on remarque qu'il n'a pas d'effet de l'alimentation sur la capacité de phagocytose des hémocytes pour chacune des températures de pré-incubation (ANOVA, $p>0.05$). Cependant, la capacité de phagocytose des hémocytes des animaux nourris avec *T. suecica* est légèrement améliorée avec la pré-incubation (Figure 10A). Au contraire, on observe une perte de cette capacité pour les hémocytes des palourdes du conditionnement *C. calcitrans*.

Chez l'huître, pour chacun des régimes mono-spécifiques, on peut noter une diminution du pouvoir de phagocytose suite à une pré-incubation à 18°C ou 30°C (Figure 10B). La perte d'activité est plus importante pour les hémocytes des animaux ayant été nourris avec *T. suecica* et *C. calcitrans*. S'il n'y a pas de différences entre les conditionnements quand la mesure est immédiate (cf.§ précédent), l'analyse de variance révèle un effet significatif de la nutrition quand la mesure est faite après une pré-incubation à 18°C ($p<0.01$).

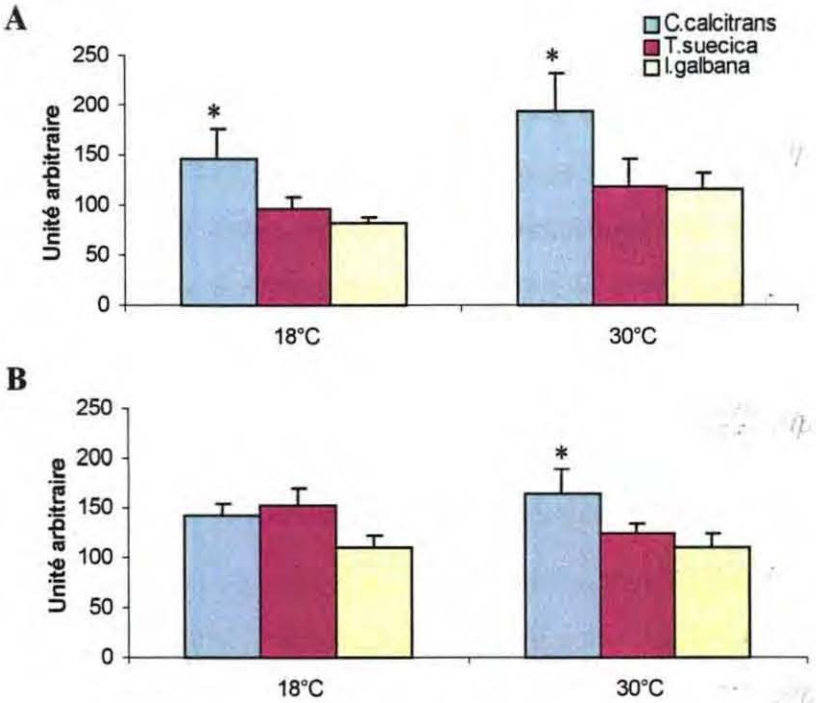


Figure 11 : Activité métabolique moyenne détectée dans les hémocytes de *T. philippinarum* (A) et *C. gigas* (B) à T_2 pour différentes températures de pré-incubation.

	18°C			30°C		
	C. calcitrans	***T. suecica***	***I. galbana***	***C. calcitrans***	***T. suecica***	***I. galbana***
Palourdes	1.1	1.5	1.0	2.0	3.3	3.3
Huîtres	8.2	8.6	9.4	10.6	10.4	11.5

Tableau 7 : Pourcentages moyens de non-adhésion des hémocytes de *T. philippinarum* et *C. gigas* à T_2 pour deux températures d'incubation 18°C et 30°C.

III.6. Production d'espèces actives de l'oxygène

III.6.a. Palourdes

L'activité métabolique des hémocytes de palourdes est différente selon le régime nutritif (Figure 11A). Ainsi, quelle que soit la température d'incubation, les hémocytes des animaux nourris avec *C. calcitrans* ont une meilleure activité métabolique (ANOVA, $p<0.001$). A 18°C, ils possèdent une intensité de 146 U.A alors que on trouve une intensité de 95 U.A et 83 U.A dans les hémocytes des animaux des régimes *T. suecica* et *I. galbana*.

On observe aussi un effet très net de la température sur l'activité des hémocytes ($p<0.001$). On mesure une plus forte activité pour les hémocytes incubés à 30°C. On a une augmentation de 48 U.A entre les intensité relevées dans les hémocytes du lot *C. calcitrans* pré-incubés à 18°C et 30°C. Pour les autres conditionnements, les augmentations d'intensités sont moins importantes: 23.7 U.A et 32.9 U.A avec *T. suecica* et *I. galbana*.

III.6.b. Huîtres

Sur la Figure 11B, un gradient d'intensité semble apparaître en fonction du régime alimentaire à 18°C comme à 30°C. A 18°C, les hémocytes du conditionnement *T. suecica* et *C. calcitrans* présentent les plus fortes intensités de fluorescence. A 30°C, on note une légère augmentation de l'intensité de fluorescence (activité métabolique) mesurée dans hémocytes du lot *C. calcitrans* (+22 U.A). Au contraire, les hémocytes des animaux nourris avec *T. suecica* ont perdu de l'activité (-29.5 U.A). Enfin, la température d'incubation n' a pas d'effet avec *I. galbana*. L'analyse de variance montre un effet très significatif du régime algal sur l'activité métabolique des cellules ($p<0.001$) mais aucun effet de la température d'incubation.

III.7. Adhésion

La mesure de la capacité d'adhésion des hémocytes se réalise par différence entre les comptages d'hémocytes dans le surnageant avant et après 3 heures d'incubation. Elle s'exprime en pourcentage d'hémocytes non-adhérés. Les pourcentages figurent dans le Tableau 7. Tout d'abord, on remarque qu'il existe des différences entre les espèces ($p<0.001$). Les pourcentages de non-adhésion sont beaucoup plus faibles chez la palourde. On a 1.2% en moyenne contre 8.7% chez l'huître. De plus, la perte de la capacité d'adhésion des hémocytes est plus importante à 30°C pour les deux espèces et quel que soit le conditionnement alimentaire. On observe des différences de 1.6% et 2.1% entre les valeurs des palourdes et des huîtres respectivement. Cet effet de la température est validé statistiquement pour chacune des espèces ($p<0.01$). Par contre, aucun effet du régime algal n'a été mis en évidence ($p>0.05$).

