

EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DU REGIME ALIMENTAIRE
SUR CERTAINS PARAMETRES DE L'IMMUNITE CELLULAIRE DU
LOUP DE MER EN ELEVAGE (1)

P. DESCHAUX (2), G. PÈRÈS (3)

RESUMÉ

Afin d'améliorer les conditions d'élevage du Loup de mer Dicentrarchus labrax, nous avons cherché à connaître la température optimale à laquelle ce poisson présente une réponse immune maximale. Nos études ont montré que la production d'anticorps et la réponse spontanément tueuse (NK) sont dépendantes de la température et que le maximum de ces réponses est obtenu lorsque les Loups sont élevés à 18°C. D'autre part, nous avons observé une réduction de la réponse T cytotoxique et une augmentation de la réponse NK lors d'un régime protéinoprive. L'étude de l'influence du jeûne total pendant 15 jours ne montre aucune variation significative de ces réponses cytotoxiques.

ABSTRACT

Our data showed that antibody response and NK cells activity of a teleostean fish Dicentrarchus labrax (Loup de mer) were maximal when animals were bred at a temperature equal to 18°C. A proteinoprive diet enhanced T cytotoxic response and diminished NK cell activity. A fast of 15 days had no effect on these two cellular responses.

MOTS - CLES : Immunité, Poisson, Température, Nutrition.

KEY WORDS : Immunity, Fish, Temperature, Nutrition.

INTRODUCTION

Tout élevage intensif de poissons exige la mise au point de conditions se rapprochant le plus possible de celles d'un environnement naturel adapté. L'élevage du Loup de mer, Dicentrarchus labrax, fait actuellement l'objet de nombreuses études. Notre travail s'inscrit dans cet objectif en étudiant l'influence des conditions thermiques et nutritionnelles sur la fonction immune. La

.....

1 - Ce travail a bénéficié de deux contrats CNEXO-CNRS.

2 - Laboratoire de Physiologie animale, Immunophysiologie générale et comparée, UER Sciences, Université de Limoges, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges (France).

3 - Institut Michel Pacha, laboratoire maritime de Physiologie de Tamaris sur Mer, 83500 La Seyne sur Mer (France).

meilleure connaissance de cette fonction peut permettre l'amélioration de la résistance des Loups d'élevage aux agressions extérieures.

Il a été démontré que la température d'élevage représente un facteur influençant la réponse immune des poissons. Aucune recherche immunologique n'a été réalisée chez le Loup de mer.

L'influence des conditions nutritionnelles sur l'immunité du poisson n'a jamais été étudiée mais bien démontrée par des observations cliniques et expérimentales chez l'Homme et l'Animal de laboratoire (Chandra 1980, Heresi et Chandra 1980).

Nous rapportons une étude sur l'influence de la température d'élevage (13, 18, 21°C) du jeûne et d'un régime appauvri en protéines sur la production d'anticorps et la réponse immune cytotoxique du Loup de mer en élevage.

MATERIELS ET METHODES

I - Animaux -

Nos expérimentations ont porté sur des Loups de mer, Dicentrarchus labrax, âgés d'un été (O⁺) pesant 80 g \pm 20.

2 - Conditions d'élevage hors expérimentations -

Les Loups sont élevés en semi-liberté dans des bassins de 2 m x 4 m à renouvellement permanent en eau de mer.

3 - Conditions d'élevage lors des expérimentations -

Température : Chaque lot expérimental est constitué de 60 poissons répartis en 3 bacs de 250 litres. L'acclimatation à la température expérimentale commence 4 semaines avant le début des expérimentations. Les températures expérimentales sont les suivantes 13°, 18° et 21°C.

Régime alimentaire : Pour ces expérimentations les Loups sont maintenus à 18°C dans les bassins de 250 litres et répartis comme précédemment.

- Influence du jeûne - Nous avons soumis les Loups à un jeûne de 15 jours. Après ce temps les animaux sont tués par fracture cervicale et leurs fonctions immunes étudiées.

- Influence d'un régime alimentaire appauvri en protéines - des granulés spéciaux de taux protéinique faible (20 p. cent) (Société SARB Pontanevaux) sont donnés aux Loups en remplacement des granulés normaux (taux de protéines 46 p. cent). Les animaux sont sacrifiés après 15, 45 ou 75 jours de régime.

