

Université de Montréal

**ÉVALUATION DES EFFETS D'UNE DIÈTE FAIBLE EN PHOSPHORE SUR LE
SYSTÈME IMMUNITAIRE DE L'OMBLE DE FONTAINE
(*SALVELINUS FONTINALIS*) EN CONDITION DE PISCICULTURE**

Par
VALÉRIE GIRARD

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

avril 2006

© Valérie Girard, 2006



SF

607

US4

2006

v. 029

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation des effets d'une diète faible en phosphore sur le système immunitaire de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) en condition de pisciculture

présenté par :
VALÉRIE GIRARD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Hélie, président-rapporteur
Khyali Ram Mittal, directeur de recherche
F. Carl. Uhland, codirecteur
Serge Messier, codirecteur
Michel Fournier, membre du jury

Résumé

Les pisciculteurs doivent maintenant se soumettre à des normes environnementales strictes pour limiter les rejets à l'origine de l'eutrophisation. Le phosphore, principal responsable de ce type de pollution nutritionnelle en eau douce, est un nutriment essentiel et doit obligatoirement se retrouver dans l'alimentation. Une diète faible en phosphore peut aider les pisciculteurs à répondre aux normes environnementales, mais peut aussi avoir des conséquences sur les différentes fonctions biologiques des poissons. Dans cette étude expérimentale, le suivi général de l'état de santé d'un groupe d'ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) nourri avec une moulée équilibrée en phosphore (Normo-P) a été comparé à un groupe nourri avec une moulée déficiente en phosphore (Low-P) sur une période de 8 mois. La réponse immunitaire cellulaire a été évaluée par la phagocytose et la transformation lymphoblastique. La résistance aux infections causées par la bactérie *Aeromonas salmonicida*, responsable de la furunculose, a également été examinée chez les deux groupes. Nos résultats démontrent que les poissons Low-P ont accumulé plus de graisse abdominale et que quelques individus ont développé des déformations squelettiques typiques de ce genre de déficience. Les taux de phagocytose ont tendance à être plus élevés chez les Low-P mais les différences entre les deux groupes ne sont pas statistiquement significatives. Il n'y a pas eu de prolifération des lymphocytes B et T en présence de mitogènes lors de la transformation lymphoblastique. Le pourcentage de survie, lors des essais infectieux, est légèrement supérieur chez les Low-P mais les différences ne sont pas statistiquement significatives entre les deux groupes. L'atteinte de la maturité sexuelle durant l'essai nutritionnel et certains stress chroniques liés aux conditions d'élevage ont influencé les paramètres immunologiques examinés dans cette étude.

Mots clés : phagocytose, transformation lymphoblastique, omble de fontaine, *Aeromonas salmonicida*, infections expérimentales, facteurs de stress, cortisol, phosphore, diète, maturité sexuelle

Abstract

In order to comply with new environmental regulations regarding eutrophication, fish farmers must limit nutrient inputs to water. In freshwater, phosphorus is the principle cause of excess plant and algal proliferation. This essential nutrient is not synthesised by organisms such as fish and must therefore be ingested through food. A diet low in phosphorus may help to reduce waste from fish farming but it can have negative impacts on several biological functions in fish. In this experimental study, a group of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fed with a balanced diet (Normo-P) was compared to another group fed with a phosphorus deficient diet (Low-P) for 8 months. General health, immune response and resistance to disease were compared between groups of fish. Phagocytosis and lymphoblastic transformation were considered to evaluate the cellular immune response, and challenge trials with the bacterium *Aeromonas salmonicida*, the cause of furunculosis, were conducted to examine the resistance of fish to disease. Our results show that Low-P fishes had greater amounts abdominal fat than Normo-P fishes and a small percentage developed spinal deformations typically associated with a phosphorus deficient diet. Phagocytosis tended to be higher in the Low-P group, but it was not statistically significant. No proliferation of T or B cells was observed after exposure to mitogens in the blastogenic assays. In bacterial challenges, there was no statistically significant difference in survival between both groups of fish, although Low-P fishes seemed to be slightly more resistant to infection after two weeks of observation. The immunological parameters investigated in this study may have been affected by chronic stress associated with the development of sexual maturity and fish maintenance during the nutritional phase.

Key words: phagocytosis, lymphoblastic transformation, brook trout, *Aeromonas salmonicida*, bacterial challenge, stress factors, cortisol, phosphorus, diet, sexual maturity

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et des abréviations	x
Introduction	1
Problématique	1
Hypothèse de recherche	2
Objectifs de recherche	3
Recension de la littérature	4
Le phosphore	4
Origine	4
Aspects abiotiques	4
Utilisations commerciales	4
Aspects biotiques	5
Absorption et excrétion du phosphore	6
Carence en phosphore chez les poissons	7
Phosphore d'origine végétale	7
Phosphore d'origine animale	8
Eutrophisation	9
Causes et conséquences	9
Processus d'eutrophisation	9
Omble de fontaine	10
Synonymes	10
Taxinomie	10
Identification	10
Distribution mondiale et habitat naturel	11
Importance économique au Québec	12
La furonculose	13
L'agent pathogène	14
Facteurs de virulence	14
La maladie	15
Signes cliniques	16
Forme sous-clinique ou latente	16
Transmission	17
Système immunitaire des poissons	17
Organes et cellules	17
Rein	18
Thymus	18
Rate	19
Immunité reliée aux muqueuses	19

Immunité innée	20
Immunité humorale non spécifique	20
Immunité cellulaire non spécifique	21
Immunité acquise	21
Immunité humorale spécifique	22
Immunité cellulaire spécifique	22
Nutrition et immunité	24
Régulation des besoins en minéraux chez les poissons	24
Effets des carences alimentaires sur le système immunitaire des poissons	25
Effets des carences en phosphore sur le système immunitaire	26
Méthodologie	28
Essai nutritionnel	28
Espèce utilisée et design expérimental	28
Bassins et systèmes du LARSA	29
Diètes expérimentales	29
Protocole d'alimentation	30
Procédures pour tests immunitaires	31
Milieux de culture	31
Échantillonnage	31
Euthanasie	31
Pesée et prélèvement sanguin	32
Prélèvement d'organes et identification du sexe	32
Dénombrement cellulaire et contrôle de la viabilité	33
Tests immunologiques	33
Phagocytose	33
Transformation lymphoblastique	34
Infections expérimentales	35
Installations	35
Souches bactériennes	36
Suspension bactérienne	36
Période d'adaptation initiale	37
Pré-essai #1	37
Pré-essai #2	38
Infection #1	38
Infection #2	39
Infection #3	40
Autopsie des poissons suites aux infections	40
Analyses statistiques	40
Résultats	42
Essai nutritionnel	42
Les diètes expérimentales	42
Période d'alimentation	42
Évolution du poids des poissons	43
Effet du poids sur la survie des poissons	44
Observations durant l'essai nutritionnel	46
Tests immunologiques	47
Viabilité cellulaire	47
Phagocytose	47
Transformation lymphoblastique	51

Essais infectieux	51
Confirmation de la présence d' <i>Aeromonas salmonicida</i>	51
Effet de la moule expérimentale sur la survie des poissons	52
Effet de la moule expérimentale dans la première semaine de l'infection	53
Effet du sexe sur la survie des poissons	54
Discussion	56
Diète expérimentale	56
Défiance en phosphore et poids des poissons	57
Défiance en phosphore et masse grasseuse	59
Vitamine D et phosphore	61
Déformations osseuses	62
Défiance en phosphore et maturité sexuelle	63
Modifications au protocole affectant les paramètres immunologiques	65
Interaction entre le système immunitaire et endocrinien	66
Transformation lymphoblastique	67
Phagocytose	69
Infections expérimentales	70
Confirmation des mortalités	71
Survie aux infections	72
Conclusions	74
Perspectives	76
Bibliographie	77
Sites internet	91
Annexe 1	xvi
Annexe 2	xvii
Annexe 3	xviii
Annexe 4	xix
Annexe 5	xx
Annexe 6	xxi
Annexe 7	xxii

Liste des tableaux

- Tableau I Dates importantes des procédures expérimentales effectuées durant l'essai nutritionnel. _____ 43
- Tableau II Temps de survie moyen des ombles de fontaine selon le type de moulée et la durée de consommation durant les infections expérimentales. _____ 53

Liste des figures

Figure 1	Omble de fontaine _____	11
Figure 2	Distribution sommaire de l'omble de fontaine indiquée par les zones rouges (carte interactive sur le site web : http://www.iobis.org/Welcome.htm). _____	12
Figure 3	Évolution du poids moyen des ombles de fontaine pour la période d'alimentation expérimentale. _____	44
Figure 4	Effet du poids sur la survie des poissons lors des infections avec la bactérie <i>Aeromonas salmonicida</i> . _____	45
Figure 5	Activité phagocytaire (A) et efficacité phagocytaire (B) des cellules du pronéphros à différentes étapes de l'essai nutritionnel. _____	49
Figure 6	Activité phagocytaire des cellules du pronéphros chez les poissons mâles et femelles à différentes étapes de l'essai nutritionnel. _____	50
Figure 7	Effet du type de moulée sur la survie des poissons Low-P et Normo-P en période d'adaptation et lors des infections avec la bactérie <i>Aeromonas salmonicida</i> . _____	55
Figure 8	Omble de fontaine Low-P à l'abdomen distendu par l'accumulation de graisse. _____	60
Figure 9	Déformation « curled spine » ou « phosphatic curl » typique d'un omble de fontaine Low-P durant l'essai nutritionnel. _____	63

Liste des sigles et des abréviations

Ac :	Anticorps
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ag :	Antigène
APP :	<i>Acute phase proteins</i> / protéines de phase aiguë
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messager
Ass:	<i>Aeromonas salmonicida</i> sous-espèce <i>salmonicida</i>
ATP:	Adénosine triphosphate
BALT:	<i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i> / tissu lymphoïde associé aux bronches
BCR:	<i>B cell receptor</i> / récepteur des lymphocytes B
BGG:	<i>Bovine gamma globulin</i> / gammaglobuline bovine
BKD:	<i>Bacterial kidney disease</i> / maladie bactérienne du rein
C:	Carbone
°C:	Degrés Celsius
Ca:	Calcium
CaHPO ₄ 2H ₂ O :	Phosphate de calcium dibasique
CCPA :	Conseil canadien de protection des animaux
CF:	<i>Chimiotaxis factors</i> / facteurs de chimiotaxie
cfu:	<i>Colony forming unit</i> / unité formant des colonies
cm:	Centimètre
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA:	Concanavaleine A
CPA:	Cellules présentatrices d'antigène
DM :	<i>Dry matter</i> / matière sèche
DPM :	Désintégration par minute
FCR:	<i>Feed conversion ratio</i> / ratio de conversion alimentaire
g:	Gramme
GALT:	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> / tissu lymphoïde associé au tube digestif
GCAT :	Glycérophospholipide cholestérol acyltransférase

^3H :	Tritium
IAF :	Institut Armand-Frappier
IBP:	<i>Iron binding proteins</i> / protéines se liant au fer
IFN:	Interféron
Ig:	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
INRS:	Institut national de la recherche scientifique
IP :	Intrapéritonéal
IS :	Index de stimulation
Kg :	Kilogramme
L :	Litre
Low-P :	Faible en phosphore
LPS :	Lipopolysaccharides
m^3 :	Mètre cube
MAF :	<i>Macrophage activation factor</i> / facteur d'activation des macrophages
mg :	Milligramme
MIF :	<i>Migration inhibitory factor</i> / facteur d'inhibition de la migration
MJ :	Mégajoule
mL :	Millilitre
MS-222 :	Tricaïne méthane-sulfonate
N :	Azote
NaPi_2 :	Co-transporteur de sodium phosphate
NCC :	<i>Nonspecific cytotoxic cells</i> / cellules cytotoxiques non spécifiques
NK :	<i>Natural killer cells</i> / cellules tueuses
nm :	Nanomètre
Normo-P :	Équilibré en phosphore
OTC :	Oxytétracycline
P :	Phosphore
PAMs :	Peptides anti-microbiens
PBS :	<i>Phosphate buffered saline</i> / saline de phosphate tamponnée
P dig. :	Phosphore digestible

PHA :	Phytohemagglutinine
PMN :	Cellules polymorphonucléées
PO ₄ ³⁻ :	Phosphate
PWM :	<i>Pokeweed mitogen</i> / mitogène de la phytolaque
RIA :	<i>Radioimmunoassay</i> / essai radioimmunologique
RPM :	Rotations par minute
SALT:	<i>Skin-associated lymphoid tissue</i> / tissu lymphoïde associé à la peau
SN :	Souche naturelle
Spp :	Sous-espèce
SS :	Souche standard
ST :	Sérum de truite
SVF :	Sérum de veau foetal
TCR :	<i>T cell receptor</i> / récepteur des lymphocytes T
TGFβ:	<i>Transforming growth factor β</i> / facteur de croissance transformant β
TNF:	<i>Tumor necrosis factor</i> / facteur de nécrose tumorale
TSA:	<i>Trypticase soy agar</i> / gélose trypticase soja
TSB:	<i>Trypticase soy broth</i> / bouillon trypticase soja
μCi:	Microcurie
UI:	Unité internationale
μL :	Microlitre
μm :	Micromètre
v/v :	Volume/volume

Dédicace

À Guillaume Levesque,
grâce à qui cette expérience a été
possible, supportable et même
agréable!!!

À Ninou,
pour être restée jusqu'à la fin.

Remerciements

- Pour m'avoir fait confiance du début à la fin, pour m'avoir fait découvrir les « poissons » sous un autre angle, pour m'avoir fait connaître des gens de plein de milieux et pour avoir supporté mes crises d'angoisse, je remercie sincèrement mon codirecteur le Dr Carl Uhland.
- Pour son implication et son support lorsque j'en avais de besoin, je remercie le Dr Serge Messier, mon autre codirecteur.
- Pour toutes les choses non dites qui veulent dire beaucoup, je remercie mon directeur, le Dr Khyali Ram Mittal. *Namaste!*
- Pour les nombreuses précisions et judicieux conseils, son aide inestimable, son appui, pour avoir pu discuter « poissons » avec elle, je remercie Marlène Fortier, agente de recherche au laboratoire d'écotoxicologie de Michel Fournier à l'INRS Institut Armand-Frappier de Pointe-Claire à Montréal. C'est aussi grâce à elle que j'ai connu Claire Dautremepuits et Sophie Gauthier-Clerc qui ont partagé avec moi leur savoir immunologique des animaux aquatiques.
- Pour m'avoir accueilli dès le début comme sa collègue de travail mais aussi comme son amie, pour avoir partagé avec moi ses expériences professionnelles et personnelles, pour m'avoir hébergée et nourrie pendant mes séjours à Québec, je remercie Émilie Proulx, agente de recherche pour le Dr Grant Vandenberg au département de sciences animales de l'Université Laval et son copain Yannick.
- Pour le partage de ses connaissances biologiques et son aide irremplaçable, je remercie Patrick Cejka de la Station d'épuration des eaux usées de Montréal.
- Parce qu'ils m'ont donné ma première chance en recherche et qu'ils ont toujours cru que j'étais capable peu importe où j'allais, je remercie Alexandre Poulain et Marc Amyot, sans oublier Dominique Bélanger, Phanie, Vergene, Édenise, Bastoche, Malorie du département de sciences biologiques de l'UdM.
- Pour sa contribution au projet en me laissant libre accès à ses ressources humaines (Marlène!!) et matériel (labo), pour m'avoir mis en contact avec Patrick Cejka et pour avoir accepté d'être membre de mon jury, merci spécial à Michel Fournier de l'INRS-IAF de Montréal.

- Pour avoir été la référence en matière de nutrition chez les poissons et pour m'avoir ouvert les portes de l'Université Laval à Québec, je tiens à remercier chaleureusement le Dr Grant Vandenberg.

Et finalement, remerciements sincères à mes parents, à toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de la FMV, à Guy Beauchamp (statistiques), Jean-Christophe Therrien, Joanne Keays et Serge Higgins du LARSA, StéFanie Cardin, Kathleen Brown, Annie Desmeules, Jessica Michaud, Cécile Aenishaenslin, Gabriel Koffi D. KOKO, Dre Lucie Verdon, Dre Ann Letellier, Dre Josée Harel (pour le local de radioactivité), Louis Sénécal (posters), merci à l'équipe de l'UQROP et celle du département de médecine zoologique de la FMV.

Introduction

Problématique

L'aquaculture est une industrie en développement qui s'intensifie et se spécialise afin de répondre à la demande croissante des consommateurs pour les organismes aquatiques (FAO, 2003). Par conséquent, les producteurs vont favoriser l'élevage d'espèces les plus en demande et correspondant à une plus grande valeur économique. Les salmonidés, grande famille piscicole comprenant les truites, les saumons et les ombles composent une grande partie de ce type d'élevage au Canada (MPO, 2005) et particulièrement au Québec (Morin, 2004). Afin d'obtenir une croissance maximale des poissons, les pisciculteurs vont utiliser des diètes riches contenant certains nutriments en excès. Le rejet de ces nutriments non assimilés par les poissons est à l'origine d'un enrichissement excessif des plans d'eau, phénomène que l'on appelle eutrophisation (MAPAQ, 2005). En temps normal, le phosphore, l'azote et dans une moindre mesure le carbone, sont les éléments limitants de la croissance des végétaux dans les milieux aquatiques. Leur présence en excès, particulièrement le phosphore en eaux douces, est la cause principale de ce type de pollution nutritionnelle provoquant la prolifération massive de plantes et de cyanobactéries indésirables (Correl, 1998). Pour cette raison, les producteurs doivent maintenant se soumettre à des normes environnementales strictes (MEF, 1998; MAPAQ, 2004) pour limiter les rejets de leur pisciculture tout en maintenant le volume et la qualité de leur élevage.

Le phosphore est un oligoélément essentiel. Il n'est pas synthétisé par l'organisme et doit obligatoirement se retrouver dans l'alimentation. Les effets d'un déficit en phosphore sur la diminution du développement osseux et le métabolisme animal sont bien documentés (Labbé, 1933; Demolon, 1949; Demolon, 1961, Compère, 1967). Chez les poissons, ces effets sont bien connus (Ketola, 1975; Rodehutsord, 1996; Baeverfjord, 1998) et la diminution de la réponse immunitaire humorale et cellulaire suite à une carence nutritionnelle générale l'est également (Blazer, 1984ab; Blazer, 1989; Blazer, 1992; Olivier, 1997). Par contre, les études piscicoles portant spécifiquement sur les effets d'une

déficience en phosphore sur le système immunitaire sont rares (Eya, 1998; Jokinen, 2003; Sugiura, 2004).

Chez les poissons, les résultats obtenus d'une étude chez une espèce ne peuvent souvent pas être extrapolés à toutes les espèces parce que les poissons sont un groupe plus hétérogène que les mammifères et que des différences majeures peuvent exister au niveau du système immunitaire entre et dans chaque classe (Douglas, 1990). En effet, la phylogénie des poissons débute avec les agnathes ou poissons sans mâchoire tel que les lamproies, se poursuit avec les chondrichthyens ou poissons au squelette cartilagineux comme les requins et les raies et se termine avec les téléostéens ou poissons au squelette osseux dont font partie les salmonidés (Tizard, 2000). Cette évolution des espèces amène une complexification du système immunitaire commençant par le développement des organes lymphoïdes et hématopoïétiques. De plus, le biotope des espèces incluant des facteurs comme la température, la salinité de l'eau et la profondeur habitée ainsi que les comportements saisonniers ou de migration vont directement agir sur le type de réponse immunitaire en modulant des adaptations physiologiques et comportementales.

L'étude suivante a été réalisée dans un contexte de nutrition en relation avec le système immunitaire et la spécificité des expérimentations adaptées aux poissons, plus précisément les salmonidés. Une diète faible en phosphore peut possiblement aider les pisciculteurs à répondre aux normes environnementales, mais peut aussi avoir des conséquences sur les différentes fonctions biologiques des poissons, entraînant ainsi une diminution de la rentabilité des élevages se traduisant par la perte de cheptels malades et par l'utilisation accrue d'antibiotiques. Ce projet de recherche fait parti du Programme Coopératif de Recherche et de Développement en Aquaculture (PCRDA) et de la Stratégie de développement durable pour l'aquaculture en eau douce (STRADDAQ).

Hypothèse de recherche

Une diète faible en phosphore administrée à l'espèce *Salvelinus fontinalis* entraînerait une diminution de la réponse immunitaire cellulaire, contribuant ainsi à une susceptibilité accrue à la bactérie *Aeromonas salmonicida*.

Objectifs de recherche

Afin de mieux comprendre les conséquences d'une diète faible en phosphore sur les fonctions biologiques, nous proposons dans cette étude de comparer certains aspects du système immunitaire chez un groupe d'ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) alimenté avec une diète normale par rapport à un groupe alimenté avec une diète faible en phosphore. Pour ce faire, nous avons développé les objectifs spécifiques suivants:

- Faire un suivi de santé générale (activité, morphologie, anormalité, mortalité) du groupe nourri avec une diète faible en phosphore par rapport au groupe nourri avec une diète normale.
- Comparer la réponse immunitaire cellulaire par l'activité phagocytaire et la transformation lymphoblastique chez les deux groupes.
- Comparer la résistance à la furunculose suite à des infections expérimentales avec la bactérie *Aeromonas salmonicida* à la fin de l'essai nutritionnel.

Ce document présente d'abord une revue de littérature appuyant les principaux concepts abordés dans l'introduction. Par la suite, le matériel utilisé et les méthodes employées seront décrits en détail. Enfin, les sections « Résultats » et « Discussion » permettront de tester l'hypothèse.

Recension de la littérature

Le phosphore

Origine

Le phosphore a été découvert en 1667 par un alchimiste allemand du nom de Henning Brand qui cherchait dans l'urine humaine une substance capable de transformer les métaux en or (Sugiura, 2004). C'est au début du XVIII^e siècle que Johann Kunckel réussit à extraire du phosphore des os et à la fin du même siècle que Carl Wilhelm Scheele met au point un procédé efficace d'extraction à partir des os calcinés. Il faut attendre en 1838 pour qu'il y ait préparation et extraction à une échelle industrielle.

Aspects abiotiques

Le phosphore, symbole P et numéro atomique 15 du tableau périodique, est le 11^{ième} élément le plus abondant de la croûte terrestre (0,12%). Il est retrouvé sous plusieurs formes ayant des propriétés physiques différentes mais gardant des propriétés chimiques identiques. En effet, vu sa grande réactivité à l'air et aux autres composés oxygénés, le phosphore ne se retrouve jamais à l'état brut. En présence d'oxygène, le phosphore se consume en émettant une lumière brillante d'où le terme « phosphorescence » qui décrit une substance qui brille dans le noir sans combustion. Le mot phosphore vient du grec *phôs* désignant « lumière » et *phoros* désignant « porteur » (Larousse, 1996).