DISCUSSION

Notre étude s'inscrit dans un projet scientifique visant à comprendre les mortalités anormales du naissain d'huître. Le Laboratoire de Physiologie des invertébrés s'est orienté sur le rôle de l'alimentation des écloserie-nurseries sur la survie du naissain. Dans ce cadre, nous avons essayé de répondre à deux problématiques :

- sachant que l'alimentation influence la composition lipidique de différents organes au cours du développement des animaux (Soudant, 1995), est-ce qu'elle affecte également la composition membranaire des hémocytes ?
- si tel est le cas, quel en est l'impact sur les mécanismes de défense de ces organismes ?

I. SENSIBILITE AU CONDITIONNEMENT

A la fin de l'expérimentation, les animaux nourris avec *T. suecica* présentent les plus faibles indices de condition mais aussi les plus fortes mortalités. Ceci est probablement le reflet des carences en 20:5(n-3) et 22:6(n-3) de l'algue. Comme l'ont montré Fernández-Rieriz *et al.* (1999), la diminution de 22:6(n-3) dans l'algue a un effet négatif sur la croissance du naissain de *R. decussatus*. Cependant, toutes les espèce n'ont pas les mêmes besoins. Ainsi, *T. semidecussata* et *M. mercenaria* ont besoin de 22:6(n-3) alors que les huîtres *Crassostrea sp.* montrent des besoins fondamentaux en 20:5(n-3) (Helm & Laing, 1987). L'algue *I. galbana*, bien que riche en 22:6(n-3) et souvent utilisée pour favoriser la croissance des jeunes huîtres (Enright *et al.*, 1986 ; Langdon & Waldock, 1981), n'a pas permis le maintien de l'indice de condition des huîtres contrairement aux palourdes. Seul l'algue *C. calcitrans* a réellement permis une amélioration de l'indice de condition des huîtres. Par conséquent, l'indice de condition des huîtres semble plus sensible à la carence en 20:5(n-3) dans *I. galbana* et *T. suecica* ce qui peut se justifier par le rôle énergétique de cet acide gras et les besoins spécifiques de l'espèce (Delaunay, 1992 ; Soudant, 1995 ; Helm & Laing, 1987). En terme de mortalité, l'huître apparaît plus sensible aux régimes mono-spécifiques que la palourdes. Une meilleure filtration et ingestion de l'algue par les palourdes ou une meilleure résistance aux conditions expérimentales pourraient expliquer ces différences. Ces mortalités renforcent également la justification d'utiliser préférentiellement des régimes pluri-spécifiques dans les écloserie-nurseries (Robert *et al.*, 2001).

II. COMPOSITION LIPIDIQUE DES MEMBRANES ET SENSIBILITE A LA NUTRITION

Au début de l'expérimentation, nous pouvons constater pour les deux espèces et les deux tissus analysés des caractéristiques de composition lipidique assez semblables avec une dominance des lipides polaires. L'absence d'un rôle de réserve énergétique pour ces tissus peut expliquer la faible proportion de lipides neutres. La fraction de lipides polaires est principalement constituée d'acides gras poly-insaturés

Tissus	Acides gras	*C. calcitrans*	*T. suecica*	*I. galbana*
Hémocytes de palourdes	22:6(n-3)	**-57.06**	-34.77	-5.90
	20:5(n-3)	65.82	-4.29	-75.24
	20:4(n-6)	98.39	27.30	**-4.62**
	22:5(n-6)	-35.44	-4.36	398.15
Hémocytes d'huître	22:6(n-3)	-74.39	-58.84	-6.76
	20:5(n-3)	-11.07	-38.80	**-51.74**
	20:4(n-6)	31.99	-21.23	-21.92
	22:5(n-6)	**129.99**	**174.04**	**405.20**
Branchies de palourdes	22:6(n-3)	-57.66	-41.33	-18.34
	20:5(n-3)	53.92	-18.58	-76.98
	20:4(n-6)	49.61	8.31	-14.17
	22:5(n-6)	-33.82	5.25	294.30
Branchies d'huître	22:6(n-3)	-56.35	-17.96	9.08
	20:5(n-3)	1.53	-27.60	-68.51
	20:4(n-6)	33.89	-4.12	-20.49
	22:5(n-6)	-64.13	167.23	543.84

Tableau 8: Indice de sensibilité des membranes des différents tissus pour les quatre acides gras essentiels de *R. philippinarum* et *C. gigas* à T_2.

avec en moyenne 58% dans les branchies des deux espèces et, 60% dans les hémocytes d'huîtres contre 54% pour les palourdes.

Les analyses en acides gras réalisées sur les hémocytes et les branchies des deux espèces permettent de mettre en évidence des compositions lipidiques particulières. En effet, à T_0, les membranes des palourdes présentent une faible proportion de 20:5(n-3) comparée à celles des huîtres. On observe 6.7% de 20:5(n-3) dans les hémocytes de palourdes contre 20.2% pour les huîtres. Ces proportions sont *a priori* en accord avec celles trouvées dans la littérature pour d'autres organes (Soudant *et al.*, 1999 et 2000a ; Fernández-Rieriz *et al.*, 1999). Elles reflètent sûrement une caractéristique intrinsèque de l'espèce plus ou moins modulée par les conditions trophiques du milieu d'origine des animaux.

Au cours du conditionnement, le marquage de la composition algale se répercute sur les proportions de certains acides gras essentiels : le 22:6(n-3), le 20:5(n-3), le 20:4(n-6) et le 22:5(n-6). Ainsi, la déficience en 22:6(n-3) dans l'algue *C. calcitrans* induit une diminution de cet acide gras dans la composition des membranes. Au contraire, l'apport en 20:5(n-3) et 20:4(n-6) permet de maintenir voire d'augmenter les proportions de ces deux acides gras. De même, avec l'algue *I. galbana*, le 22:6(n-3) est maintenu dans les membranes alors qu'une forte augmentation en 22:5(n-6) et une perte importante de 20:5(n-3) sont observées. L'algue *T. suecica* marque les compositions lipidiques différemment. On a une baisse du 22:6(n-3) et un maintien voire une légère baisse des autres acides gras : 20:5(n-3), 20:4(n-6) et le 22:5(n-6). Ce marquage est en adéquation avec les observations faites par d'autres auteurs sur des tissus différents et larves (Soudant *et al.*, 1999 ; Berntsson *et al.*, 1997). Au final, la composition membranaire des hémocytes et des branchies a été modifiée par les régimes, et elle est différente de la composition initiale. Ce marquage a été assez rapide. Dès T_1, le profil des acides gras des membranes est changé significativement avec le régime nutritif, notamment dans les branchies. Un mois d'imprégnation est donc suffisant pour mettre en évidence un marquage lipidique. Cette durée correspond à celle observée par Soudant *et al.* (2000b) pour du naissain d'huître.