4 - Etude des plages d'hémolyse -

La technique d'étude des cellules formant plage d'hémolyse a été détaillée antérieurement (Cordier et al. 1983). Nous la rappelons brièvement :

Les poissons sont immunisés (injection intracoelomique de 0,2 ml d'une suspension de globules rouges de mouton à 11 p. cent) le dernier jour du traitement. Un lot d'animaux "témoins" n'est pas immunisé et reçoit 0,2 ml d'une solution saline physiologique (NaCl 9 p. mille).

Les Loups sont sacrifiés 14 jours après l'immunisation, les rates prélevées stérilement dans une solution de BSS, les lymphocytes isolés et ajustés à une concentration de $30 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Dans un tube à hémolyse contenant 0,4 ml d'agarose (0,6 p. cent) on ajoute 0,1 ml de la suspension cellulaire et 0,05 ml d'une suspension de globules rouges de mouton (11 p. cent). L'ensemble est étalé sur une lame agarosée. Après 2 h 30 d'incubation (25°C) on additionne du complément de Loup et après une nouvelle incubation de 1 h 30 à 25°C nous déterminons sur chaque lame le nombre de plages de lyse.

5 - Etude des T cytotoxiques (cytotoxicité splénique) -

Les cellules T cytotoxiques doivent être sensibilisées par un premier contact avec l'antigène afin de différencier un clone cellulaire détruisant l'antigène.

La sensibilisation est réalisée in vitro en culture mixte de cellules spléniques et de cellules cibles syngéniques.

Les cellules cibles utilisées pour nos expérimentations sont des cellules spléniques de Loup de mer traitées au TNP (Trinitrophényl). Cette substance a la propriété de modifier les protéines, de surface des membranes cellulaires donc la structure des antigènes membranaires qui deviennent inconnus pour les lymphocytes T (Shearer 1974).

a) - Préparation de la suspension lymphocytaire :

Les Loups sont tués par décapitation, les rates sont prélevées et écrasées. Après lavages successifs dans un milieu RPMI (RPMI BioMérieux additionné d'antibiotiques) la suspension cellulaire obtenue est débarrassée des globules rouges par choc hypotonique. Après un test de viabilité au bleu trypan, la concentration de la suspension est ajustée à $5 \cdot 10^6$ cellules par ml.

b) - Préparation de cellules marquées au 2.4.6. TNP selon la technique de Shearer (1974) :

Comme précédemment les rates de Loups sont prélevées stérilement, écrasées et les cellules spléniques dénombrées.

La concentration lymphocytaire est ramenée à 10^7 lymphocytes/ml et on ajoute 0,2 ml de milieu RPMI₁₀ (RPMI + 10 p. cent sérum de veau foetal) additionné de 10 mM de 2, 4, 6 TNP, pH 7,3 ; le rapport volume de la suspension cellulaire, volume du réactif = 1 : 4. On laisse incuber 10 mn à 25°C. Le culot est récupéré et lavé 2 fois par centrifugation à 1200 g pendant 10 mn. Le dernier culot est repris dans du milieu RPMI₁₀ afin d'obtenir une concentration à $2 \cdot 10^5$ cellules /ml.

On réalise ensuite le contact entre cellules spléniques (1 ml) et cellules marquées au TNP (1 ml) (boîtes Costar 24 puits). L'in-

incubation est réalisée pendant 5 jours à 18°C (5 p. cent CO₂ , 95 p. cent O₂).

c)- Test du relargage du chrome 51 :

Après 5 jours d'incubation les lymphocytes sont récupérés, lavés. La concentration cellulaire finale est de 30.10⁶ cellules vivantes /ml.

Ces cellules sont mises au contact de nouvelles cellules marquées au TNP et ayant subi une incubation de 45 minutes à 37°C dans du milieu RPMI₁₀ + une solution de chrome radioactif Cr51 à 200 µ Ci/ml (rapport 1 cellule cible/10 cellules spléniques). Après une incubation de 4 heures à 18°C le surnageant est récupéré. Ce surnageant contient la radioactivité libérée à partir des cellules cibles lysées par les cellules T cytotoxiques sensibilisées. Le taux de radioactivité est déterminé par un comptage à l'aide d'un compteur Gamma (Packard).