Utilisations commerciales

Le phosphore est utilisé de façon commerciale dans la production d'engrais, dans la fabrication d'allumettes et de feux d'artifice et comme composant des détergents à lessive. Certains de ses isotopes, ³²P et ³³P, émettent des radiations β et sont utilisés dans les laboratoires de recherche pour le marquage et le séquençage de l'ADN. Le phosphate de calcium provenant des cendres osseuses sert à la fabrication de porcelaine de chine et est employé dans la poudre à pâte. Le phosphore peut également être utilisé comme arme chimique et comme matériel militaire.

Aspects biotiques

Le phosphore est un élément essentiel pour toutes formes de vie sur terre. Il s'y retrouve principalement sous forme de phosphate c'est-à-dire un atome de phosphore et quatre atomes d'oxygène (PO_4^{3-}). Il entre dans la composition de nombreuses enzymes et joue un rôle clé dans la couche bilipidique des membranes cellulaires par la présence des phospholipides. Dans la structure des acides nucléiques, il se lie au ribose (pour l'ARN) ou au désoxyribose (pour l'ADN) pour former un nucléotide à l'ajout d'une base azotée variable. C'est la répétition phosphate-sucre qui forme le squelette du polymère (Karp, 1998). Plusieurs processus cellulaires utilisent le phosphate comme source d'énergie via la coenzyme adénosine triphosphate (ATP). En fait, ce sont les liaisons anhydrides d'acide qui lient les groupements phosphates qui sont riches en énergie et qui créent ainsi les réserves de la cellule (Eckert, 1999). Le phosphore est également très important au niveau du système de tampon phosphate qui permet de maintenir le pH interne des cellules et de l'équilibre phospho-calcique sanguin (Lall, 1989; Karp, 1998).

En plus de sa participation dans un grand nombre de phénomènes biologiques, le phosphore tient un rôle principal dans la formation et le maintien des os et des dents chez les vertébrés et dans la composition des coquilles de mollusques. Sous l'action de la vitamine K et en association avec les vitamines A et D, les phosphates complexés au calcium sous forme d'hydroxyapatite (sel inorganique), s'intègrent à l'ostéocalcine des structures osseuses et supportent la croissance des tissus durs (Eckert, 1999). Les os de poissons contiennent de l'hydroxyapatite à un ratio Ca/P de 5:3 ou encore un mélange hydroxyapatite/phosphate de calcium à un ratio Ca/P de 3:2 (Baeverfjord, 1998). L'homéostasie du phosphore est contrôlée à trois niveaux : la résorption des réserves osseuses, l'absorption intestinale et la conservation au niveau des reins, chez les poissons comme chez les vertébrés supérieurs (Vielma 1998, Jokinen 2003).

Absorption et excrétion du phosphore

La vitamine D, en plus d'être un modulateur important de l'homéostasie du calcium, est étroitement reliée à l'absorption et l'excrétion du phosphore. Une hypophosphatémie augmente la vitamine D₃ active (Engstrom, 1985; Kegley, 2001; site web de ULg). Les formes actives de la vitamine D₃ se présentent sous différents métabolites dont le calcitriol, le calciférol, cholecalciférol ou la 1 α ,25 dihydroxyvitamine D₃ (1-25 (OH)₂ D₃) en réserve dans le foie et les reins. Cette dernière est la forme la plus biologiquement active et responsable de l'action hormonale de la vitamine D (Coloso, 2003). La vitamine D fait partie du groupe de lipide des stérols (stéroïdes) et est liposoluble. Chez les truites, elle est faiblement synthétisée et est donc requise dans l'alimentation à raison de 2,400 UI/Kg d'aliment (Coloso, 2003). Dans les reins, la vitamine D₃ augmente la réabsorption tubulaire du calcium et du phosphore. Dans le petit intestin, elle déclenche leur absorption en augmentant la synthèse de protéines de transport du calcium et du phosphore (Eckert, 1999). Plus précisément, une carence en phosphore va induire l'expression de l'ARNm codant pour un co-transporteur phosphate de sodium (NaPi2) au niveau des reins et de l'intestin (Coloso, 2003). Chez les poissons, cette homéostasie du calcium/phosphore peut différer selon les espèces piscicoles vivant en eaux douces ou salées (Lall, 1989; Vielma 1998). La 1 α ,25 dihydroxyvitamine D₃ est aussi connue pour avoir un rôle dans l'immunité en inhibant la prolifération des lymphocytes B et des lymphocytes T chez l'humain (Lemire, 1984).

Il est également connu que la rétention du phosphore par l'organisme est en corrélation avec les niveaux de phosphore présent dans la diète. En effet, lorsque tous les besoins en P de l'organisme sont comblés, les surplus sont excrétés sous forme insoluble dans les fèces ou sous forme soluble dans les urines. Une concentration de P trop élevée dans la diète est donc inutile puisque les surplus non utilisés sont éliminés. Une légère déficience en phosphore permet donc une meilleure rétention du P. Les poissons ne commencent à excréter les surplus de P que lorsque leurs besoins fondamentaux sont satisfaits (Baeverfjord, 1998; Bureau, 1999; Sugiura, 2000a,b; Coloso, 2003; Satoh, 2003; Lellis, 2004; McDaniel, 2005).

Carence en phosphore chez les poissons

Les signes visibles d'une carence en phosphore sont la réduction de la croissance, l'anorexie, la faible conversion alimentaire, la faible minéralisation osseuse, les déformations du squelette et du crâne et l'accumulation de gras abdominal (Ketola, 1975; Lall, 1989; Baeverfjord, 1998). L'intensité de ces signes perceptibles est toutefois variable selon les études. Une des pathologies osseuses typiques associée à une déficience en P est le « curled spine » démontrée par Shearer et Hardy en 1987 chez la truite arc-en-ciel (Roberts, 2001; Sugiura, 2004) et par Baeverfjord en 1998 chez les saumons de l'Atlantique. Typiquement, le « curled spine » ou « phosphatic curl » se caractérise par une colonne vertébrale finissant en forme de crochet ou de boucle et des déformations sigmoïdes des côtes. Contrairement à une déficience en vitamine C, les os affectés par une déficience en P sont mous, flexibles et les déformations observées ne sont pas accompagnées de fracture. Une alimentation supplémentée en P, en plus de rééquilibrer les paramètres plasmatiques de P et de Ca, peut aider les poissons à redevenir normaux si les déformations ne sont pas trop prononcées (Baeverfjord, 1998; Sugiura, 2004).

Phosphore d'origine végétale

La teneur en phosphore des aliments est très variable et a une importance notable lors de la fabrication des moulées pour animaux. On signale des réserves phosphoriques allant de 4,81% dans la farine de viande, 2,67% dans la farine de poisson, 1,29% dans le son de froment, 0,27 à 0,39% dans les grains et 0,15 à 0,25% dans les foins de bonne qualité (Compère, 1967).

L'acide phytique (myo-inositol-hexakisphosphate) ou phytate est une des principales formes de phosphate emmagasinée chez les plantes et constitue entre 40 et 90% du phosphore dans les céréales et les légumes (Ravindran, 1999). Cet acide phytique est par contre considéré comme un anti-nutriment puisque le système digestif des animaux monogastriques est incapable de digérer ce composé (Joyce, 2005). En effet, une fois ingérées par l'animal, les phytates se lient au calcium, au magnésium et au fer pour former des complexes insolubles qui sont directement éliminés par l'organisme (Lall, 1989; Satoh, 2003). Les effets négatifs de l'acide phytique incluent donc une diminution de la

biodisponibilité de certains minéraux causant des problèmes de santé, une augmentation de la pollution par les rejets de phosphore et une augmentation des coûts pour les éleveurs qui doivent ajouter des suppléments minéraux à l'alimentation des animaux (Joyce, 2005). L'enzyme phytase (diastase), produite par des microorganismes mais aussi par certaines plantes et certains tissus du tractus digestif d'animaux herbivores (Demolon, 1961), a le pouvoir d'hydrolyser les phytates. Ainsi, le phosphore et les minéraux liés se retrouvent de nouveau sous une forme assimilable par l'organisme. L'ajout de cette enzyme à l'alimentation des animaux permet donc de rentabiliser l'assimilation du phosphore et d'augmenter l'absorption des minéraux. Elle a également le potentiel d'augmenter la digestibilité des acides aminés (Zhang, 1999; Haefner, 2005). La phytase est très populaire auprès des éleveurs d'animaux monogastriques (porcs, volailles, poissons) qui ne la possèdent pas de façon naturelle (Lall, 1989; Haefner, 2005). Elle permet d'assimiler le phosphore provenant des diètes à base de farines végétales sans ajout alimentaire de phosphore inorganique tout en diminuant les rejets phosphoriques dans l'environnement.

Phosphore d'origine animale

Le problème de l'assimilation du phosphore est également présent lors de la consommation de diète à base de farine animale. En effet, quoique ayant une grande digestibilité au niveau protéique et énergétique, les réserves de phosphore présentes dans ce type d'alimentation se retrouvent principalement sous forme d'hydroxyapatite, complexé au calcium, très peu soluble et donc très peu assimilable (Satoh, 2003). L'avantage de ce type de phosphore d'origine animale par rapport à celui d'origine végétale vient de son ratio plus équilibré en calcium/phosphore. Cette proportion Ca/P est de 0,65 pour les diètes animales comparée à 0,48 pour les diètes végétales (Demolon, 1961). Les diètes à base de farine animale sont donc considérées riches en phosphore. Les diètes commerciales pour salmonidés sont composées en grande partie de farines de poissons et de sous-produits d'animaux qui sont généralement considérés comme une bonne source de minéraux (Sugiura, 2004). Par contre, ces diètes contiennent également une grande quantité de cendres (ash), composées majoritairement de calcium, et doivent donc être supplémentées avec d'autres minéraux (dont le phosphore) afin d'être parfaitement équilibrées (Lall, 1989).

Eutrophisation

Causes et conséquences

L'eutrophisation est un type de pollution nutritionnelle (excès d'éléments nutritifs dans un milieu) causée par un déséquilibre du cycle du phosphore (P), de l'azote (N) ou du carbone (C). Ce désordre biogéochimique est causé par un surplus d'éléments fertilisants issus des rejets produits par les activités humaines (Correll, 1998; Smith, 1999). Les effluents urbains (savon à lessive) et industriels, l'épandage agricole d'engrais, l'aquaculture, l'élevage de porcs et de volailles en sont les principaux responsables. L'eutrophisation est le problème de qualité d'eau le plus répandu aux États-Unis et dans plusieurs autres pays (Smith, 1999). L'eau qui en résulte est trouble et malodorante, la rendant inapte aux activités récréatives (baignade, voile, pêche, etc.) et peut causer de graves problèmes économiques. Elle peut même être dangereuse à la consommation s'il y a développement de cyanobactéries et d'algues toxiques (Prescott, 1995). La concentration maximale admissible en phosphore dans les eaux destinées à la consommation humaine est fixée à 5 mg/L (site web de Laease).

Processus d'eutrophisation

Dans un environnement sain, les nutriments (P, N, C) sont les facteurs limitants de la productivité primaire du milieu. Leur apport en excès favorise une prolifération excessive de phytoplancton, d'algues et de plantes. La croissance végétale en surface, en raison du besoin de lumière, provoque la formation d'un couvert opaque empêchant la croissance des végétaux des zones profondes. La décomposition de tout ce matériel organique par les bactéries aérobies consomme une grande quantité d'oxygène. Le lac s'appauvrit ainsi en oxygène causant la perte de plusieurs espèces animales et végétales supérieures ce qui augmente davantage la quantité de matériel organique décomposable. Les bactéries aérobies, ne pouvant pas survivre à l'anoxie du milieu, permettent alors la multiplication des bactéries anaérobies. Celles-ci provoquent à leur tour la fermentation du matériel organique et libèrent par le fait même des gaz nauséabonds tel que le méthane, l'hydrogène sulfuré et l'ammoniac (Prescott, 1995 ; site web du CNRS).

Ombre de fontaine

Synonymes

Plusieurs noms vernaculaires de l'ombre de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) existent selon son aire de répartition (MLCP, 1982) : truite mouchetée, truite de mer, truite de ruisseau, truite saumonée ou saumon de fontaine en français ; brook charr, brook trout, speckled trout, sea trout, coaster, salter, native trout en anglais ; *Aanak* en inuktitut (Nunavik). Au Canada, on parle spécifiquement d'ombre de fontaine dans un contexte de recherche et d'élevage et de la truite mouchetée dans un contexte de pêche sportive ou d'alimentation.

Taxinomie

(site web de ITIS : Integrated Taxonomic Information System)

- Classe: Actinopterygii (poisson épineux à nageoires rayonnées)
- Ordre : Salmoniformes
- Famille : Salmonidae (salmonidés: ensemble des truites et des saumons)
- Genre : *Salvelinus* (Richardson, 1836 -- truites)
- Espèce : *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814 -- ombre de fontaine)

Le croisement artificiel de l'ombre de fontaine avec d'autres espèces est possible. Ainsi, le croisement avec la truite brune (*Salmo trutta*) crée un hybride infertile, la truite tigrée. Le croisement d'un ombre de fontaine mâle avec le touladi femelle (*Salvelinus namaycush* ou truite grise) produit la truite moulac (*Salvelinus wendigo*) capable de se reproduire à son tour (Bernatchez, 2000).

Identification

Selon le Ministère des ressources naturelles et de la faune du Québec, la différence entre un ombre, une truite et un saumon vient de sa coloration. L'ombre aura des taches pâles sur un fond sombre (Figure 1) tandis que les truites et les saumons auront des taches sombres sur un fond pâle (Bernatchez, 2000). La coloration du dos de l'ombre de fontaine

va du vert olive au brun foncé. Les flancs sont plus pâles et marqués de points rouges cernés de bleu.



Figure 1 Ombles de fontaine

L'omble de fontaine mesure en moyenne entre 20 et 30 cm de long mais peut atteindre une taille beaucoup plus grande dans certains plans d'eau. Son poids moyen varie entre 1 et 3 kg mais certains spécimens de 6 kg ont déjà été rapportés. Son corps, de forme caractéristique aux salmonidés, est allongé, fusiforme et légèrement comprimé latéralement. Les mâchoires, la langue et le palais sont dotés de dents bien développées lui permettant d'être un carnivore efficace. Chez les mâles matures sexuellement, la mâchoire inférieure se termine en crochet et la coloration de l'abdomen s'intensifie pour devenir orange vif en période de reproduction (Bernatchez, 2000).

Distribution mondiale et habitat naturel

L'omble de fontaine dulcicole est une espèce endémique de l'est de l'Amérique du Nord mais a été introduite avec succès, à la fin du XIX^e siècle, dans de nombreux pays tempérés (Figure 2). Elle se retrouve dans les cours d'eau et les lacs où l'eau est très fraîche, moins de 20°C, claire et bien oxygénée (MLCP, 1982). Les individus anadromes de l'espèce, également appelés truite de mer, vivent en mer et frayent en eau douce (LeJeune, 1987).

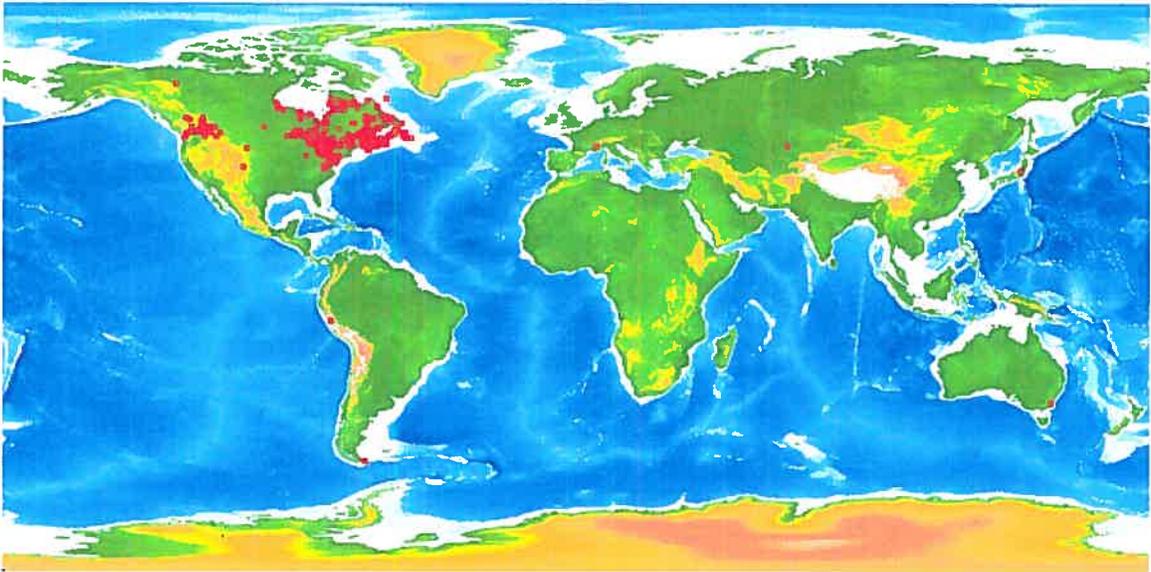


Figure 2 Distribution sommaire de l'omble de fontaine indiquée par les zones rouges (carte interactive sur le site web : <http://www.iobis.org/Welcome.htm>).

Importance économique au Québec

L'omble de fontaine, par sa beauté, son tempérament combatif et l'excellence de sa chair, est un des poissons les plus populaires au Québec (Figure 2; Bernatchez, 2000). Sa popularité est telle que la ville de St-Alexis-des-Monts en Mauricie s'en dit la capitale. Dès 1857, la popularité de la pêche sportive crée le besoin de développer l'élevage de cette espèce afin de reconstituer les populations des milieux naturels. L'ensemencement est encore aujourd'hui la raison première de la production de ce salmonidé (MLCP, 1982; Lapointe, 1990; Morin, 2004). Ce n'est qu'en 1980 que les pisciculteurs québécois étendent leur production au marché de la table et cette expansion atteint son apogée en 1998. Cependant, dès 2000, en raison des impacts environnementaux négatifs de ce développement important, le gouvernement québécois instaure une nouvelle réglementation. Étant particulièrement préoccupé par l'eutrophisation accélérée des milieux aquatiques par les rejets piscicoles, la nouvelle loi oblige, entre autre, les pisciculteurs à diminuer de 40% la charge globale annuelle de phosphore (P) rejetée dans les milieux

aquatiques passant de 7,2 à 4,2 kg de P par tonne de production d'ici 2014 (MAPAQ, 2005).

La sévérité grandissante des lois concernant la protection de l'environnement impose donc aux éleveurs de restreindre leur production créant ainsi des limites financières ne permettant pas la survie de ces entreprises dans un marché de plus en plus compétitif. Afin d'apporter une solution aux pisciculteurs touchés, la Table filière de l'aquaculture en eau douce du Québec (TFAEDQ) a mis sur pied la Stratégie de développement durable de l'aquaculture en eau douce au Québec (STRADDAQ) pour permettre la conciliation d'un développement économique vigoureux dans une approche environnementale saine. La STRADDAQ mobilise tous les partenaires du milieu tel que l'Association des Aquaculteurs du Québec (AAQ), le Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs (MDDEP) et le Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation (MAPAQ) afin de favoriser de nouvelles technologies aquicoles et de bonnes pratiques d'élevage (MAPAQ, 2005). À ce niveau, le secteur nutritionnel, élaborant des régimes alimentaires à teneur limitée en phosphore et/ou ayant une meilleure biodisponibilité, est essentiel à la résolution de ce problème qui pourrait s'avérer être un facteur limitant de la croissance et du développement de l'aquaculture au Québec et au Canada.

La furonculose

La furonculose est probablement la maladie la plus étudiée chez les poissons depuis l'identification en 1894 de l'agent causal, *Aeromonas salmonicida* alors appelée *Bacterium salmonicida*, à partir d'une pisciculture de truites brunes en Allemagne (Austin, 1993). En Amérique du Nord, le premier rapport de furonculose a été fait en 1902 dans une pisciculture du Michigan aux États-Unis. L'identification de l'agent pathogène, nommé *Bacillus truttae* par M.C. Marsh, a alors été cité dans un article du magazine *Science* (Austin, 1993).

Encore aujourd'hui, *A. salmonicida* est certainement la bactérie pathogène des poissons la plus connue et la plus étudiée. Ses effets dévastateurs lors d'épidémies dans

l'industrie piscicole, sa répartition mondiale et la grande variété de poissons pouvant être affectés causent cet intérêt.

L'agent pathogène

Aeromonas salmonicida est une bactérie à Gram négatif, anaérobique facultative, en forme de bâtonnet coccoïde ou coccobacille, de la famille des *Aeromonadaceae*. Le genre *Aeromonas* se divise en deux groupes distincts. Le groupe d'*A. salmonicida* est composé de bactéries psychrophiles et non mobiles. Dans l'autre groupe, les *Aeromonas* sont mésophiles, mobiles et se divisent en trois espèces : *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* et *Aeromonas sobria* (Bergey, 1984). L'espèce *A. salmonicida* du premier groupe se subdivise en quatre sous-espèces distinctes : *salmonicida*, *mascoucida*, *achromogenes* et *smithia* (Bergey, 1994). Plus récemment, une 5^{ème} sous-espèce, *pectinolytica*, a été reconnue (Pavan, 2000; Björnsdottir, 2005). La bactérie responsable de la furonculose classique chez les salmonidés est *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Ass). Les 4 autres sous-espèces sont liées à la forme atypique de la maladie caractérisée par des ulcères et des lésions cutanés avec ou sans septicémie chez différentes espèces piscicoles (Cipriano, 2001).

L'identification préliminaire d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* se fait par la présence d'un pigment brun diffus autour des colonies sur milieu TSA (Tryptone Soya Agar) et par la possibilité de glisser ou pousser les colonies isolées à l'aide de l'anse du manche de Koch (Stoskopf, 1993; Noga, 1996). L'identification définitive doit cependant se faire à l'aide de tests biochimiques, immunologiques (détection Ac) ou génétiques (PCR).

Facteurs de virulence

La bactérie *A. salmonicida* a besoin de différents facteurs de virulence pour pouvoir infecter un hôte, survivre à ses mécanismes de défense et se propager. La couche protéique S (*S-layer : surface layer*) est absolument nécessaire à la virulence de *A. salmonicida*. Cette membrane extérieure ancrée aux LPS permet l'adhésion à une grande variété de surfaces et de cellules en plus de jouer un rôle essentiel dans la résistance au système

immunitaire de l'hôte et dans la protection contre les environnements hostiles (Ebanks, 2005). Ce facteur de virulence est éliminé si la bactérie est incubée à de trop hautes températures (à partir de 25°C). Les LPS, communs aux bactéries à Gram négatif, sont situés sous la couche S. Seules les souches d'*A. salmonicida* possédant des LPS intacts et une couche S sont virulentes pour l'omble de fontaine (Cipriano, 1989). Les protéases, les lipases tel que la GCAT (glycérophospholipide cholestérol acyltransférase) et d'autres toxines moins connues (H-lysine et les peptides hémolytiques ASH3 et ASH4) font également partie des facteurs de virulence. Le manque de connaissance du rôle de ces facteurs impliqués dans le développement de la furonculose ainsi que l'incapacité pour les truites de produire des anticorps contre ces même facteurs font que la vaccination des salmonidés contre cette maladie est inefficace (Kaattari, 1996).