Toutefois, si les évolutions des acides gras sont similaires dans les hémocytes de palourdes et d'huîtres, les deux espèces présentent une sensibilité différente aux régimes mono-spécifiques. Cette sensibilité peut se mesurer par la différence de proportion entre T_2 et T_0 pour chaque acide gras essentiel pondérée par la proportion initiale de l'acide gras. De cet indice de sensibilité, on déduit que les hémocytes de palourde sauvegardent mieux les acides gras déficients dans la nourriture surtout le 22:6(n-3) et le 20:4(n-6) (Tableau 8). Mais en même temps, ils accumulent les acides gras majoritaires de l'algue notamment le 20:5(n-3) et le 20:4(n-6) avec le régime *C. calcitrans*. Chez l'huître, les hémocytes sauvegardent mieux le 20:5(n-3) et le 22:5(n-6). La proportion de ce dernier a augmenté dans tous les conditionnements même lorsque l'algue en est déficiente. Pour le 20:5(n-3), la proportion dans les membranes des hémocytes d'huître semble atteindre un plateau puisqu'elles n'arrivent pas à en incorporer plus même quand l'algue en apporte en grande quantité (28.6%). Ces différences de rétention des acides gras entre les espèces peuvent s'expliquer par les taux initiaux de chacun des acides gras dans les

membranes des hémocytes mais aussi par des besoins différents. Ces résultats confirment ceux de Helm & Laing (1987) et Fernández-Reiriz *et al.* (1998). Ces auteurs ont montré que *C. gigas* présente un besoin marqué en 20:5(n-3) alors que *R. decussatus* requière du 22:6(n-3).

Dans notre étude, on remarque aussi une différence de composition entre les deux tissus : hémocytes et branchies. Les deux espèces ne régulent pas de la même façon ces tissus. En effet, quel que soit le régime algal, la palourde maintient des niveaux en 22:6(n-3), 20:5(n-3) et en 22:5(n-6) similaires dans les membranes des hémocytes et de branchies. Au contraire, les hémocytes d'huîtres en comparaison avec les branchies sauvegardent moins bien leur 22:6(n-3) et 20:5(n-3). Ces différences de réponses entre les tissus ne semblent pas contradictoires avec les études de Soudant *et al.* (1999). Ces auteurs ont montré que la gonade de *C. gigas* s'enrichit en AGPI et particulièrement en 20:5(n-3) pendant la gamétogenèse ce qui correspond à l'accumulation de lipides dans les ovocytes. Pendant la même période, la composition en acides gras du muscle ne varie pas. Les changements de composition membranaire dépendent certainement de la fonction et du turn-over des cellules du tissu.

Face à notre problématique, on peut envisager l'utilisation des branchies comme marqueur de l'impact alimentaire. En effet, il existe des corrélations significatives entre les compositions lipidiques des deux tissus pour les deux espèces (R^2 varie de 0.94 à 0.76 et $p<0.01$pour la palourde ; R^2 varie de 0.83 à 0.50 et $p<0.05$ pour l'huître). Ainsi, on évite une analyse lourde et délicate des hémocytes (prélèvements, volume d'hémolymphe recueilli chez le naissain, seuil de détection). Cependant, il convient de ne pas oublier l'existence des différences de composition entre les membranes, notamment pour la proportion de 20:5(n-3) dans les huîtres.

Au terme de l'expérimentation de nutrition, les hémocytes des deux espèces ont des compositions membranaires qui ont été modifiées par le régime algal. On obtient six profils d'acides gras particuliers qui sont peut-être responsables de réponses immunitaires spécifiques. C'est ce que nous étudierons dans la dernière partie de cette discussion.

III. REPONSES DES MECANISMES DE DEFENSE A LA NUTRITION

Au cours de l'expérimentation, la concentration hémocytaire des huîtres est restée relativement constante quel que soit le régime nutritif. Au contraire, pour les palourdes, les concentrations augmentent de T_1 à T_2 pour chaque conditionnement et elles sont plus élevées avec le régime *C. calcitrans*. Cependant, nos valeurs restent plus faibles que celles rencontrées dans la littérature (Oubella *et al.*, 1996 ; Allam & Paillard, 1998 ; La Peyre *et al.*, 1995). Ceci reflète peut-être une réponse à un stress physiologique lié au conditionnement (Oubella *et al.*, 1993). En effet, ces auteurs ont montré une diminution des concentrations hémocytaires avec le jeun. Ce résultat confirme que les besoins nutritifs des palourdes n'ont pas été pleinement satisfaits au cours de notre expérimentation. De même pour les huîtres. En ce qui concerne la viabilité des cellules, les taux de cellules dégradées ou mortes restent

faibles dans les échantillons d'hémolymphe d'huître ou de palourde (<5%). Cette viabilité est la garantie de la validité des mesures plus physiologiques telles que la phagocytose et l'« oxidative burst » (Xue, 1998).

Les hémocytes d'huître et de palourde présentent des caractéristiques morphologiques différentes en cytomètrie en flux. En effet, les hémocytes de palourde sont en moyenne plus denses et plus gros quel que soit le régime nutritionnel en comparaison des hémocytes d'huître. Nos valeurs relatives de taille et de densité des hémocytes ne peuvent être directement comparées avec celles de la littérature basées sur des études microscopiques (Xue, 1998). Les travaux de Xue (1998) montrent une absence de corrélation significative entre les résultats obtenus par cytomètrie en flux et ceux obtenus par microscopie photonique.

Beaucoup de recherches scientifiques ont contribué à l'identification et la classification des hémocytes de bivalves (Cheng, 1996 ; Auffret, 1988 ; McCornick-Ray & Howard, 1991 ; Xue, 1998 ; Ford & Alcox, 1993 ; Ashton-Alcox & Ford, 1998). Quoique divers types d'hémocytes aient été identifiés, les auteurs s'accordent sur l'existence des deux principales sous-populations : les granulocytes et les hyalinocytes. Dans notre étude, l'analyse des cytogrammes obtenus pour l'huître nous a permis de faire la distinction entre les différentes sous-populations hémocytaires. Les échantillons hémolymphatiques sont constitués de 70% de hyalinocytes et petits agranulocytes, 18% de granulocytes et 12% de cellules indéterminées. Ces proportions sont du même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature (Chagot, 1989 ; Ford & Alcox, 1993). Pour la palourde, les granulocytes et les hyalinocytes ne se distinguent pas suffisamment sur les cytogrammes pour permettre leur typage. Cependant, on peut entrevoir les deux grandes sous-populations ce qui est en accord avec les études de Allam & Paillard (1998) et Oubella *et al.* (1996). D'après ces auteurs, les granulocytes et les hyalinocytes représentent plus de 95% de la population hémocytaires avec 39% de granulocytes. Ce dernier pourcentage indique que l'hémolymphe de palourde est plus riche en granulocytes par rapport aux huîtres. Or, Foley & Cheng (1975) ont montré que les granulocytes étaient les cellules les plus actives. Néanmoins, les différences de constitution hémocytaire entre les espèces ne semblent pas entraîner des réponses immunitaires plus importantes chez les palourdes que ce soit pour la phagocytose ou l'activité métabolique des hémocytes.