Les résultats sont exprimés par le pourcentage de lyse ; le témoin minimum est obtenu en additionnant 1 ml de milieu RPMI₁₀ à 1 ml de cellules marquées au TNP ; le témoin maximum est obtenu en additionnant 1 ml d'une solution de SDS (sodium dodecyl sulfate) à 1 ml d'une solution de cellules marquées au TNP.

$$\text{pourcentage de lyse} = \frac{\text{cpm du test} - \text{cpm témoin minimum}}{\text{cpm témoin maximum} - \text{cpm témoin minimum}} \times 100$$

6 - Etude des cellules spontanément tueuses (Natural Killer Cells = NK)

La technique d'étude des cellules NK a été rapportée précédemment (Deschaux et al. 1983), nous la rappelons brièvement :

La préparation des cellules effectrices est réalisée comme dans le cas des lymphocytes T cytotoxiques (10⁷ cellules/ml).

Les cellules cibles sont des cellules diploïdes de poumon de fœtus humain (MRC5) ou les cellules cancéreuses (L) de souris C₃H. Ces cellules sont marquées au chrome radioactif comme pour l'étude des lymphocytes T cytotoxiques (2.10⁵ cellules/ml).

Le test de microtitration se fait par le relargage du Cr51 des cellules cancéreuses lysées par des cellules spléniques de Loups.

L'expression des résultats se fait comme dans le cas des lymphocytes T cytotoxiques.

RESULTATS

I - Influence de la température sur la production d'anticorps anti-globules rouges de mouton (plages d'hémolyse)

Les résultats du tableau 1 ci-après démontrent que l'optimum de l'activité anticorps antiglobules rouges de mouton est 18°C.

température d'élevage	nombre de poissons étudiés	nombre de PFC ($\bar{X} + Sm$) pour 10^6 cellules vivantes	significativité *	nombre de PFC ($\bar{X} + Sm$)/rate	significativité
13°C	10	33 + 5	↕ 0.001 ↕ 0.001 ↕ 0.001	1321 + 205	↕ 0.001 ↕ 0.001 ↕ 0.001
18°C	12	217 + 18		8692 + 752	
21°C	9	39 + 4		1588 + 191	

Tableau 1 - Etude de l'influence de la température d'élevage sur la production in vivo d'anticorps antiglobules rouges de mouton.

* - test de Student Fisher.

2 - Influence de la température sur l'activité spontanément tueuse (cellules NK) (tableau 2).

température d'élevage	Cpm de chrome 51 relargué / 10^6 cellules $\bar{X} + Sm$	pourcentage de lyse $\bar{X} + Sm$	Significativité *** comparaison entre les différentes températures
13°C	1487* + 11 n** = 13	6,87	/18° p ≤ 0.01 /21° p ≤ 0.001
18°C	11930 + 223 n = 23	38,5	/21° p ≤ 0.001
21°C	2952 + 58 n = 35	7,7	-

Tableau 2 - Effet de la température d'élevage sur la cytotoxicité des cellules naturelles tueuses (NK).

* - Cytotoxicité exprimée en cpm $\bar{X} + Sm$

** n = nombre d'essais réalisés par température et par expérience. Nous avons réalisé 2 expériences.

*** - test de Student Fisher.

3 - Influence des conditions de nutrition sur le nombre de lymphocytes formant plages d'hémolyse (tableau 3).

	témoin	animaux au jeûne (15 jours)
1ère expérimentation (10 poissons)	158 + 20	132 + 8 (NS)*
2ème expérimentation (10 poissons)	205 + 10	200 + 11 (NS)
durée du régime (10 poissons par temps)	témoin	animaux au régime dépourvu en protéines
15 jours	138 + 15	155 + 5 (NS)
45 jours	124 + 18	130 + 12 (NS)
75 jours	182 + 4	167 + 21 (NS)

Tableau 3 - Nombre de PFC/10⁶ lymphocytes vivants

* NS = non significatif (test de Student Fisher)

Dans nos conditions expérimentales nous n'avons observé aucune influence du régime alimentaire sur la production d'anticorps antiglobules de mouton.

4 - Influence des conditions de nutrition sur la réponse cytotoxique cellulaire du Loup de mer en élevage.

a)- Influence du jeûne sur l'activité cytotoxique :

(tableau 4).