La maladie

La furonculose affecte particulièrement les salmonidés tant en milieu naturel qu'en pisciculture. L'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) et la truite brune (*Salmo trutta*) sont des espèces très sensibles tandis que la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) est plus résistante (Blake, 1932; McCarthy, 1977; Cipriano, 1983). La furonculose a une répartition mondiale chez les poissons de plusieurs espèces de tous âges, tant en eaux douces que saumâtres ou salées. L'infection se produit généralement lorsque les poissons sont stressés par des conditions naturelles ou d'élevage inadéquates (Bernoth, 1997). L'augmentation de la température de l'eau, la diminution de l'oxygène dissout, les facteurs physico-chimiques variables et une surpopulation sont souvent en cause. L'âge, le système immunitaire de l'hôte et les différentes lignées génétiques d'une espèce vont également influencer le taux de mortalité des individus infectés (Cipriano, 2001; Cipriano, 2002).

Signes cliniques

La furonculose se retrouve le plus souvent sous forme de septicémie aiguë caractérisée par un taux de mortalité élevé et peu de lésions externes visibles (Bernoth, 1997). Les éleveurs de salmonidés subissent alors des pertes de cheptel importantes causant de graves dommages financiers en peu de temps.

Lors d'infections chroniques, il y a développement de signes cliniques se caractérisant par l'apparition de furoncles c'est-à-dire de lésions cutanées ressemblant à de grosses papules. De plus, un noircissement cutané, une congestion des branchies, une nécrose musculaire, une exophtalmie plus ou moins prononcée, des hémorragies cutanées et viscérales, une liquéfaction du pronéphros, une pâleur du foie et un gonflement de la rate peuvent être observés. Des signes cliniques de refus alimentaire, difficultés natatoires ou nage près de la surface, comportement apathique et tachypnée s'ajoutent généralement (Austin, 1993; Stoskopf, 1993; Bernoth, 1997; Cipriano, 2001). La mortalité est plus faible lors de la forme chronique de la maladie. La guérison est possible et laisse parfois quelques cicatrices. Elle permet la sélection de poissons dits porteurs sains.

Forme sous-clinique ou latente

La forme latente de la furonculose se retrouve chez les poissons asymptomatiques porteurs de *A. salmonicida* ou ceux ayant développé une résistance suite à l'infection bactérienne. Hiney (1997) stipule qu'un porteur sain est un poisson qui ne manifeste aucun signe clinique de la furonculose mais où il y a présence de la bactérie *A. salmonicida*, de ses antigènes ou de son ADN. Les bactéries peuvent se retrouver à différents sites tel que le mucus cutané, les nageoires, les branchies et dans l'intestin permettant ainsi sa dispersion dans le milieu. Le pronéphros est l'organe considéré comme le réservoir primaire tant chez les poissons malades que les porteurs sains (McCarthy, 1977; Noga, 1996). Le déclenchement de la maladie chez les porteurs asymptomatiques par l'induction de stress est la meilleure méthode de détection puisqu'il n'existe encore aucun test fiable (Hiney, 1994; Noga, 1996).

Transmission

Les porteurs sains sont la cause principale de transmission horizontale de la furonculose dans les piscicultures lors de l'arrivée de nouveaux poissons (Olivier, 1992) ou par la présence indésirable d'espèces sauvages dans les bassins d'élevage (McCarthy, 1977). La contamination peut se faire par cohabitation ou par contact direct. La maladie est difficile à éradiquer puisque les bactéries peuvent résister plusieurs jours dans l'environnement, sur le matériel contaminé et dans l'eau des bassins (McCarthy, 1977). De plus, il a été démontré par Wooster et Bowser (1996) qu'*A. salmonicida* peut se disperser par des aérosols (Cipriano, 2001) ce qui facilite grandement sa dissémination à travers le milieu (transmission latérale). *A. salmonicida* reste un pathogène extracellulaire obligatoire des poissons même si sa survie dans l'environnement est possible jusqu'à l'infection d'un nouvel hôte (Gibson, 1977; Austin, 1993; Enger, 1997). La transmission verticale, c'est-à-dire la contamination des œufs via les ovaires et les testicules, est également possible mais moins étudiée car considérée insignifiante par rapport à la transmission horizontale (Smith, 1996; Cipriano, 2001).

Système immunitaire des poissons

Organes et cellules

Les téléostéens, dont font partie les salmonidés, sont le groupe le plus large et le plus avancé de la phylogénie des poissons. De par cette évolution, il est connu que la plupart des composantes de leur système immunitaire sont similaires à celles retrouvées chez les vertébrés supérieurs (Raison, 2002). Cependant, parce que les poissons sont un groupe plus hétérogène que les mammifères, des différences majeures peuvent exister entre et dans chaque classe (Tizard, 2000). Afin d'être concis, l'information résumée dans cette section sera plus particulièrement reliée aux salmonidés.

Les poissons téléostéens n'ont pas de nœuds lymphatiques ni de moelle osseuse. Les tissus hématopoïétiques se situent principalement dans le rein, le thymus et la rate. L'épithélium intestinal et la lamina propria contiennent des cellules lymphoïdes. Des

lymphocytes B et T matures ont été retrouvés dans l'épiderme de la peau et dans la paroi intestinale (Thuvander, 1990; Tizard, 2000). Les monocytes isolés du sang et les macrophages se retrouvant dans plusieurs sites dont le mésentère, la rate, le rein et l'oreillette du cœur ont une forte activité phagocytaire. Des centres de mélanomacrophages c'est-à-dire des agrégations de macrophages contenant des pigments de mélanine et d'hémosidérine se retrouvent dans la rate, le foie et le rein (Tizard, 2000). Les granulocytes se subdivisent en neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Les neutrophiles sont capables de phagocytose et sont également appelés hétérophiles. Les basophiles sont souvent inexistantes selon les espèces (Secombes, 1996).

Rein

Chez les poissons, le rein est un organe long et mince, qui suit la colonne vertébrale ventralement. Il possède la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse des vertébrés supérieurs. Il est également l'organe lymphoïde primaire principal c'est-à-dire le site majeur de la production et de la différenciation des lymphocytes (Tizard, 2000). Plus précisément, le rein se divise en deux sections distinctes. La partie antérieure du rein, également appelée pronéphros, est le compartiment lympho-myéloïde constituant un réservoir et un site de différenciation cellulaire des précurseurs sanguins (Press, 1994). On y retrouve, dans le stroma du tissu réticulo-endothélial, des macrophages, des blastocytes et des lymphocytes T et B matures (Thuvander, 1990). De plus, à la suite d'une stimulation antigénique, le pronéphros est un producteur majeur d'anticorps et son parenchyme a la capacité de séquestrer les antigènes pour de longues périodes (Zapata, 1996). L'opisthonéphros, la portion centrale et postérieure du rein, est également hématopoïétique mais a comme fonction principale l'élimination des déchets métaboliques (excrétion) comme chez les mammifères (Tizard, 2000). Le micro-environnement créé par le rein est exploité tant par le système immunitaire que par le système endocrinien et permet une communication paracrine entre les cellules (Weyts, 1999).

Thymus

Le thymus est considéré comme le deuxième organe lymphoïde primaire par la présence des nombreux anticorps s'y retrouvant et parce qu'il est également la source

principale des cellules immunocompétentes subséquentes à la sélection négative des lymphocytes T. Cet organe bilobé se retrouve sur la paroi dorso-latérale du pharynx entre le premier et le quatrième arc branchial permettant ainsi un accès direct aux antigènes pénétrant par les branchies (Takashima, 1982). Deux zones se distinguent soit le cortex, zone externe contenant habituellement plus de lymphocytes T et la médulla, zone centrale contenant les plasmocytes producteurs d'anticorps. Les réponses du thymus sont influencées par l'âge du poisson, les signaux hormonaux et les saisons (Tizard, 2000). Les expériences de thymectomie effectuées sur les téléostéens affectent la maturation du système immunitaire tout comme chez les vertébrés supérieurs ce qui prouve la similitude des rôles affectés à cet organe (Zapata, 1996).

Rate

La rate est un organe lymphoïde secondaire filtrant le sang pour y enlever les particules antigéniques et les vieilles cellules sanguines. Sa structure et sa localisation chez les poissons est similaire à celle des mammifères mais chez les téléostéens, la zone marginale délimitant la pulpe rouge de la pulpe blanche n'est pas aussi bien définie (Zapata, 1996; Tizard, 2000). La pulpe rouge sert de réservoir d'érythrocytes et de piège pour les antigènes de la circulation sanguine. La pulpe blanche, riche en lymphocytes, est le siège de la réponse immunitaire. Leur rôle dans la liaison et la transformation des antigènes (*Ag binding/processing*) et dans la production d'anticorps a été démontré mais reste encore controversé (Zapata, 1996).

Immunité reliée aux muqueuses

On retrouve dans le système immunitaire des poissons des amas de tissus lymphoïdes associés à l'épithélium gastrique et intestinale (GALT ou *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), à la peau (SALT ou *Skin-Associated Lymphoid Tissue*) et aux branchies (BALT ou *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*). Ces accumulations de tissus retrouvées dans les muqueuses sont considérées comme des organes lymphoïdes secondaires et contiennent des lymphocytes, macrophages, plasmocytes ainsi que différents types de granulocytes tel que basophiles, éosinophiles et hétérophiles selon l'espèce de poisson. Ces

tissus lymphoïdes sont exposés directement à l'environnement extérieur et donc considérés comme la première ligne de défense contre les agents pathogènes (Zapata, 1996).

Immunité innée

D'un point de vue évolutif, le système immunitaire inné ou non spécifique a été pendant longtemps le seul mécanisme de défense contre les agents pathogènes potentiels tels que bactéries, virus, fungus, protistes et parasites (Bayne, 2001). Ce système est la première ligne de défense d'un organisme puisqu'il réagit rapidement à l'attaque d'un agent pathogène en empêchant l'attachement, l'invasion et la multiplication de celui-ci sans aucune reconnaissance préliminaire. L'immunité innée contrôle la croissance de l'agent infectieux et contribue à son élimination avant même que l'immunité acquise ne se développe. De plus, son activation est indépendante de la température ce qui est un avantage certain pour les animaux poïkilothermes tel que les poissons. Comme point de comparaison, la réponse inflammatoire s'active entre 1 et 2 jours suivant le début de l'infection tandis que la production d'anticorps peut prendre entre 4 et 6 semaines, à une température optimale pour une espèce donnée, avant d'être complète (Ellis, 2001).

Immunité humorale non spécifique

La peau, le mucus et l'enveloppe des œufs créent une première barrière physique et chimique aux agents pathogènes invasifs et font ainsi partie des composantes du système immunitaire inné. Le mucus de la peau et les œufs contiennent des substances capables d'inhiber la croissance bactérienne (Yano, 1996). Le mucus, en plus de sa capacité de piéger avec des mucopolysaccharides visqueux, contient plusieurs substances antibactériennes à large spectre tel que des peptides anti-microbiens (ou PAMs), des lectines, le lysozyme et des protéines de phase aiguë (*acute phase proteins* ou APP) (Ellis, 2001). Bayne (2001) fait une revue détaillée de toutes les APP du système immunitaire inné chez les poissons.

Le plasma contient également plusieurs facteurs bactéricides ou bactériostatiques. Le lysozyme et les lectines se retrouvent en plus grandes concentrations dans le plasma que

dans le mucus. La transferrine (IBP) a une haute affinité pour le fer et empêche ainsi sa disponibilité pour les bactéries. Les anti-protéases comme la α 2-macroglobuline sont efficaces contre les toxines protéolytiques émises par *A. salmonicida*. Le système du complément est également une composante majeure de l'immunité innée puisqu'il peut être activé directement par les LPS bactérien (voie alternative) mais aussi par les anticorps (voie classique) et indirectement par la protéine C-réactive et les lectines attachées aux surfaces bactériennes (Yano, 1996; Ellis, 2001). Les trois classes d'interférons impliqués dans l'inhibition de la réplication virale (α , β et γ) existent également chez les téléostéens (Yano, 1996).

Immunité cellulaire non spécifique

Une multitude de cellules sont impliquées dans les défenses non spécifiques, incluant les monocytes et macrophages, les granulocytes (hétérophiles, éosinophiles et basophiles chez certaines espèces de poissons) et les cellules cytotoxiques NCC (nonspecific cytotoxic cells) équivalentes aux cellules NK des mammifères (Secombes, 1996). Les cellules phagocytaires, les hétérophiles et plus particulièrement les macrophages, sont les agents centraux de la défense cellulaire non spécifique. Ils ingèrent les particules étrangères via la phagocytose, supportent la réponse inflammatoire par la synthèse et la sécrétion de peptides anti-microbiens et de cytokines, et aident indirectement à la production des anticorps par les lymphocytes B en agissant comme cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules NCC sont capables d'éliminer les cellules tumorales, les cellules infectées par des virus et les parasites protozoaires (Secombes, 1996).

Immunité acquise

L'immunité acquise chez les poissons est complémentaire et interdépendante de l'immunité innée tout comme chez les mammifères. Ce système de défense spécifique, quoi que complet, est tout de même plus primitif que celui retrouvé chez les vertébrés supérieurs. L'immunité acquise a un développement beaucoup plus récent ce qui peut

expliquer pourquoi elle est beaucoup moins diversifiée que l'immunité innée (Bayne, 2001).

Immunité humorale spécifique

D'un point de vue évolutif, la réponse humorale est apparue pour la première fois chez les téléostéens qui possédaient tout l'arsenal cellulaire (cellules présentatrices d'antigènes, lymphocytes T auxiliaires et lymphocytes B) nécessaire à la production d'anticorps. Les poissons ne possèdent qu'une seule classe d'immunoglobuline, les IgM, d'une structure en pentamère semblable aux immunoglobulines des mammifères. En fait, les similitudes portent sur la structure de base de l'immunoglobuline mais aussi sur l'ensemble des cellules impliquées dans l'induction des anticorps et du rôle de ces derniers au niveau de la neutralisation, la précipitation et l'agglutination, la fixation du complément et l'opsonisation (Kaattari, 1996). La production d'anticorps spécifiques à un antigène est optimisée par une température élevée. La concentration d'immunoglobulines sériques, le titre naturel des anticorps et le nombre de lymphocytes augmentent lors d'une augmentation de la température (Alcorn, 2002).

La connaissance des anticorps, de la mémoire immunitaire et du système immunitaire spécifique, en relation avec la température, a une implication primordiale dans le développement de vaccins efficaces. Dans le domaine piscicole, l'usage d'antibiotiques et d'agents chimiques pour combattre les infections étant limité, l'immunoprophylaxie est la méthode idéale pour prévenir les maladies infectieuses tant d'un point de vue environnemental qu'économique.

Immunité cellulaire spécifique

L'immunité cellulaire spécifique qui a été étudiée chez les vertébrés inférieurs par des expériences de transplantation d'organes (de peau) s'est révélée être un modèle similaire à celui des mammifères. Le phénomène de rejet de greffe, particulièrement des allogreffes c'est-à-dire d'une greffe d'organe d'un membre de la même espèce mais avec une constitution génétique différente, a démontré la spécificité antigénique impliquant les lymphocytes T cytotoxiques et le CMH I (complexe majeur d'histocompatibilité) ainsi que

la mémoire immunologique. Des expériences de thymectomie et d'hypersensibilité ont également démontré des aspects cellulaires de l'immunité acquise semblables à ceux retrouvés chez les vertébrés supérieurs (Clem, 1991; Manning, 1996).

Les poissons possèdent des populations de lymphocytes B et T analogues à ceux des mammifères. Les lymphocytes B affichent des récepteurs de surface membranaire (BCR) impliqués dans la mémoire cellulaire lors d'une réponse immunitaire secondaire. Ils jouent également le rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA) en présentant, par le CMH II, un peptide antigénique aux lymphocytes T auxiliaires après endocytose et transformation (*processing*) de celui-ci. De plus, la maturation des lymphocytes B en plasmocytes permet la production d'immunoglobulines solubles. La prolifération des lymphocytes B peut être stimulée *in vivo* par l'ajout d'un agent mitogène c'est-à-dire d'une substance qui induit l'entrée en mitose d'une cellule. Les LPS (lipopolysaccharides) présents à la surface des bactéries *Escherichia coli* (Gram négatif) vont stimuler de manière spécifique les lymphocytes B (Janeway, 2003).

Les lymphocytes T possèdent également des récepteurs membranaires (TCR) qui, n'étant pas formellement identifiés par les molécules CD4, CD8 ou CD3 spécifiques des mammifères, sont tout de même de familles homologues. Les lymphocytes T se divisent en deux populations distinctes. Les cellules T auxiliaires reconnaissent les particules antigéniques présentées par le CMH II exprimé en surface des CPA (lymphocytes B, macrophages). Les cellules T cytotoxiques peuvent tuer toutes les cellules nucléées infectées par des virus et exprimant le CMH I en surface. L'agent mitogène ConA (concanavaleine A) est une lectine provenant de la plante légumineuse *Canavalia ensiformis* (pois sabre ou *Jack bean*) qui reconnaît de façon spécifique les α -glucides et α -mannoses présents à la surface des lymphocytes T. Con A est un mitogène polyclonal puisqu'il permet l'induction de la mitose des lymphocytes T de spécificité différente (auxiliaires et cytotoxiques) lors de tests de transformation lymphoblastique *in vivo* (Janeway, 2003).

L'interaction entre les cellules du système immunitaire est possible grâce aux liaisons entre les structures de surfaces cellulaires et les récepteurs mais implique également une grande variété de cytokines solubles. L'interleukine 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-

4, IL-6, les interférons α (IFN α), β (IFN β) et γ (IFN γ), le facteur d'activation des macrophages (MAF), TNF (*tumour necrosis factor*), TGF β_1 (*transforming growth factor*), les CF (*chemotactic factor*) et les MIF (*migration inhibition factor*) sont toutes des protéines produites par des cellules qui modifient le comportement d'autres cellules. Elles ont donc une implication capitale dans l'immunité innée et acquise et leurs fonctions sont similaires à celles retrouvées chez les mammifères (Manning, 1996).

Nutrition et immunité

La compréhension du système immunitaire et l'avancement de l'immunologie se sont développés la fin du 19^{ième} siècle grâce aux travaux de Pasteur, Metchnikoff, Behring et Ehrlich. Depuis, de nombreuses expérimentations ont prouvé que la malnutrition et les carences alimentaires diminuent la résistance aux infections. L'importance de la nutrition sur les différents paramètres immunitaires est maintenant évidente. Les études portant sur les carences vitaminiques ont clairement démontrées une immunosuppression. Ce n'est que depuis 1980 que les études se penchent plus précisément sur l'effet des carences en minéraux. La plupart des espèces animales ont besoin de 17 minéraux essentiels. Le calcium, le phosphore, le magnésium, le sodium, le potassium, le chlore et le soufre sont les sept macro minéraux qui composent 99% des minéraux du corps tandis que le fer, le zinc, le sélénium, le manganèse, l'iode, le cuivre, le molybdène, le chrome, le cobalt et le fluor sont les dix éléments traces qui composent le 1% restant. Selon Spallholz (1989), le phosphore ne semblerait pas avoir un effet unique et indépendant du système immunitaire et du système endocrinien. On peut donc s'attendre à retracer les conséquences d'une déficience de cet élément à plusieurs niveaux du métabolisme.

Régulation des besoins en minéraux chez les poissons

Contrairement aux mammifères, les poissons ont la possibilité d'absorber certains minéraux inorganiques non seulement de leur alimentation mais aussi directement de leur environnement extérieur, par les branchies et la peau, tant en eau douce qu'en eau salée. Les salmonidés peuvent absorber du calcium, du magnésium, du sodium, du potassium, du fer, du zinc et du cuivre de l'environnement aquatique pour combler leurs besoins

nutritionnels tandis que les phosphates, les chlorures et les sulfates doivent absolument être absorbés à partir de l'alimentation (Lall, 1989; Baeverfjord, 1998). Cette homéostasie des minéraux, incluant celle du calcium et du phosphore, peut différer selon les espèces vivant en eaux douces ou salées (Vielma, 1998). Elle va également être influencée par le système endocrinien qui joue un rôle dans l'absorption et l'excrétion aux niveaux intestinal et rénal mais aussi dans l'adsorption ou la résorption osseuse. En effet, le squelette des téléostéens, comme celui des mammifères, sert de réservoir de calcium, de phosphore et d'autres ions continuellement en équilibre avec les électrolytes du sang et des liquides extracellulaires (Lall, 1989). Une diète contenant une grande quantité de minéraux (cendres), particulièrement de calcium, doit être supplémentée et balancée avec d'autres minéraux; par exemple, un déséquilibre peut prédisposer les saumons de l'Atlantique à la maladie bactérienne du rein (BKD) (Lall, 1989).

Effets des carences alimentaires sur le système immunitaire des poissons

Il est connu que les carences nutritionnelles sont susceptibles de diminuer la réponse immunitaire et la résistance aux infections (Roberts, 1989; Ghittino, 1989; Blazer, 1989; Blazer, 1992). Puangkaew, en 2004, a démontré qu'une carence alimentaire en vitamine E (α -tocophérole) cause une détérioration non spécifique des fonctions immunitaires cellulaires et humorales chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'activité de la voie alternative du complément, les immunoglobulines plasmatiques totales, la phagocytose, l'activité du lysozyme, la production d'anions superoxydes et la cytotoxicité cellulaire ont été évaluées suite à une alimentation déficiente ou supplémentée en vitamine E pendant 15 semaines. De façon générale, une augmentation de la vitamine E dans la diète semble stimuler l'activité du lysozyme et de la phagocytose mais pas la cytotoxicité cellulaire et la voie alternative du complément. Ces résultats corroborent ceux de Blazer (1984a) qui a fait différentes analyses de la réponse immunitaire spécifique et non spécifique chez la même espèce *Salmo gairdneri* Richardson (ancien nom de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*) avec une diète contrôle standard et une diète carencée en vitamine E pour une durée variant entre 12 et 17 semaines. Dans les deux études mentionnées, les poissons alimentés avec la diète déficiente ont démontré une diminution de la réponse immunitaire selon les paramètres examinés mais ont tous eu un taux de

croissance et un taux de mortalité similaire aux poissons nourris avec une diète équilibrée. L'alimentation déterminée pour la meilleure croissance possible n'est donc pas nécessairement la plus apte à assurer une réponse immunitaire fonctionnelle (Blazer, 1992).