Dans notre étude, les valeurs de phagocytose sont du même ordre de grandeur que celles trouvées par Cima *et al.* (2000) pour la palourde et celles de Xue (1998) pour l'huître. De plus, nous avons mis en évidence une différence significative de capacité de phagocytose des hémocytes de palourdes selon le régime nutritif quand l'analyse est faite immédiatement. Les hémocytes des palourdes nourries avec *C. calcitrans* sont les plus actifs (21.7%). Pour les deux autres conditionnements, on note des taux de phagocytose inférieurs à 15%. Dans les mêmes conditions d'analyses, le pouvoir de phagocytose des hémocytes d'huître est similaire quelle que soit le régime algal (29.2% en moyenne). Cependant, lorsque les hémocytes subissent une pré-incubation de deux heures à 18°C ou 30°C, on observe une perte

significative de leur capacité de phagocytose et un effet de l'alimentation apparaît. Les huîtres nourries avec *I. galbana* présentent le taux de phagocytose le plus élevé.

Nous avons aussi mesuré la vitalité des cellules -capacité métabolique- et la production d'espèces actives de l'oxygène (« Oxidative burst ») par la détection des produits de l'oxydation du DCFH-DA. Pour la mesure de la vitalité des hémocytes de palourde, les animaux nourris avec *C. calcitrans* présentent la plus forte activité quel que soit la température d'incubation. On observe le même résultat pour les hémocytes d'huîtres à 30°C. Pour l'«oxydative burst », l'oxydation du DCFH-DA mesurée dans les hémocytes n'a pu être stimulée par le PMA ni dans les hémocytes de palourdes ni ceux des huîtres. Chez la palourde, l'absence d'«oxidative burst » était attendu (Lopez *et al.*, 1994). Par contre pour l'huître, ce phénomène a été mis en évidence via la chimioluminescence par Nakayama & Maruyama (1998), Arumugan *et al.* (2000) et Toreilles *et al.* (1996). Les résultats de notre étude *-a priori* contradictoires avec ceux de la littérature- confirment les observations de Xue (1998) en utilisant la même méthodologie. Il existe une grande variabilité de réponse chez les huîtres *O. edulis* et *C. gigas*. De plus, ils nous amènent à nous interroger sur le stress éventuellement engendré par le meulage des huîtres et la manipulation des animaux avant le prélèvement. En effet, les résultats de Lacoste *et al.* (2001) suggèrent que des huîtres stressées ont des capacités réduites de production d'espèces actives de l'oxygène.

IV. Relation entre l'immunologie et le marquage lipidique

De nombreuses études basées sur la relation entre l'immunologie et la nutrition chez les vertébrés ont permis de mettre en évidence que la composition et les fonctions des cellules du système immunitaire, étaient nettement influencées par la composition en acides gras de l'alimentation (De Pablo *et al.*, 2000 ; Peterson *et al.*, 1998 ; Jensky *et al.*, 1998 ; Sasaki *et al.*, 2000 ; Farndale *et al.*, 1999 ; Lingenfelser *et al.*, 1995). Chez les bivalves, aucune étude n'avait encore été réalisée pour montrer l'existence de la relation entre les variations en acides gras des membranes et les réponses immunitaires. Nos résultats permettent d'apporter les premiers éléments.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une meilleure réponse immunitaire pour les hémocytes des palourdes nourries avec *C. calcitrans* tant au niveau des concentrations cellulaires que des réponses biologiques (phagocytose et vitalité). Ces animaux possèdent une composition lipidique qui s'est enrichie en 20:5(n-3), 20:4(n-6) et appauvrie en 22:6(n-3) au cours de l'expérimentation. Ce changement de composition lipidique avec l'alimentation a eu des répercussions sur le fonctionnement du système immunitaire des palourdes puisqu'il existe des corrélations positives entre les taux de 20:5(n-3) et de 20:4(n-6) à T_2 et les paramètres immunologiques testés : la phagocytose et l'activité métabolique (R^2 varient de 0.92 à 0.77 et $p<0.05$). Chez les huîtres, la corrélation entre la composition lipidique des hémocytes et les réponses immunitaires est plus délicate. En effet, les hémocytes du conditionnement *C. calcitrans* présentent une plus forte activité métabolique avec une incubation à 30°C. Mais pour la phagocytose, ce sont les hémocytes de *I. galbana* qui ont le mieux réagi au stress d'une pré-incubation

bien qu'aucune différence n'est été observée sans pré-incubation. Les taux de phagocytose sont corrélés positivement avec le 22:6(n-3) (R^2=0.86, $p<0.001$) et négativement avec le 20:5(n-3) (R^2=0.27, $p>0.05$). Les différences de réponses de la phagocytose face au changement d'alimentation observées chez l'huître pourraient être espèce-spécifique (meilleure régulation du niveau de 20:5(n-3)) ou le résultat du stress physiologique révélé par les forts taux de mortalités. En effet, le mauvais « état physiologique » des huîtres pourrait avoir masqué en partie l'effet du changement de composition des membranes sur le système immunitaire. La corrélation positive du 22:6(n-3) avec la phagocytose des huîtres après pré-incubation pourrait aussi s'expliquer par l'effet positif du 22:6(n-3) dans la réponse aux stress déjà démontré chez les larves de poissons et de bivalves (Kanazawa, 1995 ; Utting & Millican, 1995).

De façon plus générale, les résultats de vitalité obtenus avec *C. calcitrans* pour les deux espèces et ceux de phagocytose pour la palourde semblent confirmer ceux de nombreux auteurs qui ont associé un rôle immunosuppresseur au AGPI de la série (n-3) chez les vertébrés notamment pour le 22:6(n-3) (Sasaki *et al.*, 2000 ; Peterson *et al.*, 1998 ; De Pablo *et al.*, 1998 ; Sanderson *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1998). Un effet opposé est observé pour les AGPI de la série (n-6) (Lingerfelser *et al.*, 1995, Jeffery *et al.*, 2000). Ceci peut expliquer la corrélation positive du 20:4(n-6) -précurseurs des leucotriènes et des prostaglandines- dans les paramètres immunitaires mesurés chez la palourde. La corrélation positive de la vitalité des cellules avec le 20:5(n-3) pourrait également s'expliquer se justifier par le rôle énergétique supposé de cet acide gras chez les bivalves ($p<0.05$) (Delaunay, 1992 ; Soudant, 1995).