Nous constatons aucune influence du jeûne alimentaire.

régime alimentaire	nombre de poissons étudiés	moyenne + Sm cpm Cr 51 relargués	pourcentage de lyse \bar{X} + Sm
normal	17	5386 + 113	23,62 + 1,20
jeûne 15 jours	16	5305 + 111 NS	22,76 + 1,18 NS*

Tableau 4 - Etude in vivo de l'activité T cytotoxique de cellules spléniques de Loup de mer ; influence du jeûne (voir conditions d'élevage). Les cellules cibles sont des cellules spléniques de Loup traitées au TNP; le rapport cellules effectrices/cellules cibles = 1/10). Les résultats sont exprimés en cpm relargués, et en pourcentage de lyse. * test de Student Fisher.

b)- Influence d'un régime appauvri en protéines

(tableau 5).

Nos résultats mettent en évidence une diminution importante de l'activité cytotoxique.

durée du régime	régime	nombre de poissons étudiés	moyenne + Sm cpm Cr 51 relargués	pourcentage lyse $\bar{X} \pm Sm$
15 jours	normal	11	1191 + 23	24,76 + 2,37
	DP	11	1083 + 22 < 0.001	13,73 + 2,33 < 0.001*
45 jours	normal	8	1596 + 50	20,70 + 2,07
	DP	4	1322 + 14 < 0.001	9,44 + 0,58 < 0.001
75 jours	normal	5	4412 + 277	33,26 + 4,67
	DP	4	3732 + 147 NS	21,95 + 4,16 NS

Tableau 5 - Etude *in vivo* de l'activité T cytotoxique de cellules spléniques de Loup de mer ; influence d'un régime dépourvu en protéines (voir conditions d'élevage). Les cellules cibles sont des cellules spléniques de Loup traitées au TNP, le rapport cellules effectrices/cellules cibles = 1/10. Les résultats sont exprimés en cpm relargués et en pourcentage de lyse.

* test de Student Fisher.

5 - Influence des conditions de nutrition sur la réponse spontanément tueuse (NK) du loup de mer en élevage.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de cps de radioactivité relarguée par les cellules cibles lysées sous l'influence de l'activité cytotoxique des cellules spléniques : x cpm (cpm = coups par minute). Nous avons également exprimé les résultats en pourcentage de lyse des cellules cibles par les cellules spléniques, ce qui correspond au pourcentage d'activité cytotoxique des cellules spléniques = \bar{X} pourcentage cytotoxicité = \bar{X} pourcentage lyse.

a) - Influence d'un jeûne de 15 jours (tableau 6) :

L'activité des cellules naturelles tueuses semble légèrement augmentée par le jeûne de 15 jours mais non significativement.

durée du régime	régime	nombre de poissons	$\bar{X} \pm Sm$	pourcentage lyse $\bar{X} \pm Sm$
15 jours	T	22	9547 + 284	26,46 + 2,03
	jeûne	19	9956 + 282 NS	29,37 + 2,01 NS*

Tableau 6 - Etude *in vivo* de l'activité naturelle tueuse de cellules spléniques de Loups de mer : influence du jeûne.

* test de Student Fisher.

b)- Influence d'un régime appauvri en protéines (DP) (15, 45, 75 jours) (tableau 7) :

On observe une augmentation significative de l'activité naturelle tueuse lors des premiers jours de régime. Aucune variation de cette activité n'est observée après 45 ou 75 jours.

durée du régime	régime	nombre de poissons	$\bar{X} \pm Sm$	pourcentage de lyse $\bar{X} \pm Sm$
15 jours	T	12	1097 \pm 29	16,32 \pm 1,44
	DP	12	1214 \pm 27	21,92 \pm 1,41 <0,05 *
45 jours	T	13	2409 \pm 139	35,11 \pm 5,09
	DP	13	2184 \pm 137 NS	26,94 \pm 5,00 NS
75 jours	T	12	4053 \pm 253	21,68 \pm 4,85
	DP	12	4170 \pm 226 NS	23,92 \pm 4,31 NS

Tableau 7 - Etude in vivo de l'activité naturelle tueuse des cellules spléniques de Loup de mer : influence d'un régime dépourvu en protéines.

* test de Student Fisher.

CONCLUSION

En 1972, Cone et Marchonis ont montré chez le Poisson que les cellules formant rosettes (lymphocytes T) apparaissent 3 jours après l'immunisation et que leur fonction est indépendante de la température mais dépendante de la dose d'antigène. La synthèse d'anticorps (lymphocytes B) est dépendante à la fois de la température et de la dose d'antigène.

Une variation de température peut ainsi dissocier des étapes fonctionnelles dans la formation d'anticorps : une phase "température insensible" pouvant représenter l'activation du lymphocyte T tandis qu'une phase plus tardive consisterait à la formation des lymphocytes B (Avtalion 1969, Paterson et Fryer 1974, Riskers et al. 1980).