Effets des carences en phosphore sur le système immunitaire

Chez l'humain, les patients nourris par alimentation parentérale sont sujet à une sévère hypophosphatémie et à des infections fongiques et bactériennes récurrentes. Ainsi, Craddock (1974) a recréé cette hypophosphatémie chez des chiens afin d'en démontrer les effets négatifs sur le contenu cellulaire en ATP impliquant la dysfonction de plusieurs réactions métaboliques et immunitaires. Il avance également que les cellules incapables de se diviser tel que les globules rouges, les plaquettes, les cellules du cerveau et les leucocytes sont désavantagés lors d'une carence en phosphore.

De façon générale, les études portant sur les besoins en phosphore indiquent qu'une carence augmente la mortalité chez les poissons (Baeverfjord, 1998; Lellis, 2004). Certains chercheurs ont révélés que de faibles niveaux de phosphore ont des effets négatifs sur les paramètres hématologiques et les concentrations du phosphore dans le sérum (Kiersztejn, 1992; Vielma, 1998; Kegley, 2001; McDaniel, 2005). Le compte cellulaire des érythrocytes, lymphocytes et thrombocytes, lors d'une simple prise de sang, serait un mauvais indicateur de l'immunité chez les poissons vu la variabilité des résultats d'un poisson à l'autre, d'une espèce à l'autre et d'une expérience à l'autre (Leonardi, 2003).

Dans son étude, Jokinen (2003) a détecté une diminution significative des niveaux d'IgM dans le sang des corégones (*Coregonus lavaretus* L.) nourris avec un régime faible en phosphore mais une réponse humorale normale a été stimulée chez ces mêmes poissons injectés avec le BGG (*bovine gamma globulin*). La production passive d'IgM par les lymphocytes a donc été fortement diminuée mais les différences n'étaient pas significatives pour la production d'anticorps anti-BGG spécifiques suite à l'injection de l'antigène. L'activité du lysozyme n'a pas été influencée par les diètes déficientes en P lors de ces deux expérimentations. Il a été conclu dans cette étude que la mouleée faible en phosphore avait peu d'effets sur la croissance et sur le système immunitaire de cette espèce lorsque ces effets sont évalués par la production d'anticorps et l'activité du lysozyme. Par contre, dans

l'étude de Eya (1998), la production d'anticorps chez les barbottes (*Ictalurus punctatus*) a été améliorée par un régime élevé en phosphore suite à une infection expérimentale avec la bactérie *Edwardsiella ictaluri*, indiquant de ce fait une meilleure activité lymphocytaire. La mortalité était tout de même plus élevée chez les poissons nourris avec une diète faible en P.

Méthodologie

Les protocoles qui suivent ont été élaborés dans un contexte de nutrition en relation avec le système immunitaire. La spécificité des expérimentations a été adaptée à l'espèce *Salvelinus fontinalis*. L'essai nutritionnel s'est déroulé en utilisant des moulées de concentrations spécifiques en phosphore. Les tests immunologiques et les essais infectieux ont été également adaptés à l'espèce utilisée.

Essai nutritionnel

Espèce utilisée et design expérimental

Nous avons utilisé 2500 juvéniles (36 g) de l'espèce *Salvelinus fontinalis* ou omble de fontaine provenant de la pisciculture des Alléghanys (St-Philémon, Qc) et certifiés sans maladie. Ils sont arrivés au LARSA (Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques) du pavillon Charles-Eugène Marchand de l'Université Laval à Québec le 6 avril 2005 et ont été répartis dans deux bassins (1250 poissons/bassin) de 1000 litres pour un mois (Annexe1). Durant cette période d'adaptation à l'environnement et aux paramètres physico-chimiques de l'eau, les poissons ont été nourris avec la moulée commerciale de la pisciculture d'origine (Annexe 2). Ils ont par la suite été redistribués dans deux autres unités de trois bassins. L'unité 3, divisée en trois bassins de 1000 litres (416 poissons/bassin), contenait les 1250 poissons alimentés avec la diète normale en phosphore. L'unité 4, divisée de la même façon, contenait les 1250 autres poissons alimentés avec la diète faible en phosphore.

L'utilisation des animaux pour cette étude s'est conformée aux politiques et aux normes de l'Université de Montréal ainsi qu'à celles du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et ce, pour toutes les étapes du projet. L'ensemble du protocole a également été approuvé par le Comité de déontologie animale de la Faculté de médecine vétérinaire.

Bassins et systèmes du LARSA

Tous les bassins des unités 3 et 4 du LARSA sont en circuit fermé (recirculation de l'eau à 95%) et ont un volume de 3 mètres cube. L'eau douce initiale (pH variant autour de 7,5), y est déchlorée et stérilisée aux rayons ultraviolets. La température a été de $12 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant toute cette phase de l'expérience et la photopériode correspondait, en temps réel, à celle de la ville de Québec (latitude nord $46^\circ 49' 00''$; longitude ouest $71^\circ 13' 00''$). La biomasse a été maintenue entre 30-40 Kg/m^3 . L'évaluation des paramètres physico-chimiques (pH, oxygénation, température, ammoniacque, nitrites) et l'entretien des bassins ont été effectués quotidiennement par le personnel du LARSA. Les mortalités et les anomalies étaient également notées.

Diètes expérimentales

La fabrication de la moulée s'est déroulée au pavillon des services de l'Université Laval sous la supervision du Dr Grant Vandenberg du Département de sciences animales. Le Dr Vandenberg possède une expertise dans l'alimentation, la nutrition et la physiologie animale dans le contexte particulier de l'aquaculture. La recette spécifique (Annexe 3) de la moulée équilibrée en phosphore (Normo-P) et de la moulée faible en phosphore (Low-P) est basée sur le protocole expérimental de Gabriel Koffi D. KoKo, étudiant à la maîtrise du Dr Vandenberg. La fabrication des diètes expérimentales a été élaborée selon les procédures de Hardy (1989). Les ingrédients secs et l'huile de poisson ont été mélangés puis passés à la cubeuse avec de la vapeur d'eau chaude (California Laboratory Pellet Mill, Crawfordsville, IN, USA). La moulée humide a été étendue sur des plaques puis séchée toute une nuit dans un séchoir (Oven Precision Scientific, Kent City, MI, USA). Le lendemain, la moulée sèche et solide a été tamisée pour enlever les particules fines et la poussière. Afin d'augmenter l'appétence, de l'huile de poisson a été ajoutée à raison de 10% du poids de la moulée. Les ingrédients et la moulée préparée ont été entreposés au réfrigérateur à 4°C . Le régime faible en phosphore (0% CaHPO_4) contenait 0,49% de phosphore ou 0,14 g de phosphore digestible par MJ d'énergie. La moulée équilibrée (1,5% CaHPO_4) contenait 0,80% de phosphore ou 0,28 g de phosphore digestible par MJ d'énergie (Annexe 4).

Protocole d'alimentation

La moulée Nutra Fry™ de la compagnie Skretting (anciennement Moore-Clark) d'une grosseur de 3 mm et provenant de la pisciculture des Alléghanys (St-Philémon, Qc) a été utilisée suite au transfert des poissons au LARSA. Ils ont ensuite été acclimatés à la moulée Corey Vigor™ de 3 mm afin d'être nourris avec de la moulée commerciale pendant la fabrication de la moulée expérimentale jusqu'au début de l'expérience (Annexe 2). Les rations ont été calculées avec les biomasses obtenues lors des pesées à l'arrivée des poissons (Annexe 1). L'administration des rations s'est faite selon une table de croissance (Annexe 7) pour laisser le temps aux biofiltres (système d'épuration des eaux usées par cultures microbiennes) de s'inoculer correctement.

L'expérience utilisant la moulée expérimentale (l'unité 3 avec la diète normale en phosphore et l'unité 4 avec la diète faible en phosphore) a débutée le 13 juillet 2005. Pendant les deux premiers jours, les poissons ont été nourris à satiété à raison de 2 repas par jour (8h00 et 15h00). Ensuite, la quantité moyenne quotidienne de moulée utilisée lors de ces deux journées a été distribuée aux poissons avec des alimentateurs à courroies (Zeigler Brothers Inc., Po Box 95, Gardners, PA 17324) les jeudis, dimanches et lundis. Les vendredis et samedis étaient des journées de jeûne. Cet horaire a été respecté jusqu'à atteindre un maximum de 1200 g de moulée par bassin. Cette ration de moulée maximum correspondait à la limite permise par le protocole du LARSA pour le bon fonctionnement des biofiltres. À partir du 31 août 2005, les rations ont été plafonnées à 900 g par bassins. Finalement, le 14 septembre 2005, après un dénombrement précis du nombre de poissons par bassins pour déterminer la biomasse exacte, les rations ont été calculées à 100% des chartes commerciales avec un FCR (ration de conversion alimentaire) de 1.0. Les rations calculées étaient alors de 700 g par bassin. L'arrêt du protocole d'alimentation (résumé de l'échéancier à l'Annexe 5) s'est fait le 11 novembre 2005 afin de permettre un jeûne de 3 jours avant le transfert des poissons du LARSA de Québec au laboratoire d'écotoxicologie de la station d'épuration des eaux usées de Montréal pour les essais infectieux.

Procédures pour tests immunitaires

Milieux de culture

Le milieu de base pour les suspensions cellulaires de pronéphros était du RPMI 1640 avec L-glutamine et sans bicarbonate de sodium (GIBCO, cat. #31800-014). Le milieu a été dilué dans un volume d'eau ultra pure et le pH tamponné à 7,4 avec de l'HEPES (10 mM) (Sigma, USA). De la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) (Sigma, USA) ont également été ajoutées pour empêcher la croissance bactérienne ainsi que 0,5 mg/mL de sodium pyruvate (Sigma, USA) pour donner un apport énergétique aux cellules. Le milieu a été stérilisé par filtration au travers un filtre de 0,2 µm (Nalgene) puis gardé à 4°C jusqu'à son utilisation. Les différents types de milieu de culture étaient préparés 24 à 48 heures avant d'être utilisés pour les protocoles expérimentaux. Le RPMI *héparine* est le milieu de base plus 0,1% héparine (Hepalean® 10,000 unités U.S.P./mL) et 20% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Sigma, USA). Le RPMI *phago* est le milieu de base plus 10% SVF et le RPMI *transfo* est le milieu de base plus 5% SVF, 5% de sérum de truite (ST) (SeaGrow, EastCoast Bio, Inc) et 0,4 µL de 2-mercaptoéthanol (Sigma, USA) par 100 mL de milieu.

Échantillonnage

Durant l'essai nutritionnel, 5 poissons de chaque diète ont été échantillonnés tous les 28 jours, au hasard, dans les bassins des unités 3 (Normo-P) et 4 (Low-P). Les dates de prélèvements d'échantillons étaient le 13 juin, 5 juillet, 2 août, 30 août, 27 septembre et 25 octobre 2005 entre 8h30 et 12h30 au LARSA de l'Université Laval.

Euthanasie

Les poissons ont été euthanasiés dans un bain anesthésiant de MS-222 (*Tricaine-methane-sulfonate*, TMS™) à une dose de 100 mg/L. L'euthanasie était évaluée par la perte totale des mouvements des branchies, le décubitus latéral du poisson et l'absence de réaction aux manipulations (Stoskopf, 1993). Afin de confirmer l'euthanasie, le poisson était décérébré juste avant le prélèvement d'organes.

Pesée et prélèvement sanguin

Suivant l'euthanasie, chaque poisson a été pesé. Ensuite, 1 cc de sang était prélevé dans l'aorte dorsale du pédoncule caudal. Une seringue de 1 cc ou 3 cc héparinée (Hepalean® 10,000 unités U.S.P./mL) et une aiguille 26G^{5/8} ont été utilisées. Le sang recueilli était transféré dans un micro tube de 1,5 mL en prenant soin d'enlever l'aiguille pour éviter l'hémolyse. Les échantillons étaient gardés dans la glace concassée avant d'être centrifugés 10 minutes à 1500 rpm pour isoler le plasma. Le plasma était transféré dans un autre micro tube puis congelé à -20°C. Ces manipulations ont été réalisées à partir des protocoles de Brousseau (1999) et Marlène Fortier de INRS-IAF, Pointe-Claire (2004).

Prélèvement d'organes et identification du sexe

À partir de cette étape, toutes les manipulations ont été faites sous la hotte pour maintenir l'asepsie. Sur un poisson fraîchement euthanasié et décérébré, le foie et les arcs branchiaux 2 et 3 ont été prélevés puis congelés à -20°C. Le sexe du poisson, selon les gonades, était noté lors de la dissection. Le pronéphros a été isolé puis prélevé le plus stérilement possible avec une lame de scalpel. Il était ensuite centré sur un tamis cellulaire stérile lui-même déposé sur un pétri stérile. Le broyage du pronéphros au travers le grillage se faisait avec le bout plat d'un piston de seringue. Les débris cellulaires du tamis ont été rincés avec du RPMI *héparine*. La suspension cellulaire se retrouvant dans le fond du pétri était homogénéisée dans un volume final de 7 mL de RPMI *héparine*. Cette suspension était ensuite transférée dans un tube de 15 mL contenant préalablement 3 mL de gradient de densité Lympholyte-M (Cedarlane, #CL5035) puis centrifugée (Labofuge A 2503, Heraeus Christ Sepatec) 45 minutes à 1500 rpm à la température de la pièce. La mince couche blanche contenant les leucocytes à l'interface du gradient et de la suspension cellulaire était transférée dans un tube puis lavée 2 fois dans du RPMI *phago* en étant centrifugée 10 minutes à 1200 rpm. Le culot cellulaire résultant des lavages était finalement suspendu dans 2 mL de RPMI *phago* puis examiné au microscope pour le décompte cellulaire. Entre chaque poisson, la lame de scalpel, le tamis cellulaire et le piston de seringue étaient nettoyés à l'alcool isopropylique, rincés avec du PBS stérile (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma D8537) puis séchés avec des gazes stériles. Ces manipulations ont

été réalisées à partir des protocoles de Brousseau (1999), Lacroix, (2001) et Dautremepuits (2005).

Dénombrement cellulaire et contrôle de la viabilité

Un dénombrement du nombre de cellules immunitaires de chaque suspension de pronéphros a été fait avant chaque test. Pour faire le dénombrement cellulaire d'un échantillon, il fallait mélanger 50 μL de la suspension cellulaire à 50 μL de bleu trypan (0,4%). La viabilité cellulaire était déterminée par l'exclusion du colorant par les cellules. Une viabilité de 80% et plus était acceptable. Le dénombrement cellulaire s'est fait par lecture des deux chambres de l'hémacytomètre (Neubauer) au microscope optique. Une différence de 10% maximum entre les deux chambres était acceptable. Le volume de l'échantillon a ensuite été ajusté pour avoir la concentration finale de $1,0 \times 10^6$ cellules/mL pour le test de phagocytose et $2,0 \times 10^6$ cellules/mL pour le test de transformation. Ces manipulations ont également été réalisées à partir des protocoles de Brousseau (1999), Lacroix, (2001) et Dautremepuits (2005).

Tests immunologiques

Phagocytose

Pour les tests de phagocytose, un volume final de 1,5 mL de chaque suspension cellulaire de concentration 1×10^6 cellules était divisé en deux aliquotes de 500 μL comme duplicata. Le 500 μL restant était conservé en cas d'imprévu. Des microbilles de latex (Polysciences, #17687-5) contenant de la fluorescéine (1,76 μm , excitation 488 nm, émission 520 nm) étaient passées aux ultrasons pour 20 secondes afin de défaire les agrégats. La détermination du nombre de billes par mL se fait selon la formule :

$$\frac{6W * 10^2}{\Pi * \delta * \beta^3}$$

W = grammes de polymère / mL (0,025 g pour solution de latex de 2,5%)

Π = 3,1416

δ = densité du polymère (g/mL) \rightarrow 1,05 pour le latex

β = diamètre des billes de latex

Les billes étaient ajoutées à l'échantillon pour avoir une proportion de 100 billes pour 1 cellule (100 :1) soit 5,6 uL de microbilles de latex pour chaque aliquote de 500 µL de suspension cellulaire à $1,0 \times 10^6$ cellules/mL. Les échantillons étaient ensuite incubés dans l'obscurité pour 18 heures à 15°C. Après l'incubation, pour séparer les cellules phagocytaires des billes libres, il fallait déposer chaque suspension billes-cellules dans un tube avec bouchon contenant préalablement un gradient de 3% de BSA (MP Biomedical) dilué dans du RPMI *phago*. La suspension billes-cellules était centrifugée (Labofuge A 2503, Heraeus Christ Sepatec) à 800 rpm pour 8 minutes puis une partie du surnageant était prélevée, à l'aide d'une pipette jetable, afin d'éviter que les billes libres ne restent collées aux parois. Le reste du surnageant était décanté. Le culot était ensuite remis en suspension à l'aide d'un vortex puis ajouté à 1 mL de solution de fixation. Cette solution a été préparée avec du liquide pour FACS flow (BD Bioscience) contenant 0,5% de formaldéhyde (Sigma, USA) et 0,2% d'azide de sodium (Sigma, USA) afin de fixer les cellules pour le transport. Les tubes étaient gardés à l'abri de la lumière jusqu'au laboratoire d'analyses de Michel Fournier à l'Institut Armand-Frappier de Pointe-Claire à Montréal. Les lectures de fluorescence ont été faites par cytométrie à flux avec le FACSCalibur (Becton Dickinson) et les données analysées à l'aide du programme Cell Quest (Becton Dickinson). Ces manipulations sont tirées des protocoles de Thuvander (1987), Brousseau (1999), Lacroix (2001) et Dautremepuits (2005).

Transformation lymphoblastique

Pour la blastogenèse, la suspension cellulaire était ajustée à $2,0 \times 10^6$ cellules/mL. Un volume de 100 µL de chacune des suspensions était ensuite déposé, avec 100 µL de concanavaline A. (ConA) (40 µg/ml) (Sigma-Aldrich, On, Canada) pour la stimulation des lymphocytes T, 100 µL de lipopolysaccharides (LPS) (125 µg/mL) (Sigma-Aldrich, On, Canada) pour la stimulation des lymphocytes B et 100 µL de RPMI *transfo* pour les contrôles négatifs de cellules non stimulées, dans des puits distincts sur une plaque de 96 puits à fonds ronds. Les concentrations utilisées étaient de 2,5, 5, 10, 20, 40 et 80 µg/mL pour ConA et de 25, 50, 100, 200 et 400 µg/mL pour LPS. Les mitogènes (Con A et LPS) ainsi que le RPMI *transfo* étaient incubés avec les cellules pour une période de 72 heures à 15°C. Après cette incubation, un volume de 20 µL de ^3H -méthyle-thymidine (0,5 µCi)

(ICN Biomedicals, CA, USA), était ajouté à chacun des puits et incubé à nouveau dans les mêmes conditions pour 18 heures. À la fin de cette dernière incubation, les plaques étaient congelées à -20°C . Une fois bien congelées, elles étaient emballées sécuritairement et de manière à les garder congelées pour le transport jusqu'au laboratoire d'analyses de Michel Fournier à l'Institut Armand-Frappier de Pointe-Claire à Montréal. Pour les analyses, les plaques étaient dégelées puis les cellules étaient récoltées sur un papier filtre en fibre de verre (Skatron Instruments As, Lier Norway) à l'aide d'un récolteur cellulaire semi-automatique (Skatron Instruments As, Lier, Norway). La radioactivité contenue dans l'ADN des cellules en multiplication a été mesurée en DPM (désintégrations par minute) par un compteur à scintillation β (LKB Wallac, ChemGen Corp., MD, USA). Les valeurs ont ensuite été exprimées en index de stimulation (IS) i.e. le DPM moyen des cellules stimulées avec les mitogènes sur le DPM moyen des contrôles négatifs de non stimulation. Ces manipulations sont tirées des protocoles de Warr (1983), Tillitt (1988), Brousseau (1999) et Dautremepuits (2005).

Infections expérimentales

Installations

Les infections expérimentales ont été effectuées au laboratoire d'écotoxicologie de la station d'épuration des eaux usées de Montréal, situé à Rivière-des-Prairies, qui a pu accueillir les poissons Normo-P et Low-P dans 12 bassins de 150 litres (Annexe 6). Ces bassins sont en circuit ouvert, remplis d'une eau propre irradiée aux ultraviolets, déchlorée (moins de $0,002\text{ mg/L}$), pH 7, avec un taux de renouvellement aux 2 heures et un taux d'oxygénation de 100% par bullage à l'air (pierre et compresseur). La température a été stabilisée à $14 \pm 1^{\circ}\text{C}$ et ajustée selon les besoins (entre 8 et 22°C). La biomasse était entre 25 et 40 kg/m^3 au maximum pour chaque bassin. La séquence de photopériode était de 16 heures d'éclairement et 8 heures d'obscurité avec une période de transition de 30 minutes où la lumière se tamisait graduellement. L'évaluation des paramètres physico-chimiques de l'eau était faite de manière continue grâce aux installations présentes à la station ou encore

à l'aide de la multisonde YSI 6820 relié à l'afficheur 650 MDS (YSI Environmental, Yellow Springs, Ohio).

Les poissons en réserve pour les autres infections expérimentales ont été maintenus dans les installations de messieurs Adonia et Claude Dorval de *Aquaculture Blainville* (414 Côte St Louis, Blainville, Québec) et séparés selon leur type de diète dans 2 bassins circulaires de 4,57 m de diamètre alimentés en eau de source d'une température variant entre 9 et 11°C. Pour chaque installation, les poissons étaient nourris à satiété les lundis, mercredis et vendredis de chaque semaine.

Souches bactériennes

Afin d'assurer la pathogénicité bactérienne, deux souches d'*A. salmonicida* ont été utilisées pour cette expérience. La première souche (souche naturelle : SN) a été fournie par le Dr Carl Uhlund de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe et provenait d'une pisciculture d'ombles de fontaine affectées de furunculose. Les bactéries avaient été isolées du pronéphros d'un poisson malade, puis congelées à -20°C. Pour confirmer la virulence avant l'infection bactérienne, la souche a été ensemencée dans un bouillon TSB puis injectée IP dans un échantillon de 4 poissons nourris avec de la moulée Normo-P afin de reproduire la maladie. Les bactéries ont ensuite été re-isolées à partir des poissons ayant développé la maladie en étant ensemencées sur géloses TSA et incubées à 15°C. Un repiquage sur gélose TSA était fait aux 3 jours pour maintenir la souche fraîche jusqu'à la première infection.

La deuxième souche utilisée (souche standard : SS) provenait du centre de bioressources ATCC (The Global Bioresource Center TM). La souche d'*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC[®] #14174TM entreposée à -80°C a été ensemencée dans un bouillon TSB puis incubée 24 heures à 15°C pour permettre sa croissance.