En conclusion, notre étude a permis de montrer que la composition lipidique des hémocytes est influencée par un régime algal mono-spécifique, et que ces changements affectent les réponses immunitaires pour les deux espèces. Cependant, face à la difficulté de distinguer l'effet du 20:5(n-3) et du 22:6(n-3) sur les mécanismes de défenses des huîtres, on peut se demander si le gradient de composition lipidique des algues ou celui obtenu à la fin de l'expérimentation est suffisant pour séparer les effets de ces acides gras.

PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la composition membranaire des hémocytes peut être modulée par la qualité lipidique du régime algal et que ces changements affectent la fonctions de défense des hémocytes. Mais d'autres analyses seront encore nécessaires pour bien comprendre cette influence.

Au terme de cette étude, il serait maintenant intéressant de :

- Vérifier que la composition lipidique telle qu'elle est décrite dans ce mémoire (c'est-à-dire la fraction polaire des échantillons) corresponde à la composition réelle des membranes. La mise en évidence d'une telle corrélation demande au préalable de mettre au point une technique de purification de membranes des hémocytes.

- Mettre au point de nouveaux protocoles expérimentaux pour les analyses immunologiques de façon à utiliser ensuite les plus spécifiques au système immunitaire de chacune des deux espèces.

- Faire de nouvelles expérimentations à l'aide d'aliments artificiels ce qui permet un apport individuel pour chaque acide gras. On pourra ainsi distinguer précisément l'effet de chaque acide gras sur le système immunitaire de ces bivalves.

- Tester le système de défense des animaux *in vivo* et *in vitro* par des challenges bactériens ou par des conditions environnementales stressantes préalablement définies (température, salinité ,hypoxie..) .

BIBLIOGRAPHIE

Albentosa, M., Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M.J. & Pérez-Camacho, A., 1996a. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A, 113 n°2: 113-119

Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U. & Fernandez-Reiriz, M.J., 1996b. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 148: 11-23

Allam, B. & Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33: 123-128

Arumugan, M., Romestand, B. & Toreilles, J., 2000. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources.*, 13: 173-177

Ashton-Alcox, K.A. & Ford, S.E., 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue and cell*, 30(2): 195-204

Auffret, M., 1988. Bivalve hemocytes morphology. *American Fish. Society, Special Publication*, 18: 169-177

Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.Å. & Carlsson A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 154: 139-153

Chagot, D., 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vivo* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). *Thèse du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.*

Cheng, T., 1996. Hemocytes: Forms and functions in "The eastern oyster *Crassostrea virginica*" (eds R.I.E Newel, V.S. Kennedy and A.F. Eble) *Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland* pp 299-334

Chu, F.-L.E., 1997. Defense mechanisms of marine bivalves. *Cours du Virginia Institute of Marine Science*

Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G. & Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish and Shelfish immunology*, 10: 677-693

Delaunay, F., 1992. Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire. *Thèse de doctorat, Université de Bretagne occidentale*, France, p 201

De Pablo, M.A., Puertollano, M.A. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2000. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29: 323-328

Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. & Castell, J.D., 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile oyster *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96:1-13

Farndale, B.M., Bell, J.G., Bruce, M. P., Bromage, N.R. , Oyen, F., Zanuy, S. & Sargent, J.R., 1999. Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid compositions and plasma eicosanoid concentrations in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179: 335-350

Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. & Pérez-Camacho, A., 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B, 124: 309-318

Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. & Pérez-Camacho, A., 1998. Effect of microalgal diets and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *ruditapes decussatus* spat. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A, 119: 369-377

Fisher, W.S., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes in "Immunity in invertebrates". *Springer Verlag, Heidelberg*, pp 25-35

Foley, D.A. & Cheng, T.C., 1975. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25: 189-197

Ford, S.E. & Alcox, K.A., 1993. A comparison of methods for identifying molluscan hemocytes. *Journal of Shellfish Research*, 12, p 154

Ford, S.E., and Tripp, M.R., 1996. Disease and defense mechanisms in "The eastern oyster *Crassostrea virginica*" (eds R.I.E Newel, V.S. Kennedy and A.F. Eble) *Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland* pp 581-660

Helm, M.M. & Laing, I., 1987. Preliminary observations on the nutritional value of *Tahiti Isochrysis* to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62: 281-288

Jeffery, N.M., Sanderson, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 1997. Effects of varying the type of saturated fatty acid in the rat diet upon serum lipid levels and spleen lymphocyte functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1345: 223-236

Jensky, L.J., Scherer, J.M., Caldwell, LD.D., Ney, V.A. & Stillwell, W., 1998. The triggering signal dictates the effect of docosahexaenoic acid on lymphocyte function *in vitro*. *Lipids*, 33: 869-878

Kanazawa, A., 1995. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish larvae. *In: Larvi'95-Fish and shellfish larviculture symposium.* Eds. P. Lavens, E. Jaspers & I. Roelants. European Aquaculture Society, Special publication n° 24, Gent, Belgium

La Peyre, J.F., Chu, F.-L.E. & Meyers, J.M., 1995. Haemocytic and humoral activities of eastern oyster and Pacific oyster following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish and shellfish Immunology*, 5: 179-190

Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A. & Poulet, S.A., 2001. Noradrenaline modulates hemocytes reactive oxygen species production via β-adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 285-289

Langdon, C.J. & Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of Marine Biology Association UK*, 62: 431-448

Lawrence, D.R. Scott, G.I., 1982. The determination and use of condition index of oyster. *Estuaries*, 5(1): 23-27

Lin, E., Kotani, J.G. & Lowry, S.F., 1998. Nutritional modulation of immunity and the inflammatory response. *Nutrition*, 14: 545-550

Lingenfelser, J.T., Blazer, V.S. & Gay, J., 1995. Influence of fish oils in production catfish feeds on selected disease resistance factors. *Journal of Applied Aquaculture*, 5: 37-48

Lopez, C., Villalba, A. & Bachère, E., 1994. Absence of generation of active oxygen radicals by the hémocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) coupled with phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 188-192

Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. & Samain, J.F., 1992. Change in the fatty acid composition of *Pecten Maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Ecology*, 163: 221-234

McCormick-Ray, M.G. & Howard, T., 1991. Morpholgy and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58: 219-230

Nakayama, K. & Maruyama, T., 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 22 n°2: 151-159

Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C. & Auffret, M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Resources*, 9: 137-143