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude de l'effet de la température sur la coopération lymphocytes B - lymphocytes T ; l'immunisation a été faite avec des globules de mouton. Cette immunisation a été pratiquée par injection intra coelomique ; les poissons (*Dicentrarchus labrax*) ont été maintenus pendant 4 semaines à différentes températures (13, 18, 21°C). On constate que la production maximale d'anticorps est obtenue chez les animaux élevés à 18°C.

Nous avons démontré la présence de cellules spontanément tueuses (NK) chez le Loup. Le pouvoir cytotoxique de ces cellules est maximum lorsque les animaux sont élevés à 18°C.

Chez le Mammifère, on considère les lymphocytes B et T comme des souches cellulaires différentes des cellules NK, ces dernières pouvant être classées parmi les défenses non spécifiques de l'organisme. L'étude que nous rapportons montre chez le Poisson l'existence d'un effet de la température d'élevage sur les défenses spécifiques et non spécifiques.

Dans la seconde partie de notre travail il a été démontré que ni le jeûne, ni un régime appauvri en protéines n'influent sur la production d'anticorps antiglobules rouges de mouton. Par contre, ces régimes modifient la cytotoxicité des lymphocytes spléniques et des cellules naturelles tueuses.

La cytotoxicité cellulaire lymphocytaire est abaissée lorsque les animaux sont carencés en protéines et n'est pas modifiée par le jeûne ; la réponse naturelle tueuse est augmentée après le régime appauvri en protéines et légèrement modifiée par le jeûne.

Le régime carencé en protéines influe sur les populations cellulaires cytotoxiques mais cependant un équilibre se maintient. Notre étude a été réalisée in vivo. Pour trouver le point d'impact de l'action de ce régime sur les cellules cytotoxiques il faut travailler in vitro en modifiant la composition des milieux de culture des cellules ; ceci a été réalisé avec les lymphocytes des poissons carencés. C'est l'objectif que nous poursuivons.

L'explication de la différence entre les résultats obtenus après le jeûne et le régime dépourvu en protéines doit relever du métabolisme intermédiaire du Poisson, encore très mal connu.

Durant notre travail, deux conditions expérimentales importantes n'ont pas été étudiées : le mode d'injection de l'antigène et la dose d'antigène injectée. Il sera donc intéressant, la température optimale d'élevage ayant été déterminée, d'étudier l'influence de ces paramètres (mode d'injection et dose d'antigène) sur la réponse immune. Enfin, après avoir défini ces conditions optimales nous pourrions envisager l'utilisation d'immuno-stimulants de la fonction immune cellulaire (hormones thymiques).

Avtalion R.R., 1969 - Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (Cyprinus carpio) immunised against. BSA Immunology, 17, p. 927-931.

Chandra R.K., 1980 - Immunology of nutritional disorders. Current topics in Immunology series.

Cone E., Marchalonis J.J., 1972 - Cellular and humoral aspects of the influence of environmental temperature on the immune response of poikilothermic vertebrates. J. Immunol., 108, p. 952-957.

Cordier-Perroy L., Deschaux P., Pérès G., 1983 - Influence of an antibody response (antiSRBC) in a teleostean fish : Dicentrarchus labrax. Experientia, 39, p. 84-85.

- Deschaux P., Cordier-Perroy L., Pérès G., 1983 - Evidence for NK cells in Dicentrarchus labrax. Action of breeding temperature. Comp. Immunol. Microbiol. and Inf. Diseases, 6, p. 95-99.
- Heresi G., Chandra R.K., 1980 - Effects of severe caloric restriction on thymic factor activity and lymphocyte stimulation response in rats. J. of Nutrition, 110, p.1888-1892.
- Paterson W.D., Fryer J.L., 1974 - Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (Ochorhyncus kisutch) to aeromonas salmocida endotoxin. J. Fish.Res. Board Can., 31 p. 1743-1749.
- Rijkers G.J., Van Muis A., Winkel W.B., 1980 - The immune system of cyprinid kinetics and temperature dependance of antibody-producing cells in carp. Immunology, 99, p.876-882.
- Shearer G.M., 1974 - Cell mediated cytotoxicity to trinitrophenol modified syngenic lymphocytes. Eur. J. Immunol., 4, p.527-533.