Suspension bactérienne

Pour chaque inoculum, deux tubes stériles contenant chacun 10 mL de TSB étaient inoculés avec un prélèvement de culture pure d'*A. salmonicida* incubée depuis un maximum de deux ou trois jours à 15°C sur gélose TSA. Ces tubes étaient ensuite incubés à 15°C

pendant 24 à 72 heures jusqu'à ce que le TSB devienne trouble par la croissance bactérienne. À partir de cette suspension fraîche, la surface entière de 36 géloses TSA étaitensemencée en confluence, avec un écouvillon, afin d'obtenir un tapis bactérien complet et épais après une incubation de trois jours à 15°C. Suite à cette dernière incubation, les tapis bactériens de 6 géloses étaient recueillis puis déposés dans un tube stérile rempli de 3 mL de TSB. Au total, 6 tubes contenant chacun 3 mL de TSB et 36 géloses (6 géloses par tubes) étaient donc nécessaires. Pour finir, toutes les suspensions bactériennes étaient groupées dans un seul tube stérile de 50 mL pour avoir une suspension mère finale de 18 mL gardée au frais jusqu'à l'infection. Une infection expérimentale nécessitait 10 mL de suspension mère soit 1 ml par bassin pour les bassins #1 à #10 et 8 ml était gardé en réserve en cas d'imprévue. Ce protocole permettait d'avoir une concentration mère constante de $5,5 \times 10^{10}$ cfu/mL déterminée par dilution et comptage sur gélose. Cette concentration de suspension mère permettait d'obtenir une concentration finale de $7,3 \times 10^5$ cfu/mL dans les bassins pour induire l'infection chez les poissons.

Période d'adaptation initiale

Une période d'adaptation de 27 jours a permis une stabilisation des mortalités occasionnées par le stress du changement de milieu des poissons entre Québec et Montréal. Les poissons se sont acclimatés aux nouvelles installations, aux différents paramètres physico-chimiques de l'eau et à la nouvelle routine d'alimentation du laboratoire d'écotoxicologie de la station d'épuration des eaux usées. À leur arrivée, l'eau était à $12 \pm 1^\circ\text{C}$ puis a graduellement été augmentée pour être stabilisée à $14 \pm 1^\circ\text{C}$.

Pré-essai #1

Le premier pré-essai d'infection a débuté le 12 décembre 2005 et s'est déroulé sur une période de 16 jours. Tous les poissons des bassins #1 à #10 ont été infectés avec la souche naturelle (SN) d'Ass en étant plongés pendant 15 minutes dans un bain de suspension bactérienne (Marquis, 1986). Pour ce bain, l'entrée d'eau a été fermée et le volume des bassins diminué de moitié avant l'ajout de la suspension bactérienne. Afin de faciliter l'entrée des bactéries, la nageoire adipeuse a été coupée sur chaque poisson anesthésié. Nous avons utilisé 40 truites Normo-P distribuées dans les bassins #1, 3, 5, 7, 9

(8 poissons/bassin) et 45 truites Low-P dans les bassins #2, 4, 6, 8, 10 (9 poissons/bassin). Le bassin témoin #11 contenait 9 poissons sains provenant de la station d'écotoxicologie et ayant toujours mangé de la moulée commerciale Corey. Le bassin témoin #12 contenait 17 poissons, soit 4 Low-P et 13 Normo-P identifiés par la coupe de la nageoire pectorale droite. Les poissons des bassins témoins ont subi les mêmes manipulations que les autres mais sans infection bactérienne (détail de la distribution à l'annexe 6). La température de l'eau des bassins était maintenue à $14,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pour les 4 premiers jours puis a été augmentée graduellement à $16,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ afin de créer un stress aux poissons. La mortalité était notée à chaque jour.

Pré-essai #2

Le deuxième pré-essai infectieux a débuté le 28 décembre 2005 et s'est déroulé sur une période de 20 jours sur les mêmes poissons que ceux utilisés à la première infection. Lors d'un changement total d'eau, 1 mL de la souche standard d'*Aeromonas* ATCC #14174 en bouillon TSB a été directement vaporisé sur les poissons alors que les bassins étaient complètement vides. La concentration bactérienne de $5,5 \times 10^{10}$ cfu/mL a ensuite été diluée dans 150 litres d'eau lors du remplissage des bassins. Les poissons sont restés en contact prolongé avec les bactéries jusqu'à ce que le taux de renouvellement de l'eau ait complètement éliminé la suspension bactérienne. La température élevée était de $16,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pour une période de 11 jours. Ensuite, afin de créer un choc thermique encore plus important, cette température a été descendue à 9°C en 24 heures pour être remontée à 18°C pour une durée de 3 heures puis finalement revenir à la température initiale élevée de 16°C pour 6 jours. La mortalité était notée à chaque jour. À la fin de cette expérience, tous les poissons infectés, avec ou sans signes de la maladie, ont été euthanasiés par une surdose de MS-222.

Infection #1

Avant l'arrivée des nouveaux poissons pour l'infection #1, l'eau des bassins a été réajustée à 9°C . Tous les bassins ont été vidés, nettoyés et désinfectés à l'hypochlorite de sodium pour ensuite être bien rincés et remplis avec de l'eau propre et fraîche. Les poissons ont disposé d'une journée pour s'acclimater au stress dû au transport entre la pisciculture de

Blainville et la station d'épuration des eaux usées de Montréal (environ 45 minutes) avant de subir l'infection.

L'infection #1 a débuté le 18 janvier 2006 et s'est déroulée sur une période de 14 jours. Tous les poissons des bassins #1 à #10 ont été infectés avec la souche naturelle (SN) d'*A salmonicida* en étant plongés pendant 30 minutes dans un bain de suspension bactérienne de concentration $7,3 \times 10^5$ cfu/mL déterminée par comptage sur gélose. Comme pour le pré-essai #1, l'entrée d'eau a été fermée et le volume des bassins diminué de moitié avant l'ajout de la suspension bactérienne. Afin de faciliter l'entrée des bactéries, la nageoire adipeuse a été coupée sur chaque poisson anesthésié. Nous avons utilisé 125 truites Normo-P distribuées dans les bassins #1, 3, 5, 7, 9 (25 poissons /bassin) et 125 truites Low-P dans les bassins #2, 4, 6, 8, 10 (25 poissons/bassin). Le bassin témoin #11 contenait 20 truites saines ayant toujours mangé de la moulée commerciale Corey. Le bassin témoin #12 a reçu 10 truites Normo-P identifiées par la coupe de la nageoire pectorale droite et 10 truites Low-P qui ont toutes été injectées intra péritonéale (IP) avec 0,2 cc de la même suspension bactérienne que celle utilisée pour les bains. Suite au bain de 30 minutes, la température a été augmentée pour créer un choc thermique important passant de 9°C à 18°C en 24 heures pour une période de quatre jours puis redescendue à 15°C jusqu'à la fin de l'infection. La mortalité était notée à chaque jour. Après la période de 14 jours d'infection, tous les poissons survivants ont été euthanasiés par une surdose de MS-222.

Infection #2

L'infection #2 a débuté le 6 février 2006 et s'est déroulée sur une période de 14 jours. Le protocole suivi était le même que celui de l'infection #1. Par contre, les poissons ont disposé d'une période d'adaptation de 6 jours avant l'infection. Nous avons utilisé 23 poissons par bassin. Le bassin témoin #11 contenait 5 poissons Normo-P et le bassin témoin #12, 5 poissons Low-P. Les poissons des bassins témoins ont subi les mêmes manipulations que les autres mais sans infection bactérienne. Le protocole de température était le même qu'à l'infection #1. La mortalité était notée à chaque jour. Après la période de

14 jours d'infection, tous les poissons survivants ont été euthanasiés par une surdose de MS-222.

Infection #3

L'infection #3 a débuté le 2 mars 2006 et s'est déroulée sur une période de 14 jours. Le protocole suivi était le même que celui des infections #1 et #2. Les poissons ont disposé d'une période d'adaptation de 6 jours avant l'infection. Nous avons utilisé 23 poissons par bassins séparés comme pour les autres essais. Le bassin témoin #11 contenait 23 poissons Normo-P et le bassin témoin #12, 23 poissons Low-P. Les poissons des bassins témoins ont subi les mêmes manipulations que les autres mais sans infection bactérienne. Le protocole de température était le même qu'aux infections #1 et #2. La mortalité était notée chaque à jour. Après la période de 14 jours d'infection, tous les poissons survivants ont été euthanasiés par une surdose de MS-222.

Autopsie des poissons suites aux infections

Les poissons morts ou moribonds suite aux infections étaient recueillis chaque jour puis congelés à -20°C. Tous les poissons survivants à la période d'infection étaient euthanasiés puis également congelés. Chaque poisson était identifié selon son type de moule et la date du décès. Les carcasses étaient par la suite transférées à la Faculté de médecine vétérinaire à St-Hyacinthe puis décongelées partiellement pour permettre leur dissection. La cause de mortalité a été déterminée par nécropsie et par culture bactérienne d'un prélèvement provenant du pronéphros pour s'assurer que la furunculose avait été reproduite. La croissance bactérienne a été évaluée sur une échelle semi quantitative de 1+ pour indiquer une faible croissance à 4+ pour une forte croissance sur gélose. Le poids a été noté ainsi que la confirmation du sexe par l'évaluation des gonades. Toutes les anomalies et les particularités ont été notées lors de ces manipulations.

Analyses statistiques

Le poids moyen a été évalué, à l'aide du test ANOVA à deux voies, chez le groupe de poissons Normo-P et le groupe de poissons Low-P au cours de l'essai nutritionnel. La

valeur de $P < 0,05$ a été choisie comme valeur seuil pour la détermination d'une différence significative. Une analyse de survie de Kaplan-Meier a été utilisée pour tester l'effet du poids sur la survie des poissons lors des infections, indépendamment du type de moulée consommé. Les poissons ont été classés en deux catégories soit « petits » s'ils pesaient moins de 250 grammes et « gros » s'ils pesaient plus de 250 grammes. Pour la phagocytose, l'évaluation statistique a été faite en utilisant le logiciel SigmaStat 3,0. Pour chaque groupe de poisson, les variations ont été exprimées en \pm écart moyen. Les différences entre les groupes ont été évaluées en utilisant le test ANOVA Multiple Comparaison (Holm-Sidak). La valeur de $P < 0,05$ a été choisie comme valeur seuil pour la détermination d'une différence significative et $P < 0,01$ pour une différence hautement significative. L'analyse de survie de Kaplan-Meier a été utilisée pour évaluer les différences au niveau de la survie entre les poissons Low-P et Normo-P et pour tester l'effet du sexe et du poids. Une valeur de $P < 0,05$ a été choisie comme valeur seuil pour la détermination d'une différence significative. Cette analyse de survie a également été utilisée pour tester l'effet du sexe au niveau de la survie chez les poissons, indépendamment du type de moulée consommé.

Résultats

Essai nutritionnel

Les diètes expérimentales

La moulée déficiente en phosphore (Low-P) et la moulée équilibrée en phosphore (Normo-P) ont été analysées par l'équipe du Dr Grant Vandenberg du Département des sciences animales de l'Université Laval (Annexe 4). Les analyses ont été faites en triplicata, pour chaque type de moulée, pour les teneurs en phosphore (P), de matière sèche (*DM*) et de cendres (*ASH*). La valeur moyenne de P total retrouvée dans la matière sèche de la moulée était de 0,49 % pour la Low-P et de 0,80 % pour la Normo-P. Par contre, le pourcentage de P qui était assimilable par les poissons (P dig.) était de 0,24% pour la Low-P et 0,47 % pour la Normo-P. Donc, 48,6 % du P était assimilable dans la moulée Low-P et 58,7 % dans la moulée Normo-P par rapport au P total présent. La quantité de P assimilable par le poisson sur l'énergie totale assimilable (P dig / E dig) était de 0,138 g/MJ d'énergie pour la Low-P et 0,227 g /MJ d'énergie pour la Normo-P.

Période d'alimentation

La durée totale de l'essai nutritionnel, entre la première journée de consommation de moulée expérimentale Normo-P ou Low-P le 13 juillet 2005 et la fin des essais infectieux le 16 mars 2006, a été de 247 jours. Le tableau I qui suit donne un aperçu des dates importantes des procédures expérimentales effectuées durant cette étude et le nombre de jours de consommations de moulée associé.

Tableau I Dates importantes des procédures expérimentales effectuées durant l'essai nutritionnel.

Procédure	Date de début de la procédure	Jours de consommation de moulée expérimentale
Test immun #1 (essai)	13 juin 05	--
Test immun #2 (essai)	5 juillet 05	--
Début de l'alimentation*	13 juillet 05	0*
Test immun #3	2 août 05	21
Test immun #4	30 août 05	49
Test immun #5	27 septembre 05	77
Test immun #6	25 octobre 05	105
Transfert + adaptation	14 novembre 05	125
Essai infectieux #1	18 janvier 06	190
Essai infectieux #2	6 février 06	209
Essai infectieux #3	2 mars 06	233
Fin de l'essai nutritionnel	16 mars 06	247

Évolution du poids des poissons

Les poissons pesaient environ 36 g au début de l'expérience (Annexe 1) et entre 280 g et 300 g à la fin de l'essai nutritionnel (Figure 3), après 247 jours de consommation de moulée expérimentale (Tableau I). Les dates de pesée examinées étaient le 14 septembre et le 13 octobre 2005 lors d'un recensement des unités au LARSA, le 1 février 2006 à la fin de l'infection #1, le 20 février 2006 à la fin de l'infection #2 et finalement le 16 mars 2006 à la fin de l'infection #3 et de l'essai nutritionnel. Il y a eu une augmentation du poids des poissons durant toute la période de l'essai nutritionnel. Cette augmentation était significativement plus élevée chez les poissons Low-P comparée à celle des poissons Normo-P (Figure 3).

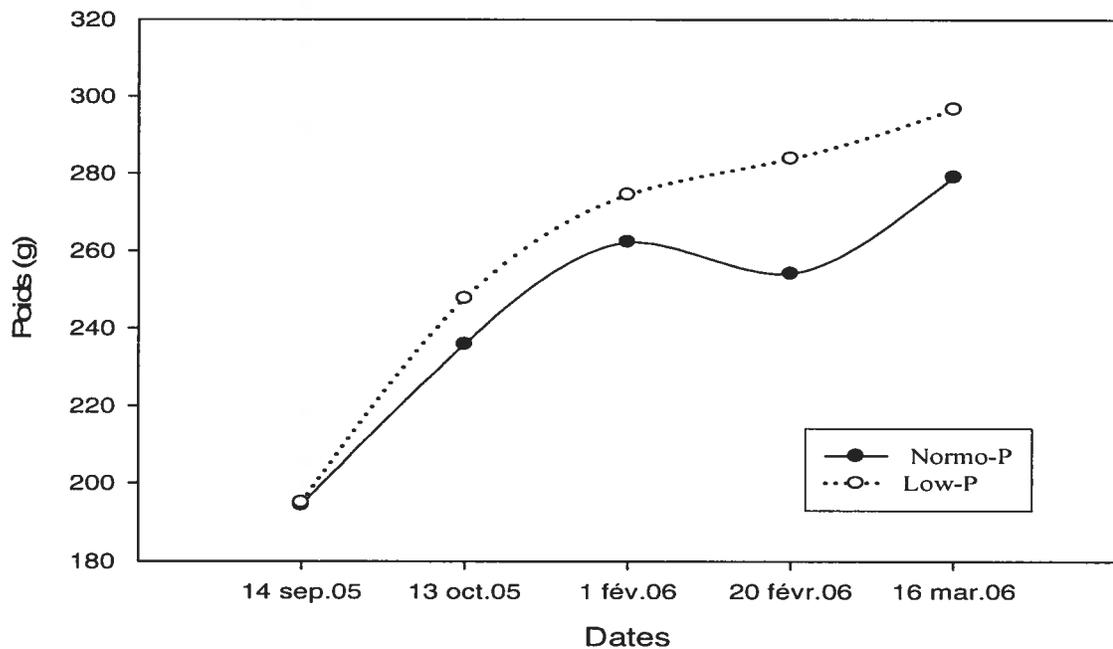


Figure 3 Évolution du poids moyen des ombles de fontaine pour la période d'alimentation expérimentale.

Effet du poids sur la survie des poissons

Les poissons de chaque groupe ont été nourris de manière identique durant toute la durée de l'étude. Le modèle d'analyse de survie de Kaplan-Meier a révélé qu'il n'y avait aucun effet du poids lors de la période d'adaptation ($P = 0,96$). Par contre, la survie était significativement moindre chez les plus gros poissons pour l'infection #1, ($P = 0,02$), l'infection #2 ($P = 0,03$) et l'infection #3 ($P = 0,006$), indépendamment du sexe (Figure 4). Le poids semble donc avoir un effet sur la survie des poissons lorsque ceux-ci sont exposés à un agent pathogène puisque les individus plus gros (> 250 g) survivent moins longtemps que les plus petits (< 250 g).

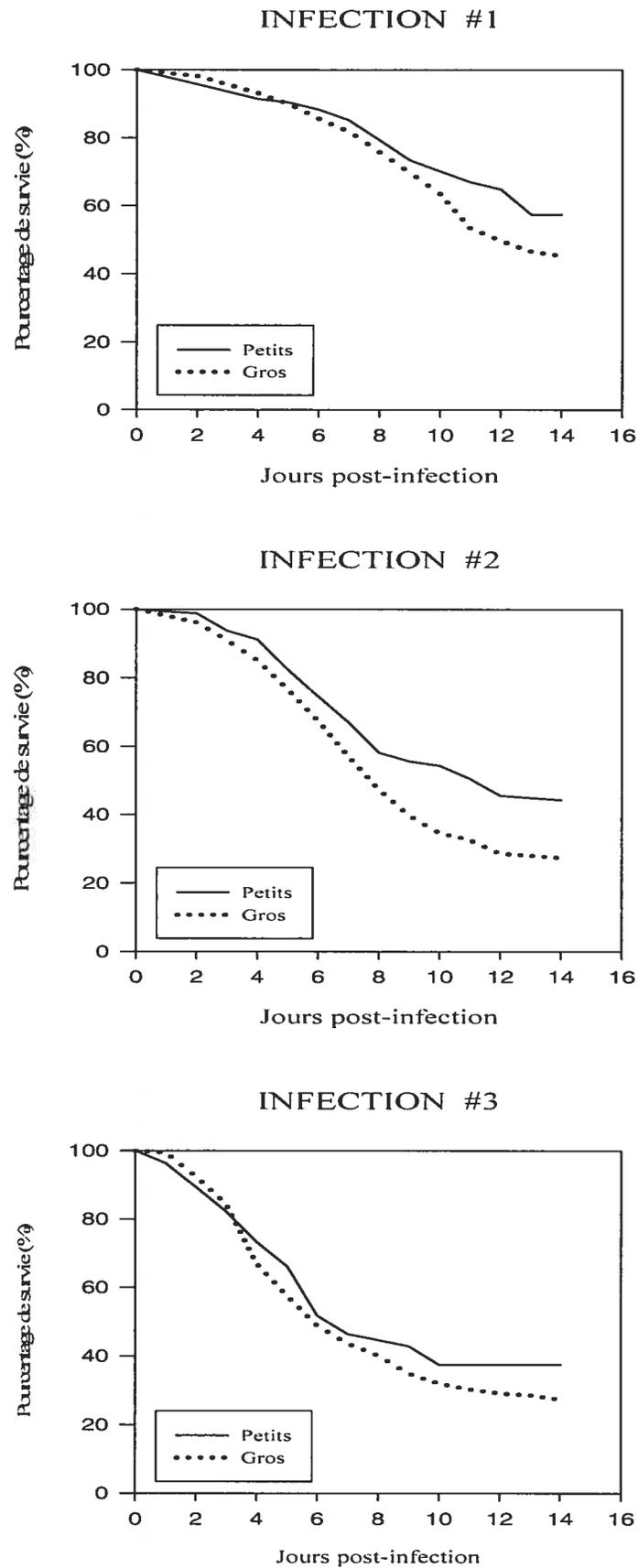


Figure 4 Effet du poids sur la survie des poissons lors des infections avec la bactérie *Aeromonas salmonicida*.

Observations durant l'essai nutritionnel

Les premières modifications morphologiques et comportementales ont été observées en date du 30 août 2005, lors des prélèvements en vue des 4^{ième} tests immunologiques de phagocytose et de transformation lymphoblastique, soit après 49 jours de consommation de moulée expérimentale (Tableau I). Une diminution de l'appétit et des changements morphologiques chez les poissons carencés en phosphore ont été notés. Les poissons Low-P avaient une cavité abdominale distendue. Ils étaient plus ronds et plus courts que les poissons Normo-P (voir image dans la section Discussion). Dans la cavité abdominale, on retrouvait une accumulation de gras blanchâtre. Le foie était plus friable et de couleur non uniforme. Ces observations se sont maintenues jusqu'à la fin de l'essai nutritionnel.

L'alimentation à satiété des poissons des deux groupes durant l'essai nutritionnel au LARSA a apporté des modifications physico-chimiques de l'eau des bassins par la surcharge de matière organique sur les biofiltres. Les poissons des deux groupes ont été exposés à des niveaux élevés d'azote ammoniacal et de nitrites dans le système. Le stress causé par ces conditions environnementales sub-optimales a déclenché des infections récurrentes fongiques et bactériennes à *Flexibacter columnaris*. Ces infections ont été contrôlées par des traitements réguliers de bains de formol à 250 mg/litre, par un traitement de dix jours à l'oxytétracycline sous forme de bain à 100 mg/L, par une augmentation de la salinité à 4‰, par l'ajustement des rations alimentaires et par l'entretien accru des bassins. Les infections cutanées étaient présentes de façon similaire chez les deux groupes et la mortalité constante dans tous les bassins. À ce point, une perte d'environ 15% des poissons de chaque groupe a été constatée.

En date du 25 octobre 2005, lors des derniers prélèvements en vue des 6^{ième} tests immunologiques de phagocytose et de transformation lymphoblastique, soit après 105 jours de consommation de moulée expérimentale (Tableau I), la présence de plusieurs individus, surtout des mâles, ayant atteint la maturité sexuelle a été observée. L'éjaculation chez les mâles lors des manipulations et la présence de très gros œufs dans les gonades des femelles confirmaient l'atteinte de la maturité sexuelle chez les individus.

D'autres observations ont pu être faites durant les 247 jours de l'essai nutritionnel. Des déformations de la colonne vertébrale ont pu être notées mais n'étaient pas fréquentes, ne représentant qu'environ 1% des poissons Low-P à la fin de l'expérience. De plus, il a été constaté lors du déménagement des poissons de Québec vers Montréal que les poissons alimentés par la moulée faible en phosphore étaient moins résistants aux triages et au stress dû au transport, avec une mortalité sensiblement supérieure suite à ces manipulations. Cette dernière observation de la mortalité n'a cependant pas été quantifiée. Finalement, un faible pourcentage des poissons Low-P a également développé des problèmes de flottabilité. Ces observations demeurent tout de même ponctuelles.