Oubella, R., Maes, P., Paillard, C. & Auffret, M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 15: 193-197

Perterson, L.D., Jeffery, N.M., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 1998. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocytes fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids*, 33 n° 2: 171-180

Robert, R., Parisi, G., Rodolfi, L., Poli, B.M. & Tredici, M.R., 2001. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 192: 333-346

Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125-145

Sanderson, P., Yaqoob, P. & Calder, P.C., 1995. Effects of dietary lipid manipulation upon graft vs host and host vs graft responses in the rat. *Cell Immunology*, 164: 240-247

Sasaki, T., Kanhe, Y., Kudoh, K., Nagahashi, M., Toyokawa, M., Matsuda, M., Shimizu, J. & Takita, T., 2000. Dietary n-3 polyunsatured fatty acid and status of immunocompetent cells involved in innate immunity in female rats. *Annual Nutrition Metabolism*, 44: 33-42

Soudant, P., Chu, F.-L.E. & Samain, J.F., 2000a. Lipids requirements in some economically important marine bivalves. *Journal of Shellfish Resources*, Vol 19, p 605

Soudant, P., Sanles, M.V., Quéré, C., Le Coz, J.R., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. & Sorgeloos, P., 2000b. The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 184: 315-326

Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. & Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B, 123: 209-222

Soudant, P., 1995. Les phospholipides et les stérols des géniteurs et des larves de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. *Thèse de doctorat de l'université de Brest*, France, pp 294

Toreilles, J., Guérin, C. & Roch, P., 1996. Espèces oxygénées réactives et système de défense des bivalves marins. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences Paris, Sciences de la vie/life sciences*, 319: 209-218

Utting, S.D. & Millican, P.F., 1995. Techniques for the hatchery conditioning of bivalves broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval quality. *In: Larvi'95-Fish and shellfish larviculture symposium.* Eds. P. Lavens, E. Jaspers & I. Roelants. European Aquaculture Society, Special publication n° 24, Gent, Belgium

Xue, Q., 1998. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer. pp 323

ANNEXES

ANNEXES DU MATERIEL ET METHODE

Annexe I.A : Représentation schématique du prélèvement d'hémolymphe chez l'huître *C. gigas*

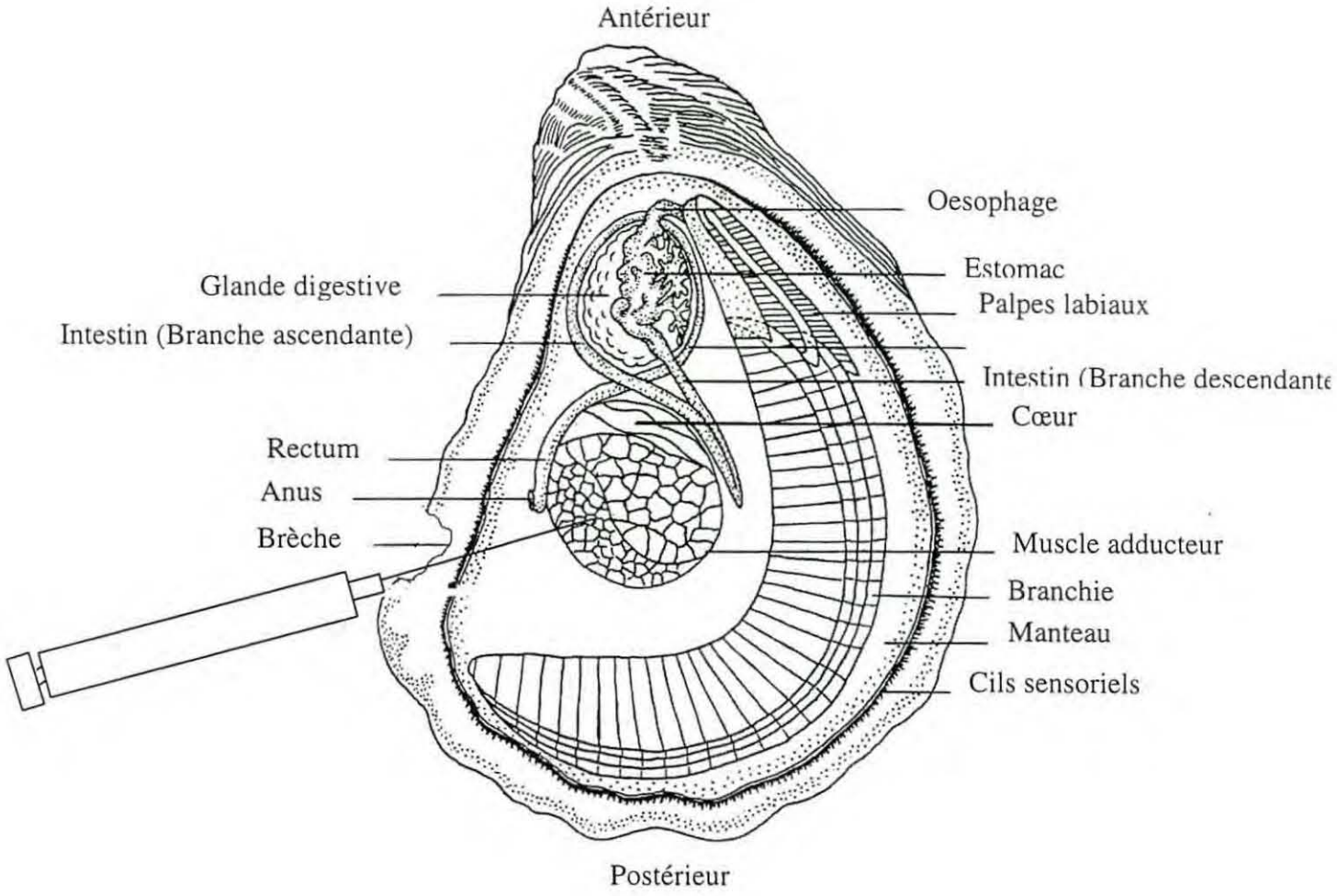
Annexe I.B : Protocole détaillé pour les analyses lipidiques

Annexe I.C : Protocole détaillé pour les analyses immunologiques

Annexe I.D : Référence des produits et matériel utilisé pour les analyses lipidiques et immunologiques

ANNEXE DES RESULTATS

Annexe II. : Pourcentages de phagocytose des hémocytes d'huître et de palourde à T_0 et T_1



ANNEXE I.A. : Représentation schématique du prélèvement d'hémolymphe chez *C. gigas* (huître ouverte).

ANNEXE I.B : PROTOCOLE EXPERIMENTAL DES ANALYSES LIPIDIQUES

I- EXTRACTIONS LIPIDIQUES

A - DES HEMOCYTES

- Collecter 4 ml d'hemolymphe dans tube 10 ml (brulé à 450°C avec capsules TEPLON)
- Filtrer chaque échantillon au travers d'une maille de 53 µm
- Centrifuger à 1500 tr/min
- Transférer le surnageant dans un tube à hémolyse gradué et congeler à –20°C
- Enlever le maximum de sérum résiduel
- Additionner 2ml de mélange Folch $CHCl_3$-MeOH (2:1) et passer à l'ultrason
- Ajouter de l'azote pour évacuer l'air, fermer le tube et stocker à –20°C.

B - DES BRANCHIES

=FOLCH simplifié

- Peser 200-300 mg de poids frais dans tube 10 ml (brulé à 450°C avec capsules TEPLON)
- Ajouter 6 ml de Folch $CHCl_3$-MeOH (2:1)
- Broyer à l'ultraturax en maintenant le tube dans la glace
- Insister jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène (sans morceaux)
- Centrifuger 10 min à 1500tr/min
- Transférer le surnageant dans tube 8 ml (brulé à 450°C)
- Ajouter de l'azote pour évacuer l'air, fermer le tube et stocker à –20°C.

II- MICRO-COLONNES

A - PREPARATION DE LA SILICE

- Brûler au four à 450°C de la silice pendant 4h (à 450°C)
- Rajouter 6% d'eau (en poids) pour désactiver légèrement.
- Homogénéiser environ 12h. La composition reste constante très longtemps.

B - PREPARATION DE LA MICRO-COLONNE

- Mettre un petit morceau de laine de verre brulée à 450° dans une pipette Pasteur brûlée à 450°C
- Remplir sur 3-5cm par de la silice
- Vibrer pour tasser à l'aide d'une spatule vibrante.

C - SEPARATION DES LIPIDES NEUTRES ET POLAIRES

- Evaporer la totalité ou une partie de l'échantillon (1ml d'extrait de branchies)
- Reprendre par 3 x 500 µl de $CHCL_3$/MeOH (98:2)
- Déposer en tête de colonne
- Eluer les lipides neutres (LN) avec 10 ml de $CHCL_3$/MeOH (98:2, fraction A)
- Eluer les lipides polaires (LP) par 15 ml de MeOH (fraction B).

Les fractions sont recueillies dans des grands tubes dans lesquels on a ajouté 2.3 µg de C23:0 : Acide gras utilisé comme standard interne.

ANNEXE I.B : PROTOCOLE EXPERIMENTAL DES ANALYSES LIPIDIQUES suite 1

III- TRANSESTERIFICATION

A - PHASE D'ÉVAPORATION

- Evaporer à sec les échantillons puis les reprendre dans 2 ml de Folch, garder 1 ml de l'extrait dans un tube à chromacol sous azote au –20°C et transvaser le reste dans un tube Wheaton (8ml).

B - PHASE D'ESTERIFICATION

- Evaporer à sec la totalité de l'échantillon du tube Wheaton
- Ajouter 1 ml de BF3-Methanol (10%)
- Chauffer 10 min à 95-100°C.

C - PHASE DE RECUPERATION DES MEAG

- Après refroidissement, ajouter 1 ml d'hexane et 1 d'eau milliQ.
- Agiter vigoureusement au moins 2 min
- Centrifuger 1000-2000 tr/min pendant 5 min (tester la résistance des tubes avant)
- Eliminer la phase inférieure (MeOH+Eau) (en laisser un peu pour éviter d'embarquer l'hexane)
- Ajouter 1 ml d'eau milliQ
- Agiter vigoureusement au moins 2 min
- Centrifuger 1000-2000 tr/min pendant 5 min
- Eliminer la phase inférieure (en laisser un peu)
- Stocker à -20°C pendant la nuit ou au moins 4-5 heures.
- Le lendemain, le reste d'eau doit être congelée. Dans le cas contraire, re-éditer le nettoyage à l'eau milliQ.
- Récupérer rapidement (avant la fonte de la glace) la phase supérieure (hexane) et transférer la dans un tube chromacol.

IV- PURIFICATION EN HPLC

A - PREPARATIONS DES ECHANTILLONS

- Evaporer à sec les échantillons issus de la trans-estérification
- Remettre en suspension avec 200 µl d'hexane.

B - INJECTION ET RECUPERATION

- Injecter l'échantillon dans le système HPLC
- Lancer la pompe pour que le système soit prêt à démarrer à la fin de la deuxième injection
- Rincer le tube avec 200 µl d'hexane puis injecter les 200 µl dans le système (total : 400 µl injecté)
- Lancer HPLC et récupérer la fraction MEAG.

Les MEAG sont collectés entre 6 min et 13 min.

Programmation de la séparation ('step gradient') :

Temps	Solvant A	Solvant B
0.1	100	0
0.2	85	15
3.9	85	15
4.0	50	50
8.9	50	50
9.0	100	0
35	100	0
Stop flow		

Rmque : faire tourner le système une fois à vide avant de faire la purification des échantillons

V- CHROMAOGRAPHIE GAZEUSE

- Evaporer à sec les différents échantillons de MEAG issus de HPLC
- Reprendre avec 1 ml d'hexane pour les branchies, les algues et 200 µl pour les hémocytes
- Transférer dans un tube à Chromatographie en phase gazeuse
- Lancer le chromatographe
- Dépouiller les chromatogrammes et analyser les données.

ANNEXE I.C : PROTOCOLE EXPERIMENTAL DES ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

PREPARATION DE LA SAAH

100 ml de Tampon phosphate à 100 mM (pH=7.4)
2.5 g de NaCl (2.5%)
1.5 g d'EDTA (1.5%)
Ajuster le pH à 7.4.
L'osmolarité finale est de 1100 mOsmol

ANALYSES REALISEES AU POINT T_0 ET T_1

A - PRELEVEMENTS

- Collecter 2 à 3 ml l'hémolymphe à l'aide d'une seringue de 1ml (selon les analyses à réaliser)
- Stocker les prélèvements en pool dans des tubes de 10 ml maintenus dans de la glace
- Retirer l'aiguille avant le transfert pour minimiser l'agrégation des hémocytes.

B - VIABILITE

- Filtrer 150µl de SAAH au travers d'une maille de 80 µm
- Ajouter 150µl d'hémolymphe
- Remettre les tubes dans la glace
- Ajouter l'IP 10 min avant l'analyse
- Analyser en cytométrie en flux le plus rapidement possible.