Tests immunologiques

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire obtenue suite au dénombrement des cellules immunitaires de chaque suspension de pronéphros était entre 66,3% et 78,9% lors du 1^{ier} échantillonnage du 13 juin 2005, entre 86,5% et 94,0% lors du 2^{ième} échantillonnage du 5 juillet 2005, entre 79,9% et 91,7% pour le 3^{ième} échantillonnage du 2 août, entre 79,5% et 95,0% pour le 4^{ième} échantillonnage du 30 août, entre 74,3% et 92,1% pour le 5^{ième} échantillonnage du 27 septembre et finalement entre 66,0% et 90,0% pour le 6^{ième} échantillonnage du 25 octobre 2005. La viabilité cellulaire ne semble pas avoir été influencée par les diètes en phosphore chez les deux groupes de poissons.

Phagocytose

L'activité phagocytaire représente le nombre de cellules actives capables de phagocytose tandis que l'efficacité phagocytaire est le nombre de billes qu'une cellule active peut ingérer. Ces paramètres phagocytaires des cellules du pronéphros ont été évalués à 4 reprises durant l'essai nutritionnel soit le 2 août, le 30 août, le 27 septembre et le 25 octobre (Tableau I). Aucune différence significative au niveau de l'activité phagocytaire n'a été observée entre les poissons ayant consommé de la moulée Normo-P et ceux ayant consommée de la moulée Low-P, indépendamment du sexe (Figure 5A). Une

tendance à la hausse a pu cependant être remarquée pour l'activité phagocytaire des poissons Low-P et ce lors de tous les tests immunologiques effectués durant l'essai nutritionnel. L'activité phagocytaire a été plus élevée chez les deux groupes aux jours 49 et 77 de la consommation de moulée expérimentale par rapport aux jours 21 et 105. L'efficacité phagocytaire, c'est-à-dire le nombre de billes qu'un phagocyte peut ingérer, a également été évaluée en mesurant le nombre de cellules qui ont phagocyté 3 billes et plus. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'efficacité phagocytaire des cellules prélevées chez les poissons Low-P et Normo-P (Figure 5B).

En considérant l'activité phagocytaire selon le sexe des poissons, une différence significative a été observée aux jours 49 chez les mâles et aux jours 77 chez les femelles (Figure 6). De plus, la tendance observée de l'activité phagocytaire plus élevée aux jours 49 et 77 de consommation de moulée expérimentale par rapport aux jours 21 et 105 s'est retrouvée chez les deux sexes (Figure 6). Il n'y a eu aucun échantillonnage de poisson mâle du groupe Low-P lors de la manipulation #5, après 77 jours de consommation de moulée expérimentale (Figure 6).

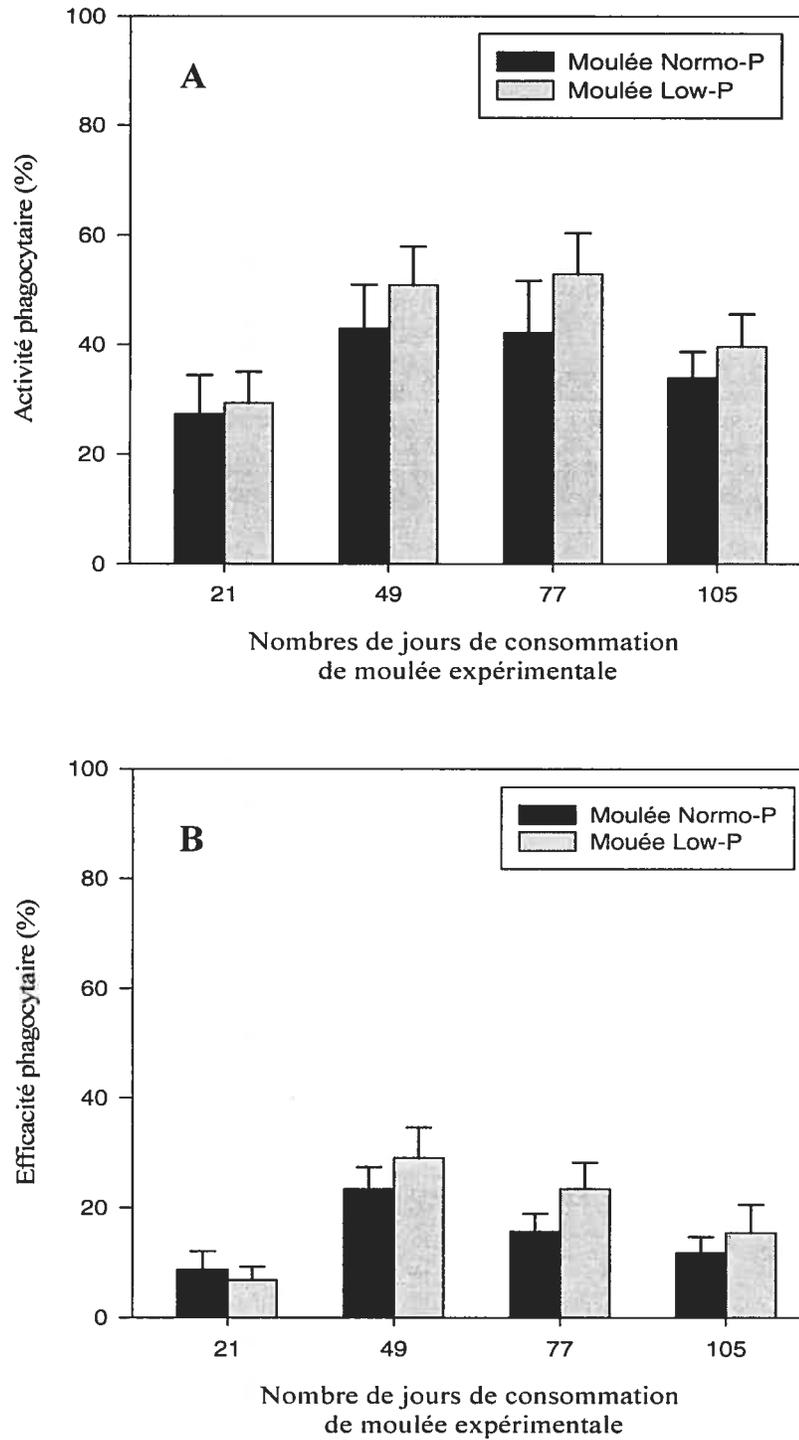


Figure 5 Activité phagocytaire (A) et efficacité phagocytaire (B) des cellules du pronéphros à différentes étapes de l'essai nutritionnel.

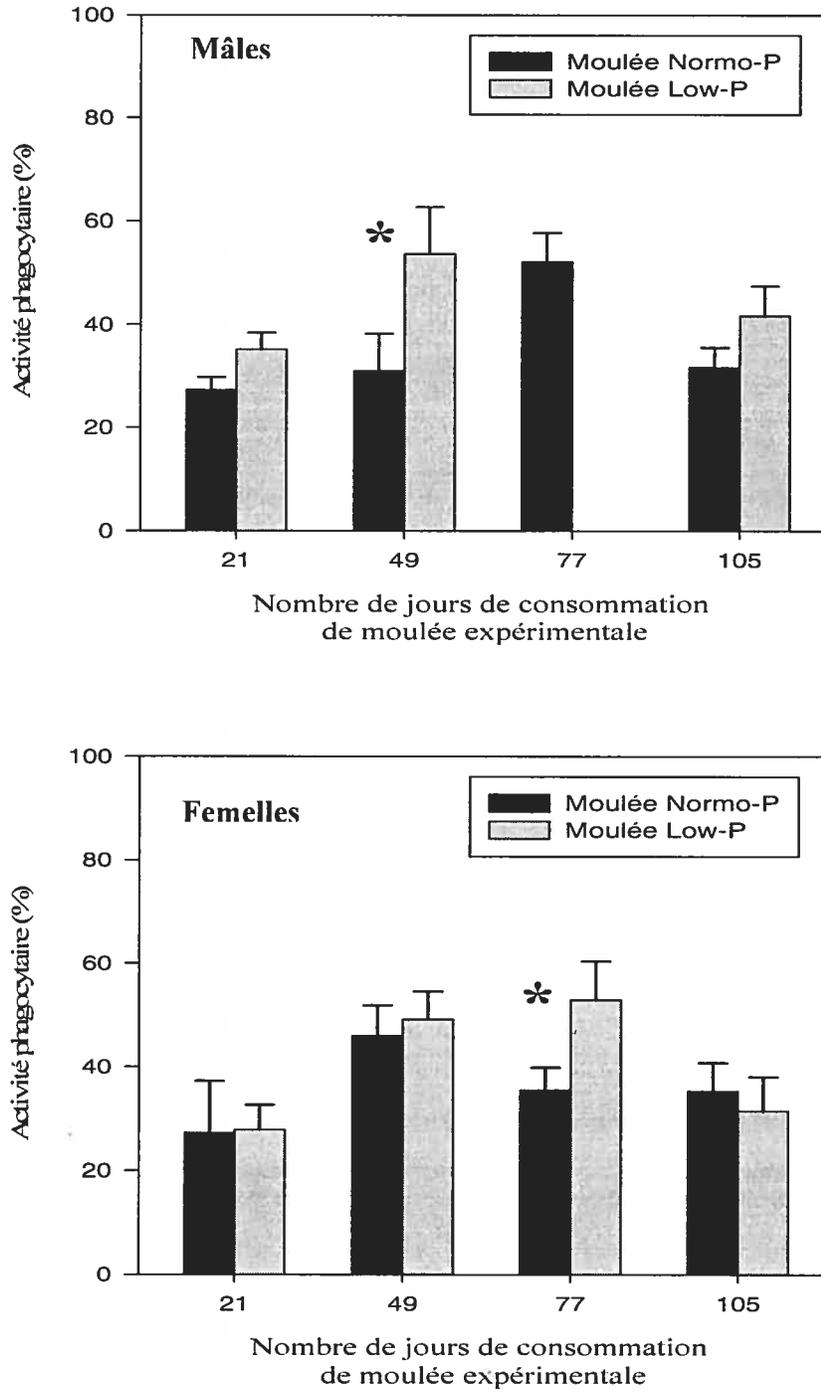


Figure 6 Activité phagocytaire des cellules du pronéphros chez les poissons mâles et femelles à différentes étapes de l'essai nutritionnel.

* Différence significative ($P < 0,05$)

Transformation lymphoblastique

Les tests de transformation lymphoblastique effectués pour cette expérience ont eu lieu aux mêmes dates que les tests de phagocytose et à partir des mêmes suspensions cellulaires de pronéphros. Les valeurs obtenues se situaient entre 100 et 500 DPM et ce, pour toutes les analyses faites avec les différentes concentrations de mitogènes ConA et LPS. Ainsi, les résultats n'ont révélé aucune valeur de DPM indiquant une prolifération cellulaire pratiquement nulle. Les valeurs de DPM ensuite exprimées en index de stimulation (IS) i.e. le DPM moyen des cellules stimulées avec les mitogènes sur le DPM de non stimulation, n'ont démontrées aucune tendance notable et n'ont donc pas pu être évaluées par des tests statistiques.

Essais infectieux

Le pourcentage de survie a été évaluée à 4 reprises durant l'essai nutritionnel soit durant la période d'adaptation entre le 14 novembre 2005 et le 16 janvier 2006, puis à l'aide d'essais infectieux indépendants à l'infection #1 entre le 18 janvier et le 1 février 06, à l'infection #2 entre le 6 et le 20 février 06 et à l'infection #3 entre le 2 et le 16 mars 06.

Confirmation de la présence d'*Aeromonas salmonicida*

La furonculose a été confirmée comme cause de la mortalité par la présence d'*A. salmonicida* à partir du pronéphros. Les résultats de croissance bactérienne après 72 heures d'incubation à 15°C sur une gélose TSA avec 5% de sang de mouton se présentaient sous forme de colonies moyennes, blanches/grises, rondes, convexes et lisses. Un pigment brun diffusible apparaissait après environ 24 heures d'incubation, confirmant l'une des principales caractéristiques de la souche *A. salmonicida*. La lecture du Gram au microscope et le test d'oxydase ont révélé des bâtonnets ou coccobacilles à Gram négatif, oxydase positif. Des confirmations de la souche bactérienne ont été faites à l'aide des tests biochimiques API 20E, au hasard lors des infections, sur des colonies préalablement identifiées comme *A. salmonicida*. Le profil obtenu d'un API 20E version 4,0 était 0006105 et cette séquence d'identification analysée par le programme informatique

apiweb™ de Biomérieux confirmait à 98,0% *A. salmonicida* spp *salmonicida* comme taxon significatif pour chaque analyse. La croissance sur gélose de quelques bactéries non identifiées ou de champignons indiquait parfois une contamination provenant de la peau ou du mucus lors des prélèvements.

La croissance bactérienne a été évaluée sur une échelle semi quantitative de 1+ pour indiquer une faible croissance à 4+ pour une forte croissance sur gélose. Pour tous les poissons testés, ceux morts de la furunculose suite aux bains infectieux avaient 3+ de bactéries identifiées comme *A. salmonicida* au niveau du pronéphros, signe d'une infection systémique. Par contre, les poissons des bassins témoins n'ayant pas subi d'infection et les poissons survivants à l'infection, euthanasiés après les 14 jours, n'avaient pas ou peu (1+) d'*A. salmonicida* au niveau du pronéphros. Lors de l'infection #3, il n'y a eu aucune croissance bactérienne suite au prélèvement et à l'ensemencement du pronéphros des poissons Normo-P du bassin témoin #11. Par contre, deux colonies bactériennes identifiées comme *A. salmonicida* ont été retrouvées sur une gélose TSA suite à un prélèvement chez un poisson Low-P du bassin contrôle #12 suggérant la possibilité d'une contamination croisée et/ou d'une immunité moindre chez les Low-P.

Effet de la moulée expérimentale sur la survie des poissons

Aucune différence significative n'a été observée au niveau du temps moyen de survie chez les poissons Low-P et Normo-P durant la période d'adaptation ($P = 0,94$) et les essais infectieux #1 ($P = 0,80$) et #2 ($P = 0,95$). Par contre, lors de l'infection #3, le temps de survie était significativement plus long avec la moulée Low-P que la moulée Normo-P ($P = 0,03$) (Tableau II et Figure 7). À la fin de la période d'adaptation, après 188 jours de consommation de moulée expérimentale, le temps de survie moyen des poissons Low-P était de 11,9 jours ($\pm 0,34$) et de 11,8 jours ($\pm 0,27$) pour les poissons Normo-P. À la fin de l'infection #1, après 204 jours de consommation de moulée expérimentale, le temps de survie moyen des poissons Low-P était de 10,6 jours ($\pm 0,29$) et de 11,6 jours ($\pm 0,28$) pour les poissons Normo-P. À la fin de l'infection #2, après 223 jours de consommation de moulée expérimentale, le temps de survie moyen des poissons Low-P était de 8,4 jours ($\pm 0,34$) et de 9,3 jours ($\pm 0,32$) pour les poissons Normo-P. Et finalement, à la fin de

l'infection #3, après 247 jours de consommation de moulée expérimentale, le temps de survie moyen des poissons Low-P était significativement plus élevé avec 8,8 jours ($\pm 0,45$) de survie par rapport à 7,2 jours ($\pm 0,39$) pour les poissons Normo-P. Le tableau II donne un aperçu des valeurs en jours, du temps de survie moyen, selon le nombre de jours de consommation de moulée, chez les poissons Low-P et Normo-P pour la durée d'adaptation suivant le transfère de Québec à Montréal et pour tous les essais infectieux avec la bactérie *Aeromonas salmonicida*.

Tableau II Temps de survie moyen des ombles de fontaine selon le type de moulée et la durée de consommation durant les infections expérimentales.

Essais infectieux	Nombre de jours de consommation de moulée à la fin de l'expérience	Temps moyen de survie Low-P (jours)	Temps moyen de survie Normo-P (jours)
Adaptation	188	11,9	11,8
Infection #1	204	10,6	11,6
Infection #2	223	8,4	9,3
Infection #3	247	8,8*	7,2*
		9,925	9,975

* Différence significative ($P < 0.05$)

Effet de la moulée expérimentale dans la première semaine de l'infection

Une analyse de survie restreinte à la première semaine, pour les infections #1 et #3, n'indiquait pas de différence significative au niveau de la survie selon le type de moulée ($P = 0,30$). Par contre, lors de l'infection #2, l'analyse de survie restreinte à la première semaine montrait une survie significativement plus grande avec la moulée Normo-P ($P < 0,0001$) sans effet du sexe ($P = 0,78$) ni du poids ($P = 0,88$) (Figure 7). Cette disposition à une survie plus grande chez les Normo-P, dans les premiers jours suivant l'infection, est également observable, sans être significative, lors des autres infections (Figure 7).

Effet du sexe sur la survie des poissons

Puisque les poissons ont atteint leur maturité sexuelle au cours de l'étude, une analyse de survie a été utilisée pour tester l'effet du sexe au niveau de la survie chez les poissons, indépendamment du type de moulée consommé. Pour la période d'adaptation, le modèle révèle que la survie était significativement moindre chez les mâles que chez les femelles ($P = 0,007$). Pour l'infection #1, la survie était marginalement moindre chez les mâles que chez les femelles ($P = 0,066$) mais était similaire chez les deux sexes à l'infection #2 ($P = 0,69$) et à l'infection #3 ($P = 0,94$). La mortalité est donc plus importante chez les mâles entre le mois de novembre 2005 et le mois de janvier 2006. Cet effet diminue ensuite au début février 2006 pour être identique chez les mâles et les femelles plus tard en février et ce, jusqu'à la fin de l'étude en mars 2006.

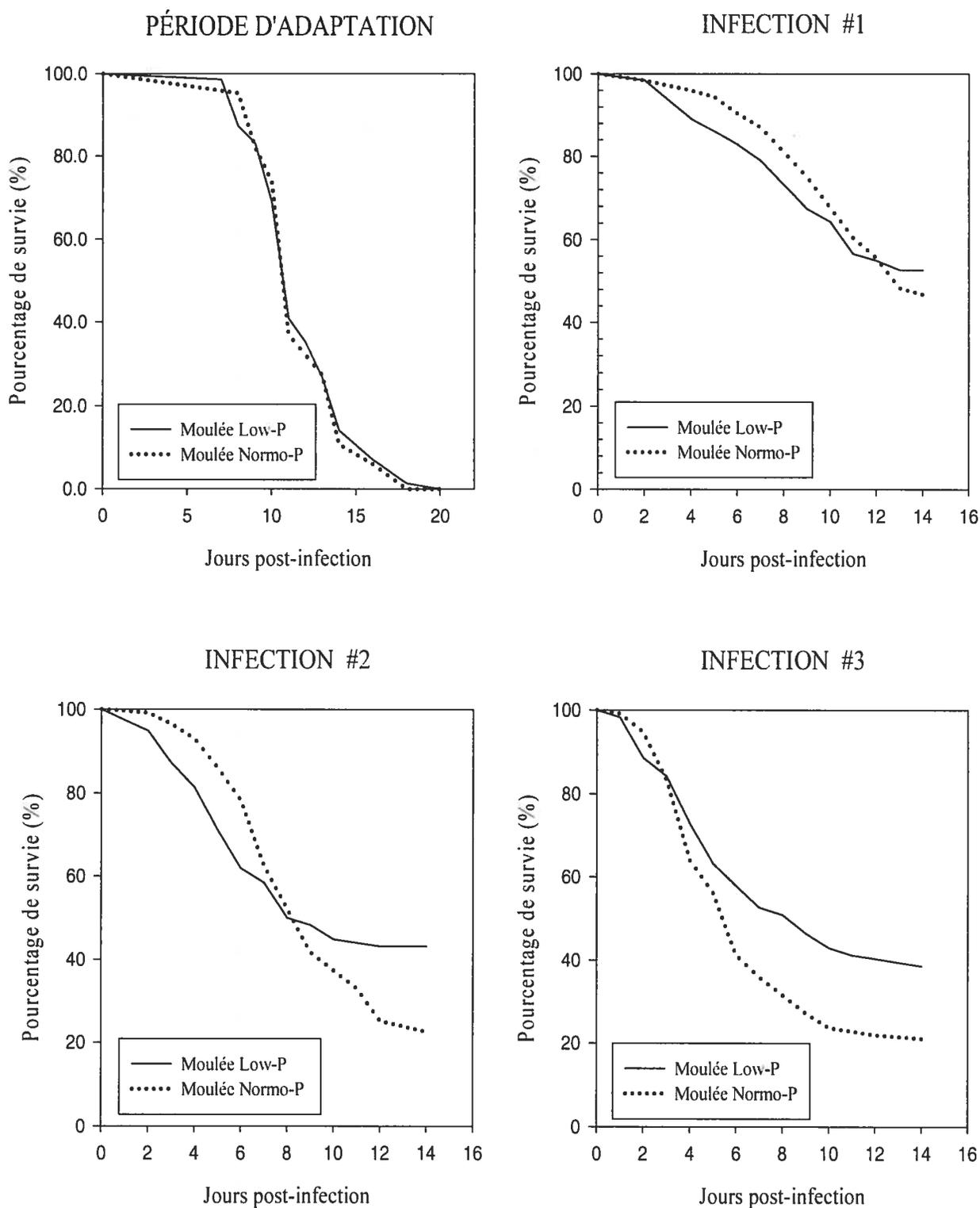


Figure 7 Effet du type de moulée sur la survie des poissons Low-P et Normo-P en période d'adaptation et lors des infections avec la bactérie *Aeromonas salmonicida*.

Discussion

Diète expérimentale

Le contenu en phosphore de chaque diète expérimentale a été évalué afin d'assurer les concentrations adéquates en P reliées à une moulée équilibrée et une moulée déficiente par rapport aux besoins des salmonidés. Le régime faible en phosphore (Low-P) (0% CaHPO₄) contenait 0,24% de phosphore assimilable. Le régime équilibré (Normo-P) (1,5% CaHPO₄) contenait 0,47% de phosphore assimilable soit l'équivalent retrouvé dans une moulée commerciale standard pour truites (Lellis, 2004). Les besoins pour les salmonidés sont de 0,37% (Rodehutscord, 1996; Cho, 2001).