C - PHAGOCYTOSE

- Préparer pour chaque pool 3 puits de la micro-plaque comme suit :

  Test : 100 µl d'EMSF + 50 µl de billes + 150 µl d'hémolymphe
  Contrôle : 100 µl d'EMSF + 50 µl de billes + 150 µl d'hémolymphe + 6 µl de cytochalasine B
  Témoin : 100 µl d'EMSF + 150 µl d'hémolymphe

- Laisser incuber 1 heure
- Retirer le surnageant
- Rincer les hémocytes avec de EMSF (Eau de Mer Stérile Filtrée) pour éliminer les billes non fixées
- Ajouter 100 µl de trypsine dans chaque puits pour décoller les cellules
- Passer au vortex lentement
- Ajouter 1 ml de Formol 0.3%
- Récupérer chaque échantillon et le placer dans un tubes à cytométrie
- Analyser au cytomètre en flux

ANNEXE I.C : PROTOCOLE EXPERIMENTAL DES ANALYSES IMMUNOLOGIQUES suite 1

ANALYSES REALISEES AU POINT T_2

A - PRELEVEMENT

- Prélever l'hémolymphe à l'aide d'une seringue de 1ml
- Stocker individuellement les prélèvements dans des eppendorfs (1.5 ml) maintenus dans la glace
- Retirer l'aiguille avant le transfert pour minimiser l'agrégation des hémocytes
- Constituer des 3 pools de 2 ml juste avant l'incubation.
- Fixer 150µl de chaque pool avec 150 µl de formol 6%.

B - VIABILITE

- Préparer 3 tubes eppendorf pour chaque pool avec :

  150µl d'hémolymphe + 150µl SAAH (préalablement filtrée)

- Maintenir les tubes dans de la glace
- Incuber 0 min (1 tube)
- Incuber 120 min à 18°C et à 30°C (2 tubes).
- Remettre les tubes dans la glace.
- Ajouter l'IP 10 min avant l'analyse.
- Analyser par cytométrie en flux le plus rapidement possible.

C - "OXIDATIVE BURST"

- Préparer 2 x 2 tubes à cytométrie pour chaque pool avec :

  150µl d'hémolymphe + 150µl PMA (200 ng/mL) + 3µl DCFH-DA (10 mM)
  150µl d'hémolymphe + 150µl eau de mer stérile filtrée + 3µl DCFH-DA

- Maintenir les tubes dans la glace
- Incuber 20 min à 18°C et à 30°C
- Stopper la réaction en remettant les tubes dans la glace
- Analyser par cytométrie en flux le plus rapidement possible.

Faire un tube contrôle avec :
150µl EMSF + 150µl PMA (200 ng/ml) + 3µl DCFH-DA (10 mM)

D - PHAGOCYTOSE

- Préparer 3 x 2 tubes eppendorf pour chaque pool avec :

  100µl d'hémolymphe + 100µl eau de mer stérile filtrée
  100µl d'hémolymphe + 100µl EMSF + 3µL cytochalasine

- Maintenir dans la glace
- Incuber 0 min (2 tubes)
- Incuber 120 min à 18°C (2 tubes) et 30°C en agitant légèrement (2 tubes)
- Ajouter 30 µL de la suspension de billes (30µl solution stock dans 1500µl EMSF)
- Incuber 60 min à 18°C.
- Passer au vortex légèrement.
- Fixer les cellules an ajoutant 230µl de formol à 6%
- Passer au vortex légèrement.
- Analyser au cytomètre en flux.

Faire un tube contrôle avec :

300µl EMSF + 50µl de la suspension de billes.

E - ADHESION

- Déposer 150µl d'hémolymphe dans deux micro-plaques 24 puits pour chaque pool
- Incuber 3 heures l'une des micro-plaque à 18°C et l'autre à 30°C.
- Prélever le surnageant et le placer dans un tube à cytomètrie (filtration à 80 µm) et ajouter 150 µl de formol 6 %
- Analyser au cytomètre en flux.

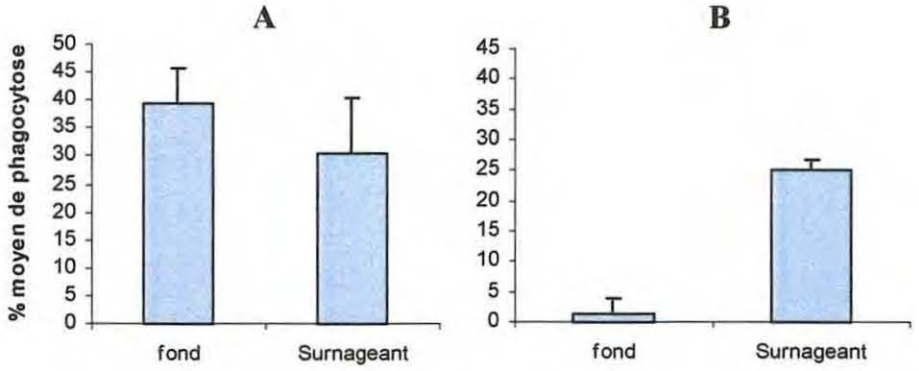
REFERENCES DU MATERIEL ET DES PRODUITS UTILISES

POUR LES ANALYSES LIPIDIQUES :

Chloroform Suprasolv, Merck, I677032
Methanol HPLC, SDS, 0933716
Silica gel, Kiegelgel 60, Merck, Art. 7734, 70-230 mesh ASTM
BF3-Methanol Supelco 3-3021
Hexane 95% HPLC, SDS, 0523721
Isopropanol HPLC, SDS, 0953716
Acétone pestipur, SDS, 0052221
Colonne de silice greffée OH Lichrosorb DIOL, 5µm, 25 cm x 0.4 cm ID, Merck
Colonne de cilice classique Lichrospher Si100, 5 µm, 25 cm x 0.4 cm ID, Merck
Intelligent pump L6200, Merck
UV-VIS Detector L4250, Merck-Hitachi
Fraction Collector FC203B, Gilson
Gas Chromatography System HP6890, Hewlett Packard

POUR LES ANALYSES IMMUNOLOGIQUES :

Iodure de Propidium, Sigma P 4170
Formol à 6%
SAAH dont la composition est détaillée dans l'annexe
Fluoresbrite microspheres YG 2.0 microns, Polysciences 18338
Cytochalasine B, Sigma C6762
Dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA), Sigma D6883
Phorbol myristate acetate (PMA), Sigma P8139
Trypsine, Sigma T 8003
Eau de mer stérile filtrée (EMSF)
Cytomètre de flux FACScalibur, Becton Dickinson



ANNEXE II. : Pourcentage moyen de phagocytose des hémocytes de *T. philippinarum* (A) et de *C. gigas* (B) à T_0.