La quantité de P assimilable (P dig.) recommandée pour la fabrication de diète pour la truite arc-en-ciel est de 0,19 g /MJ d'énergie digestible selon Rodehutscord (1996) et de 0,25 g /MJ d'énergie digestible pour une croissance maximale selon Cho (2001). Notre moulée déficiente Low-P contenant 0,138 g de P dig. par MJ d'énergie et notre moulée équilibrée Normo-P en contenant 0,227 g sont donc conformes aux valeurs recherchées pour notre étude. De plus, la recette de moulée utilisée (Annexe 3) a déjà été testée lors d'études précédemment réalisées par l'équipe du Dr Grant Vandenberg du Département de sciences animales de l'Université Laval qui possède une forte expertise au niveau de la nutrition animale, particulièrement reliée à l'aquaculture (communication personnelle; site web de ULaval). Les poissons nourris à l'aide de ces régimes démontraient des changements physiologiques avec la moulée Low-P sans causer de problèmes sanitaires relatifs à la qualité de l'eau des bassins ou à la surcharge des biofiltres. Le phosphate de calcium dibasique (CaHPO₄ (2H₂O)) ajouté à la moulée Normo-P est une des formes les plus assimilables de P puisque plus un sel est soluble, plus sa biodisponibilité est élevée (Lall, 1989).

Les variations des valeurs nutritionnelles disponibles dans la littérature s'expliquent par les erreurs analytiques associées aux différents protocoles d'étude des micronutriments et par les unités de comparaison utilisées (P total, P digestible, supplément de P ajouté à la

moulée). De plus, l'origine du nutriment étudié (sources végétales ou animales), sa biodisponibilité, sa digestibilité selon l'espèce animale utilisée, les protocoles expérimentaux pratiqués et les tests statistiques sont tous des points pouvant influencer l'évaluation des besoins spécifiques (Blazer, 1992; Sugiura, 2000b; Cho, 2001). Selon Sugiura (2000a), l'évaluation des besoins en P serait surestimée lorsque les analyses sont faites sur une base de rétention maximum. L'excrétion du P urinaire serait un moyen plus efficace et sensible d'évaluer les besoins. Aussi, l'acidité gastrique influence la biodisponibilité des minéraux d'origine alimentaire tel que le calcium et le phosphore (Roberts, 1989; Smith, 1989; Wood, 1992). La comparaison des résultats obtenus avec les carpes, qui n'ont pas d'estomac (pas de sécrétions d'acide gastrique), et des salmonidés, qui ont un estomac, pourra alors être biaisée selon l'espèce utilisée (Cho, 2001). Les conclusions finales pourront être différentes quoi que valides chez les deux espèces. De plus, les poissons peuvent faire certains échanges d'ions (ex : Ca^{2+}) entre le milieu extérieur, les branchies et/ou la peau. La détermination des exigences alimentaires d'une espèce devient alors complexe car elle fait intervenir des paramètres environnementaux difficilement contrôlables. Pour finir, purifier entièrement une diète d'un seul élément tout en maintenant l'équilibre des autres nutriments est pratiquement irréalisable même avec les technologies d'aujourd'hui (Lall, 1989).

Déficiences en phosphore et poids des poissons

Les concentrations de P contenues dans les moulées dites équilibrées sont basées, en premier lieu, sur la croissance ou l'augmentation efficace du gain de poids puis, en deuxième lieu, sur la maximisation du développement osseux (Baeverfjord, 1998; Sugiura, 2004), sans nécessairement tenir compte des effets sur les autres fonctions biologiques. Les concentrations de P requises pour une réponse immunitaire optimale peuvent être supérieures à celles requises pour une croissance maximale (Kegley, 2001). Blazer (1984b) affirmaient que les moulées commerciales ne contenaient pas le niveau adéquat de certains nutriments pour avoir un système immunitaire fonctionnel et une réponse immunitaire optimale face aux infections. Leur étude démontrait que les poissons nourris avec une diète commerciale standard avaient une réponse immunitaire significativement plus faible que les

poissons nourris avec leur diète expérimentale de contrôle. Par contre, aucune analyse précise du contenu des diètes expérimentales n'est disponible même s'il est mentionné qu'elles sont complètement différentes. Les auteurs affirment seulement que la valeur calorique et la digestibilité des ingrédients devaient être différentes dans chaque diète. Les poissons nourris avec la moulée commerciale avaient un système immunitaire déficient mais étaient plus gros que les poissons nourris avec leur moulée expérimentale de contrôle. Ils n'ont cependant pas poursuivi l'investigation de cette voie.

Les résultats relatifs au poids lors de nos infections expérimentales sont semblables à ceux obtenus dans cette étude. Lorsque nous évaluons les effets du poids sur la survie des poissons lors des infections avec *A. salmonicida* (Figure 4), indépendamment du sexe, nous constatons que les plus gros poissons (+ de 250 g) ont un pourcentage de survie significativement plus faible que les plus petits (- de 250 g). Les plus gros poissons sont donc plus sensibles aux infections. La littérature recense pourtant que les plus petits poissons, qui sont plus jeunes ou qui mangent moins à cause de leur statut hiérarchique, ont habituellement un système immunitaire moins bien développé et sont donc plus affectés par les infections (Tarte, 2004). Les poissons de notre expérience ont tous le même âge puisque nous les avons reçus en même temps et chaque groupe a eu accès à de la nourriture à satiété. Les plus gros poissons sont des poissons Low-P dans notre expérience (Figure 3). On peut supposer qu'ils sont plus lourds parce qu'ils ont formé moins de masse osseuse et plus de masse grasseuse au niveau abdominal.

Le calcium et le phosphore sont souvent étudiés ensemble vu leur forte relation au niveau de la formation des os et du maintien de l'homéostasie (Lall, 1989). Le ratio de ces deux minéraux sera particulièrement important chez les animaux monogastriques (porcs, volailles, poissons) parce qu'ils ne possèdent pas l'enzyme phytase permettant une bonne assimilation du P d'origine végétale. Ainsi, une modification du ratio apportant une trop haute concentration de Ca pour une quantité de P adéquate interfère avec l'absorption du phosphore. De la même façon, une haute concentration de P pour une quantité de Ca adéquate restreint l'absorption de Ca créant une hypocalcémie relative même si au départ la quantité de calcium était adéquate (Lall, 1989). Le déséquilibre du ratio Ca/P dans notre moulée Low-P peut expliquer les modifications de la masse osseuse et de la masse

graisseuse chez nos poissons et par le fait même, la tendance à l'augmentation du poids. De plus, une diète déséquilibrée peut mener à une diminution de la résistance à certaines maladies infectieuses (Lall, 1989) expliquant en partie la sensibilité des poissons Low-P aux infections.

En nature, les carences nutritionnelles spécifiques chez les poissons sont rares. La pollution et les quantités limitées de nourriture sont plus souvent les causes de pathologies nutritionnelles. Dans les conditions de pisciculture, il est extrêmement difficile de définir en termes absolus une déficience impliquant un seul élément (Roberts, 1989). Le stress imposé aux animaux d'élevage peut affecter le métabolisme du P (Kegley, 2001). Une étude de McDaniel (2005) a démontré que la concentration d'oxygène dissous peut avoir un impact significatif sur l'utilisation et la répartition du phosphore chez les truites d'aquaculture. Plusieurs variables doivent donc être prises en considération avant d'obtenir des conclusions définitives d'un paramètre relié spécifiquement à une carence en phosphore.

Déficience en phosphore et masse grasseuse

Considérant l'étroite relation existant entre le phosphore et le calcium, il est connu que les poissons carencés en phosphore vont développer moins de masse osseuse. Ils accumuleront cependant plus de masse grasseuse au niveau de l'abdomen. L'accumulation de gras chez les poissons consommant une nourriture faible en phosphore a déjà été constatée par certains auteurs (Takeuchi, 1981; Sugiura, 2004). Cette particularité fait en sorte que les poissons sont plus courts mais plus ronds (Figure 8). Les poissons nourris avec une diète carencée en phosphore retiennent un plus grand pourcentage des gras provenant de l'alimentation confirmant ainsi que la masse grasseuse est d'origine alimentaire et non pas seulement synthétisée *de novo* (Sugiura, 2004). Cette augmentation de gras corporel peut également apporter des changements aux niveaux du profil des acides gras des phospholipides et influencer indirectement les activités des membranes cellulaires tel que les récepteurs membranaires, la liaison des antigènes, des mitogènes et le métabolisme des eicosanoïdes comme les prostaglandines et les leucotriènes (Blazer, 1992; Sugiura, 2004). Cette corrélation entre le gras et les diètes en P peut avoir un certain

potentiel commercial, selon l'espèce de poissons, en modifiant le profil des acides gras pour augmenter la stabilité ou la texture des filets lors de la mise en marché (Sugiura, 2004). L'expulsion des œufs chez les femelles matures sexuellement peut aussi créer une distension abdominale mais les observations faites lors des dissections démontrent que l'accumulation de graisse est responsable de l'effet de l'abdomen distendu sur les poissons Low-P dans notre étude.



Figure 8 Omble de fontaine Low-P à l'abdomen distendu par l'accumulation de graisse.

(photo : Carl Umland, 2006)

Le groupe des poissons Low-P a toujours été plus lourd lors de l'alimentation avec la moulée expérimentale (Figure 3). Ce phénomène de l'accumulation de gras abdominal peut peut-être expliquer le poids. En effet, les hautes concentrations de cortisol induites par le stress sont reconnues pour modifier le métabolisme des glucides chez les poissons (Sangiao-Alvarellos, 2005). Ces modifications du métabolisme des glucides causent l'accumulation de gras à la ceinture abdominale chez l'humain (Odamaki, 1999; Salmenniemi, 2004; Sierra-Johnson, 2004). On peut supposer une relation entre le gras abdominal de nos poissons et les stress chroniques qu'ils ont subis durant l'essai nutritionnel. Nous avons également observé, à quelques reprises durant l'expérience, des poissons Low-P avec des problèmes de flottabilité. On peut supposer que ce type de problème est relié à la masse grasseuse qui accroît la flottabilité et qui oblige les poissons à une plus grande dépense d'énergie pour se stabiliser. Cette dépense d'énergie pour maintenir la flottabilité plutôt que pour les fonctions immunitaires rend probablement les poissons plus vulnérables aux infections

Finalement, on peut supposer que l'accumulation de graisse corporelle permet une plus grande réserve des vitamines liposolubles A, D, E et K. On sait que la vitamine D est directement impliquée dans la régulation du calcium et du phosphore. Une augmentation de la $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D_3 ($1-25(OH)_2 D_3$), une forme active de la vitamine D_3 , a été observé chez les porcs nourris avec une moulée faible en phosphore (Engstrom, 1985; Kegley, 2001). On peut supposer que l'augmentation de cette graisse abdominale et l'augmentation de la vitamine D_3 liposoluble chez les truites sont en relation. Les recherches portant sur les effets de carence en phosphore sont souvent associées aux porcs et la volaille parce que les rejets de P dans ces types d'élevages sont problématiques tout comme ceux de l'aquaculture.

Vitamine D et phosphore

Kegley (2001) mentionne une augmentation de la $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D_3 chez des porcs nourris avec une moulée Low-P et suggère comment cette vitamine D influence les fonctions immunitaires humorales et cellulaires. Ses résultats indiquent que la blastogenèse des lymphocytes T au mitogène PHA augmente linéairement avec l'augmentation de P dans la diète et que la blastogenèse des lymphocytes B au PWM n'a pas été affectée. Aucun effet n'a été observé sur les fonctions immunitaires étudiées par rapport aux essais inflammatoires par injection de LPS et les concentrations en P. Il rapporte aussi que les macrophages et certaines lignées lymphoïdes des mammifères expriment des récepteurs de la vitamine D_3 à certains stages de leur différenciation (Lemire, 1984). La diète en phosphore pourrait moduler les concentrations sanguines de cette vitamine et ainsi diminuer la prolifération cellulaire. Vielma (1998), dans son étude sur l'homéostasie du phosphore chez les saumons de l'Atlantique, mentionne également que la vitamine D pourrait y avoir un rôle essentiel. Le contenu en P influence les concentrations de $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D_3 hépatique. La prolactine, hormone immunomodulatrice et essentielle à l'osmorégulation chez les vertébrés inférieurs et la stanniocalcine, hormone protéique hypocalcémiant, pourraient également influencer cette homéostasie du phosphore chez les poissons.

Néanmoins, une étude de Coloso (2003) affirme que certains facteurs (NaPi2, activité de la phosphatase alcaline) impliqués dans le métabolisme du P ou pouvant être utilisés comme indicateurs du statut de P chez les poissons ne sont influencés que par les concentrations de P dans la diète et non pas par les concentrations de la 1 α ,25 dihydroxyvitamine D₃. Les concentrations plasmatiques de la 1 α ,25 dihydroxyvitamine D₃ n'ont pas été affectées par les diètes en P chez les truites arc-en-ciel. Les mesures des concentrations de la vitamine D₃ n'ont pas été faites dans notre étude mais pourraient tout de même permettre une meilleure définition du rôle de P dans l'immunité. Ces analyses pourraient se faire à partir du plasma des poissons par dosage radioimmunologique (RIA) tel que décrit dans le protocole de Coloso (2003).

Déformations osseuses

Des déformations osseuses de la colonne vertébrale ont été observées chez les poissons Low-P à partir de 125 jours de consommation de moulée expérimentale. Aucune déformation n'a été observée chez les poissons Normo-P. Ces déformations nommées « curled spine » ou « phosphatic curl » (Figure 9) sont typiques d'une carence en phosphore tel que décrite précédemment.

Les truites emmagasinent le phosphore et le calcium dans les tissus durs tel que les os et les écailles. Lors d'une déficience en phosphore provenant de la diète, elles pigent dans ces réserves pour combler leurs besoins sans trop démontrer de signes extérieurs apparents. Cependant, ces réserves sont limitées et une trop grande utilisation, sur une trop longue période, apportent des déformations osseuses caractéristiques (Baeverfjord, 1998; Roberts, 2001; Sugiura, 2004).

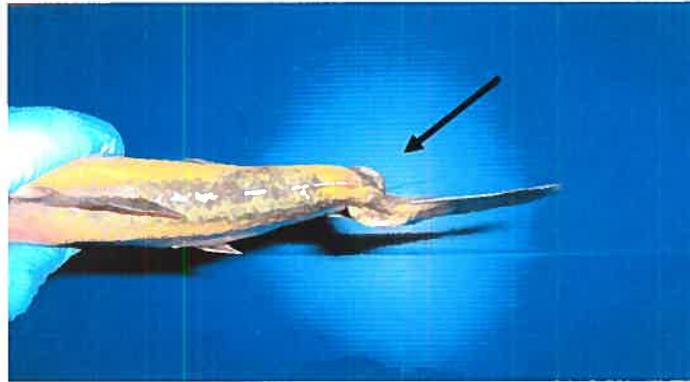


Figure 9 Déformation « curled spine » ou « phosphatic curl » typique d'un omble de fontaine Low-P durant l'essai nutritionnel.

(Photo : Carl Uhland, 2006)

Déficiences en phosphore et maturité sexuelle

Un changement de protocole indépendant de notre volonté a fait en sorte que nos poissons ont atteint leur maturité sexuelle durant l'essai nutritionnel. En effet, la luminosité initialement demandée était de 24 heures par jour afin de créer un déséquilibre du cycle biologique influencé par la lumière et d'éviter ainsi cette maturation sexuelle (Leonardi, 2003). Les poissons ont finalement été exposés à une photopériode correspondant, en temps réel, à celle de la ville de Québec durant tout l'essai nutritionnel. La maturité sexuelle semble avoir eu la même incidence dans les deux groupes de poissons. D'après les observations faites durant l'essai nutritionnel, la production de sperme chez les mâles et la formation des œufs chez les femelles ne semble pas avoir été affectée par la déficience en P. Le phosphore se retrouvant en plus grande quantité dans les tissus durs (os, écailles) que dans n'importe quels autres organes, le développement des ovaires ne devrait pas nécessiter plus de phosphore que les autres tissus somatiques (Sugiura, 2004). La diminution de l'appétit engendrée par la maturité sexuelle a rendu difficile l'alimentation de nos poissons durant cette période. Les poissons étaient nourris à satiété mais consommaient seulement un quart des rations calculées. De ce fait, les données résultant d'études essayant d'estimer les besoins en phosphore durant la maturation sexuelle sont ambiguës (Sugiura, 2004). La fécondité, la production d'œufs et de larves de poisson n'ont pas été étudiés dans cette expérience.

La maturité sexuelle a eu une forte incidence sur la survie des poissons, indépendamment du type de moulée consommée, lors des essais infectieux. La maturité sexuelle chez les mâles est survenue avant celle des femelles. L'apparition manifeste d'individus matures sexuellement s'est faite à partir du 25 octobre 2005, lors des derniers prélèvements en vue des 6^{ème} tests immunologiques de phagocytose et de transformation lymphoblastique (Tableau I). Nous avons constaté une forte mortalité chez les mâles lors de la période d'adaptation puis une diminution de celle-ci lors de l'infection #1. La mortalité était similaire chez les mâles et les femelles durant l'infection #2 et #3 supposant que la période de maturité sexuelle était terminée à ce moment de l'expérimentation. La dépense d'énergie étant dirigée vers la fabrication des gamètes plutôt que sur les processus immunitaires durant cette période, les poissons sont prédisposés aux infections et leur résistance aux agressions peut être affectée au point de diminuer le taux de survie (Schreck, 1996 ; Law, 2001). La diminution de l'appétit et/ou l'anorexie complète accompagnant cette période doivent être considérées comme des facteurs de stress supplémentaires.

Les effets de la maturité sexuelle ont également été visibles lors des analyses de phagocytose. Nous remarquons une augmentation de l'activité et de l'efficacité phagocytaire en date du 30 août, après 49 jours de moulée, et en date du 27 septembre, après 77 jours de moulée (Figure 5). Le début de la maturité sexuelle peut avoir commencé à ces dates, sans que des signes physiques évidents ne se soient encore déclarés. On peut supposer que ce stress physique supplémentaire, en plus de la carence nutritionnelle déjà imposée, a agit en stimulant le système immunitaire inné représenté dans notre expérience par la phagocytose. Cette tendance est constatée lorsque l'on considère l'activité phagocytaire selon le sexe des poissons. Sachant que la maturité sexuelle arrive chez les mâles avant les femelles, nous constatons que l'activité phagocytaire des mâles est significativement plus élevée en date du 30 août et celle des femelles en date du 27 septembre (Figure 6).

On peut supposer que le stress de la préparation reproductive cumulé au stress de la carence alimentaire des Low-P a stimulé de façon significative l'activité phagocytaire. Si ce n'avait pas été du stress de la maturité sexuelle, une étude de Leonardi (2003) démontre qu'une photopériode artificielle de 24 heures de lumière par jour entraîne également un

stress qui contribue à l'augmentation des niveaux de cortisol ainsi qu'à une immunosuppression exprimée par une diminution de l'expansion clonale des lymphocytes T. Nous pouvons donc proposer comme hypothèse que, soumis à un certain degré de stress, les poissons ont développé une réponse immunitaire innée efficace reflétée par la phagocytose. Par contre, le stress devenant trop intense par l'accumulation d'autres facteurs et/ou devant être subi sur trop une longue période, n'a pas permis aux mécanismes de défense de l'immunité innée d'être assez efficaces pour combattre un agent pathogène lors d'une infection.

L'atteinte de la maturité sexuelle des poissons a engendré une augmentation des hormones stéroïdiennes primaires dont l'œstrogène chez les femelles et la testostérone chez les mâles. Dans l'étude de Law (2001), les oestrogènes diminuent de façon significative la phagocytose chez le tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) même si l'amplitude de cette suppression est plus faible qu'avec le cortisol. Par contre, dans les mêmes conditions expérimentales, les oestrogènes n'ont pas eu d'effet sur la phagocytose chez la carpe (*Cyprinus carpio*). La testostérone ne semble pas avoir d'effet significatif sur la phagocytose ce qui pourrait expliquer la plus faible susceptibilité des mâles aux infections chez certaines espèces de poissons. L'article de Law (2001) détaille les interactions existant entre le système immunitaire et le système endocrinien, en particulier des effets des hormones sexuelles mâles et femelles, chez différentes espèces de poissons et autres vertébrés.

Modifications au protocole affectant les paramètres immunologiques

L'évaluation des paramètres physico-chimiques de l'eau, la maintenance du système ainsi que l'entretien des bassins et des poissons ont été effectués quotidiennement par le personnel du LARSA. Les paramètres évalués incluaient la température, l'oxygène dissout, le débit des biofiltres, le débit de l'eau dans les bassins, la pression dans le filtre au sable et le nombre de poissons morts selon les bassins et le type de moulée. La présence de l'azote ammoniacal et des nitrites a été suivie pour assurer le bon fonctionnement des biofiltres. Par contre, la charge de matière organique sur ces biofiltres a été sous-estimée lors de

l'alimentation des poissons avec la moulée expérimentale. Les modifications physico-chimiques de l'eau causées par cette surcharge de matière organique, incluant des concentrations élevées d'azote ammoniacal et de nitrites, ont été détectées et des mesures correctives ont été prises mais les poissons exposés à ces conditions environnementales sub-optimales ont tout de même développé des infections récurrentes fongiques et bactériennes à *Flexibacter colomnaris*.

Il est connu qu'une diète déséquilibrée combinée à des facteurs de stress tel que ceux subis par nos poissons peuvent promouvoir des infections cutanées à *Flexibacter colomnaris* en eau froide, particulièrement chez les salmonidés (Ghittino, 1989). Plusieurs maladies mycosiques secondaires, s'implantant sur la peau blessée et fragilisée des poissons, sont également associées directement ou indirectement à l'alimentation et plus particulièrement à l'eau devenue eutrophe par l'accumulation de déchets et de résidus alimentaires (Ghittino, 1989; Austin, 1993). L'atteinte de la maturité sexuelle, tel que mentionnée précédemment, a probablement joué un rôle important dans la susceptibilité des poissons à ces infections. Toutes ces modifications imprévues du protocole semblent avoir affectés les deux groupes de la même façon. Cependant, ces stress supplémentaires imposés et les mesures correctives appliquées (bains de formol, traitement d'oxytétracycline, augmentation de la salinité et entretien accru des bassins) ont certainement influencé les résultats des tests immunologiques. Les traitements contre les infections, appliqués de manière identique dans chaque groupe, étaient absolument nécessaires pour maîtriser la morbidité et la mortalité afin de pouvoir poursuivre subséquemment avec les essais infectieux.

Interaction entre le système immunitaire et endocrinien

Le pronéphros est l'organe clé des communications entre le système endocrinien et le système immunitaire chez les poissons. C'est le site de l'hématopoïèse, de la production des anticorps, de la production du cortisol et des catécholamines (adrénalines, dopamines). Le réseau complexe des deux systèmes coopère activement au maintien de l'homéostasie chez les poissons comme chez les mammifères (Weyts, 1999). Le cortisol est connu pour

affecter plusieurs mécanismes de résistances aux maladies (Law, 2001). Les stress environnementaux chroniques imposés aux poissons sont connus pour causer une augmentation de la susceptibilité aux maladies et plus précisément, une réduction du nombre de lymphocytes, une réduction du nombre de cellules productrices d'anticorps, une élévation des corticostéroïdes, une augmentation ou une réduction de l'activité des macrophages selon le type de stress et une modification des paramètres hématologiques (Angelidis, 1987; Leonardi, 2003). Pourtant, les concentrations de cortisol ne sont pas mesurées de routine dans les expériences de nutrition et d'infections (Blazer, 1992). Tout comme dans le cas de la vitamine D, les concentrations de cortisol n'ont pas été analysées dans notre étude mais auraient pu permettre une meilleure compréhension des phénomènes de stress dans le contexte de notre essai nutritionnel. Les analyses de cortisol plasmatique chez les poissons peuvent se faire par dosage radioimmunologique (RIA) avec des trousse commerciales disponibles sur le marché pour des analyses chez l'humain (Leonardi, 2003).

L'augmentation des hormones stéroïdiennes primaires occasionnée par l'atteinte de la maturité sexuelle a probablement influencé de manière importante le système immunitaire de nos poissons. Puisque nos résultats contredisent ceux de Law (2001) par rapport à la survie des mâles, des analyses d'oestrogènes et de testostérone auraient pu donner d'avantage de précisions sur l'immunité de nos poissons. Les nombreux autres paramètres influençant le système endocrinien et immunitaire imposés dans notre étude ont probablement eu un impact majeur sur les résultats de la survie en fonction du sexe.

Transformation lymphoblastique

Les résultats de transformation lymphoblastique n'ont révélé aucune valeur de DPM acceptable indiquant ainsi la non prolifération des lymphocytes T et B en présence des mitogènes. Ces résultats peuvent s'expliquer de plusieurs manières. Premièrement, une étude d'Alcorn (2002) évaluant les effets de la température sur les fonctions immunitaires du saumon rouge (*Oncorhynchus nerka*) sur un cycle de vie complet, stipule qu'un haut niveau de cortisol présent lors de la maturation sexuelle ou lors de stress associés aux conditions d'aquaculture, diminue le nombre de lymphocytes. Le cortisol est le

corticostéroïde majeur produit chez les téléostéens en situation de stress et diminue le nombre des lymphocytes en induisant leur apoptose (Schreck, 1996; Weyts, 1999). Les hautes concentrations de cortisol plasmatique chez les poissons affectent donc les lymphocytes et les autres fonctions cellulaires en causant une lymphopénie et une inhibition de la croissance des lymphocytes (Angelidis, 1987; Anderson, 1990; Schreck, 1996; Lunden, 2000). La population de lymphocytes T semble être plus sensible que celle des lymphocytes B aux effets du cortisol (Leonardi, 2003). L'exposition chronique à différents stress lors de l'alimentation expérimentale de nos poissons peut donc être envisagée pour expliquer la non prolifération des lymphocytes.

Deuxièmement, il a également été démontré dans l'étude d'Alcorn (2002), qu'une baisse de température diminue le nombre des lymphocytes. La corrélation entre le nombre de lymphocytes et la température est bien documentée (Anderson, 1990; Clem, 1991; Schreck, 1996). La prolifération des lymphocytes T et leur réponse aux mitogènes (ConA) sont supprimées à basse température (température non permissive selon l'espèce piscicole à l'étude). En fait, la prolifération des lymphocytes T suivant la stimulation par un mitogène est bloquée relativement tôt lors d'une incubation à basse température (après seulement 8 heures de stimulation). La réponse des lymphocytes B aux LPS n'est pas affectée (Manning, 1996). Cependant, les faibles valeurs de DPM de notre étude démontrent que les lymphocytes B stimulés aux LPS seraient également sensibles aux effets de la température.

Sachant qu'une température plus élevée augmente le nombre de lymphocytes, l'incubation des suspensions cellulaires avec les mitogènes à une température supérieure à 15°C durant les tests de transformation lymphoblastique aurait peut-être donné de meilleurs résultats. Le but d'incuber les cellules à 15°C était d'éviter un stress thermique aux cellules provenant de poissons maintenus dans un environnement aquatique de 12°C. Les températures d'incubation pour la transformation lymphoblastique de cellules de truites arc-en-ciel sont de 20°C pour 1 à 7 jours (Warr, 1983; Tillitt, 1988), 22°C pour 4 jours (Lunden, 2000) et de 18°C pour 8 jours pour l'omble de fontaine (Daly, 1995). Des expériences menées à INRS-IAF par l'équipe de Michel Fournier démontrent pourtant qu'il est possible d'avoir des IS significatifs lors d'incubation de cellules de truites (arc-en-ciel et mouchetée) à 15°C (communication personnelle de Marlène Fortier, INRS-IAF). La

température n'est probablement pas le paramètre majeur ayant contribué à la non prolifération de nos cellules.

Troisièmement, il est connu que les antibiotiques, dont l'oxytétracycline (OTC) utilisée pour un traitement de 10 jours durant l'essai nutritionnel, causent une réduction de la réponse mitotique cellulaire et diminue la production des plasmocytes producteurs d'Ac (Anderson, 1996; Lunden, 2000). L'OTC agit en inhibant la synthèse des protéines chez les procaryotes en bloquant la fixation de l'acido-acyl-T-RNA sur le ribosome 30 S et en ralentissant de nombreux systèmes enzymatiques microbiens par chélation des cations de métaux bivalents. L'OTC a aussi un effet d'inhibition sur la synthèse des protéines dans les mitochondries (à faible dose) et la synthèse des protéines dans le cytoplasme (à forte dose). L'inhibition de la synthèse protéique amène donc une dilution des enzymes essentielles à la division cellulaire et finit par en affecter la prolifération (Anderson, 1996; Lunden, 2000; site web de Biam). L'OTC est aussi connue pour avoir une bonne pénétration des tissus chez les poissons et s'accumuler dans le pronéphros.

Finalement, des modifications au niveau de la composition des acides gras ont démontré des effets sur la synthèse des prostaglandines, la réponse des lymphocytes T aux mitogènes, la réponse immunitaire humorale et l'activité phagocytaire des macrophages chez les homéothermes (Johnston, 1988). Sachant que les poissons Low-P ont tendance à mieux assimiler le gras contenu dans leur alimentation et ainsi accumuler plus de masse grasseuse, les effets des lipides en relation avec le phosphore devraient également être considérés lors de l'évaluation de l'immunité chez les poissons. Parallèlement, les concentrations élevées de vitamine D pourraient aussi inhiber la prolifération des lymphocytes B et T (Lemire, 1984).

Phagocytose

Très peu d'études ont été faites pour vérifier les effets du stress sur la phagocytose et les résultats obtenus sont très variables. Le stress (cortisol) et les paramètres nutritionnels ont parfois des effets de stimulation, parfois des effets de suppression ou n'ont aucun effet selon l'espèce animale, l'origine et le type de cellules phagocytaires et le protocole

expérimental utilisé (Blazer, 1991; Kiersztein, 1992; Weyts, 1999). On peut supposer que le système endocrinien occasionne des effets mais les expérimentations *in vitro* sur des macrophages de truites arc-en-ciel incubés avec du cortisol n'en ont démontré aucun (Schreck, 1996). *In vivo*, le cortisol apporte des changements au niveau des globules blancs en diminuant le nombre de lymphocytes et en augmentant le nombre de cellules PMN comprenant les neutrophiles (Schreck, 1996; Weyts, 1999; Alcorn, 2002). Ainsi, le cortisol agit comme un régulateur au niveau du système immunitaire en stimulant les défenses non spécifiques et en supprimant la réponse immunitaire spécifique rattachée aux lymphocytes (Weyts, 1999). L'augmentation des cellules PMN, qui possèdent une capacité phagocytaire chez les poissons, pourrait donc expliquer la tendance à la hausse de l'activité et de l'efficacité phagocytaire chez les poissons Low-P subissant le stress de la carence alimentaire (Figure 5). Par contre, il est également noté que la diminution d'un type cellulaire (lymphocytes), résulte en une augmentation des autres types cellulaires (neutrophiles et macrophages) relative perçue seulement parce qu'il y a lymphopénie (Alcorn, 2002). Les données de la littérature disponibles et relatant les effets du stress sur la phagocytose sont trop variables pour arriver à une conclusion définitive. Le décompte cellulaire et le contrôle de la viabilité ne sont pas impliqués dans les résultats de la phagocytose et de la transformation lymphoblastique de notre étude puisque le nombre minimal de cellules vivantes actives étaient adéquat pour réussir les procédures à chaque expérience.

Infections expérimentales

Tous les poissons du LARSA de Québec ont été déménagés dans la région de Montréal afin de faciliter le transport, le maintien et la surveillance lors des essais infectieux. Le laboratoire d'écotoxicologie de la station d'épuration des eaux usées de Montréal possède toutes les installations nécessaires au contrôle et à la stabilité des conditions physico-chimiques de l'eau pour les 12 bassins de 150 litres en circuit ouvert. De plus, la désinfection des bassins et de l'environnement suite aux infections avec *A. salmonicida* peut s'y faire facilement et sans risque de contamination. Les répercussions de la maturation sexuelle ainsi que les lésions cutanées associées à la mauvaise qualité de l'eau

ont été ressenties longtemps après le déménagement des poissons de Québec vers Montréal, obligeant à retarder les essais infectieux. Ainsi une longue période d'adaptation a été nécessaire suite à l'arrivée des poissons à Montréal et une faible mortalité a persisté jusqu'en janvier et février 2006.

Les essais préliminaires ont établi qu'un choc thermique important était nécessaire à l'induction de la furonculose chez nos poissons. Il a également été constaté que la concentration bactérienne était sous optimale lorsque les suspensions d'*A. salmonicida* provenaient de cultures en bouillon TSB. Nous pensions alors que la souche bactérienne utilisée n'était peut-être plus virulente à cause des nombreux repiquages effectués. Nous avons cependant constaté lors de ces pré-essais que la souche naturelle (SN) ou la souche standard ATCC #14174 d'*A. salmonicida* n'était pas en cause. Il fallait faire pousser *Aeromonas* en tapis bactérien compact afin d'obtenir une concentration suffisamment élevée pour générer l'infection. Une concentration de $5,5 \times 10^{10}$ cfu/mL de la suspension mère faite à partir des tapis bactériens a permis d'obtenir une concentration finale de $7,3 \times 10^5$ cfu/mL capable d'induire l'infection chez nos poissons.

Confirmation des mortalités

La mortalité des poissons par la furonculose a été confirmée par les signes cliniques manifestes de la maladie et par la présence de la bactérie *A. salmonicida* dans le pronéphros. Ainsi, nous avons pu confirmer la cause de la mort même chez les poissons ayant développé la forme suraiguë de la maladie, sans aucun signe clinique. Les signes extérieurs visibles étaient les lésions au niveau cutané et musculaire (les furoncles), le noircissement de la peau par endroit, les hémorragies de la peau, des yeux et des narines, l'exophtalmie, le manque d'appétit et la léthargie. À la dissection, nous pouvions remarquer que les lésions externes cutanées s'infiltraient jusque dans les muscles. Des hémorragies internes de la peau et des viscères étaient apparentes ainsi qu'une liquéfaction du pronéphros dû aux protéases et aux lipases présentes comme facteurs de virulence chez *A. salmonicida* (Austin, 1993; Noga, 1996; Bernoth, 1997).

La croissance bactérienne d'*A. salmonicida* sur milieux de culture TSA suite à un inoculum du pronéphros avec un écouvillon stérile est une méthode bactériologique efficace pour l'identification présomptive de cette bactérie (Coyne, 2004). L'utilisation des galeries API pour identifier précisément une souche par l'interprétation de son profil est un moyen efficace, accessible et peu dispendieux. Cependant, à cause des possibilités de mauvaise identification, il est recommandé de les utiliser avec précaution et d'effectuer d'autres tests pour avoir une confirmation définitive, particulièrement avec l'identification des espèces du genre *Aeromonas* (Buller, 2004). Les techniques d'identification moléculaire sont plus fiables, particulièrement avec les bactéries difficiles à identifier par des tests biochimiques. Par contre, pour notre étude, les signes particuliers de la furunculose chez nos poissons, le pigment brun diffusible dans les géloses TSA et l'identification par API20E ont été suffisants pour confirmer la mort par *A. salmonicida*, sans faire d'identification moléculaire ou immunologique.

Survie aux infections

La survie des poissons Low-P et Normo-P, suite à leur arrivée à la station d'épuration des eaux usées de Montréal, ne semble pas être influencée par le type de moulée et ce, autant en période d'adaptation que durant les infections #1 et #2. On peut supposer que les poissons qui ont survécu au stress de la maturité sexuelle sont les plus résistants. On ne détecte donc pas de différence significative de la survie entre les deux types de moulée consommés chez ces poissons. Par contre, à l'infection #3, la survie est significativement plus longue chez les poissons Low-P. Cette différence pourrait être attribuée à des variations expérimentales entre les essais infectieux malgré les conditions environnementales extrêmement stables du laboratoire de la station d'épuration des eaux usées de Montréal.

Le temps moyen de survie pour les poissons infectés a diminué au cours des trois essais infectieux (Tableau II). Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation continue de la taille des poissons autant que par l'accumulation des effets d'une carence en phosphore. Il faut prendre en considération que le poids des poissons était plus élevé dans le groupe

Low-P. Lors des trois essais infectieux de cette étude, les plus gros poissons ont démontré être plus susceptibles aux infections par *A. salmonicida* (Figure 4). Il existe toujours une variabilité des résultats quand des systèmes biologiques sont examinés. C'est pourquoi la répétition des expériences avec un grand nombre d'individus et un suivi prolongé est importante pour clarifier ces derniers résultats équivoques.

La tendance observée lors des premiers jours suivant une infection, même si elle n'est pas significativement présente dans les trois essais infectieux, peut être importante pour un pisciculteur. En effet, les poissons nourris avec la moulée Normo-P semblent être plus résistants aux infections que les poissons Low-P dans les premiers jours qui suivent l'introduction de l'agent pathogène (Figure 7). Lors d'épidémies en élevage, si les fortes mortalités pouvaient être retardées de quelques jours parce que les poissons ont été nourris avec une moulée équilibrée, le pisciculteur aurait plus de temps pour instituer des changements de régimes ou pour intervenir avec un traitement avant d'atteindre un désastre économique.

Conclusions

Certains effets reliés à la diète faible en phosphore se sont manifestés durant notre expérience de 247 jours de consommation de moulée expérimentale chez l'omble de fontaine. Les poissons Low-P étaient plus gros que les poissons Normo-P. Ils ont développé certaines pathologies pouvant inmanquablement être associées à une carence en phosphore tel qu'un corps de forme ronde et courte engendré par la distension de la cavité abdominale et de l'accumulation de graisse à ce niveau ainsi qu'à la diminution de la masse osseuse. Les déformations du squelette de type « curled spine » confirmaient cette carence alimentaire. La léthargie, le manque d'appétit, les problèmes de flottabilité et la plus faible résistance lors des manipulations ne sont pas indépendants de la carence en phosphore mais ne peuvent pas y être associés directement à cause de la maturité sexuelle qui peut provoquer le même genre de signes cliniques.

Les résultats relatifs à la diète faible en phosphore n'ont pas démontré d'effet significatif chez l'espèce *Salvelinus fontinalis* sur la réponse immunitaire représentée par la phagocytose ni sur la résistance aux infections avec la bactérie *Aeromonas salmonicida*. Les valeurs de ces deux paramètres étaient toutefois légèrement supérieures chez les Low-P par rapport aux Normo-P. Le temps de survie moyen a diminué continuellement chez les deux groupes de poissons lors des différents essais infectieux. La non prolifération des lymphocytes B et T aux tests de transformation lymphoblastique ne nous permet pas de tirer de conclusion sur cet aspect de l'immunité cellulaire face à une carence en phosphore. Les résultats auraient été moins équivoques si les poissons n'avaient pas été exposés à des stress chroniques dès le début de l'expérience et s'ils n'avaient pas atteint la maturité sexuelle.

Néanmoins, ces facteurs de stress (paramètres physico-chimiques de l'eau, infections récurrentes, antibiotiques, salinité, formol et entretien accru des bassins) imposés durant l'étude sont communs et peuvent survenir dans une pisciculture commerciale. Les résultats obtenus peuvent donc s'approcher de ceux qu'on aurait pu obtenir dans de vraies conditions d'élevage. Il faut également tenir compte de la durée des essais nutritionnels sur l'impact des résultats. La plupart des essais nutritionnels sont habituellement réalisés sur

des périodes ne durant que quelques semaines. Il est donc peu probable que la durée de notre essai, de 8 mois ou 32 semaines, n'ait pas été suffisamment longue pour avoir eu un effet sur les paramètres immunitaires examinés ici.

Jusqu'à récemment, le phosphore n'était pas traité comme élément limitant dans les diètes utilisées en aquaculture. Il était généralement retrouvé en excès dans la moulée assurant ainsi une croissance maximale des animaux. La majorité des études publiées examinaient donc les carences absolues en phosphore associées aux lésions visibles et manifestes. Présentement, les études se dirigent d'avantage vers les effets imperceptibles et méconnus des carences en phosphore. Un régime alimentaire équilibré entre la croissance et les rejets minimaux peut potentiellement affecter les fonctions cellulaires incluant la division cellulaire, la production d'anticorps et d'autres mécanismes de défense immunitaire importants, entraînant ainsi une susceptibilité accrue aux infections et aux maladies. Le groupe des téléostéens est le plus diversifié de tous les groupes de vertébrés et est composé de plus d'espèces que tous les autres groupes combinés. Il représente donc un modèle intéressant d'évolution du système immunitaire (Weyts, 1999). Le développement actuel de l'industrie aquicole favorise la recherche et améliore la compréhension de l'immunité chez les poissons afin de répondre aux besoins des pisciculteurs en matière de prévention et de traitements des maladies. Le raffinement des protocoles et la mise en commun des connaissances sont des moyens qui permettront d'y arriver.

Perspectives

Nous pourrions préciser le portrait immunologique et les différences chez les poissons Low-P et Normo-P grâce aux prélèvements d'organes et de plasma congelés. Des analyses complémentaires de biochimie et d'endocrinologie peuvent être faites pour mesurer les protéines totales, le cortisol, l'activité du lysozyme et la production d'anticorps dans le plasma. Des tests de cytotoxicité cellulaire (avec les cellules NCC) et de flambée oxydative (*oxydative burst*) peuvent également être effectués à partir du foie et des branchies. Les changements micranatomiques au niveau des os, des muscles et des organes vitaux pourraient être évalués par des analyses histopathologiques chez les poissons Low-P. Des différences significatives ont été observées à ce niveau dans le même genre d'expérience nutritionnelle avec des saumons de l'Atlantique (Baeverfjord, 1998). Il est également rapporté que les signes de problèmes nutritionnels et de maladies virales sont similaires lorsque examinés au niveau de la microscopie cellulaire (Ghittino, 1989). La pesée des poissons éviscérés et la détermination précise de la masse osseuse chez les deux groupes permettraient d'apporter plus de précision sur le phénomène d'accumulation de graisse abdominale et de l'augmentation du poids. Les mesures de concentrations de la vitamine D₃ en circulation dans le plasma et en réserve dans le foie pourraient également être intéressante et permettraient une meilleure définition du rôle du phosphore entre le système immunitaire, le système endocrinien et le métabolisme osseux.

Bibliographie

Alcorn, S.W., Murray, A.L., Pascho, R.J., 2002. *Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (Oncorhynchus nerka)*. Fish and Shellfish Immunology, 12: 303-334.

Anderson, D.P., 1990. *Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks*. American Fishery Society Symposium, 8:38-50.

Anderson, D.P. 1996. *Environmental factors in fish health*. In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment*. Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp.289-310.

Angelidis, P., Baudin-Laurencin, F., Youinou, P., *Stress in rainbow trout, Salmo gairdneri: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to Aeromonas salmonicida*. Journal of Fish Biology. 31 (A): 113-122.

Austin, B., Austin, D.A., 1993. *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. 2nd ed, Horwood Limited in Aquaculture and Fisheries Support, ISBN 0130594946, 384 p.

Baeverfjord, G., Åsgård, T., 1998. *Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, Salmo salar L., par rand post-smolts*. Aquaculture Nutrition, 4: 1-11.

Bayne, C.J., Gerwick, L., 2001. *The acute phase response and innate immunity of fish*. Developmental and Comparative Immunology, 25: 725-743.

Bergey D.H., Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Noel R. Krieg editor, volume 1; John G. Holt editor-in-chief. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 964 p.

Bergey D.H., Holt, J.G., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 787 p.

Bernatchez, L., Giroux, M., 2000. *Les poissons d'eau douce du Québec*, les éditions Broquet, Ottawa, ISBN 2-89000-493-7.

Bernoeth, E.-M. Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G., Smith, P., 1997. *Furunculosis, multidisciplinary fish disease research*. Academic Press, California, USA, ISBN 0-12-093040-4. 529 p.

Björnsdottir, B., Gudmundsdottir, S., Bambir, S.H., Gudmundsdottir, B.K., 2005. *Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), by *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and evaluation of cross protection induced by a furunculosis vaccine*. Journal of Fish Diseases, 28: 181-188.

Blake, I., Clark, J., 1932. *Observations on experimental infection of trout by *B. salmonicida*: with particular reference to "carriers" of furunculosis and to certain factors influencing susceptibility*. Fishery Board for Scotland. Salmon Fisheries, 7: 1-13.

Blazer, V., Wolke, R.E., 1984a. *The effects of α -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)*. Aquaculture, 37: 1-9.

Blazer, V., Wolke, R.E., 1984b. *Effect of diet on the immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 41: 1244-1247.

Blazer, V., Ankley, G.T., Finco-Kent, D., 1989. *Dietary influences on disease resistance factors in channel catfish*. Developmental and Comparative Immunology, 13: 43-48.

Blazer, V., 1991. *Piscine macrophage function and nutritional influences: A review*. Journal of Aquatic Animal Health, 3: 77-86.

Blazer, V., 1992. *Nutrition and disease resistance in fish*. Annual Rev. of Fish Diseases, Pergamon Press Ltd., USA, pp. 309-323.

Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M. 1999. *Manual of Immunological Methods*, CRC Press LLC, Florida, USA, ISBN 0-8493-8558-X, 141 p.

- Buller, N.B.**, 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. CABI publishing, Wallingford. UK. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 361 p.
- Bureau, D.P., Cho, C.Y.**, 1999. *Phosphorus utilization by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : estimation of dissolved phosphorus waste output*. *Aquaculture*, 179: 127-140.
- Cho, C.Y., Bureau, D.P.**, 2001. *A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture*. *Aquaculture Research*, 32 (supp.1): 349-360.
- Cipriano, R.C.**, 1983. *Resistance of salmonids to *Aeromonas salmonicida*: relation between agglutinins and neutralizing activities*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 95-99.
- Cipriano, R.C., Blanch, A.R.**, 1989. *Different structural characteristics in the cell envelope of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida**. *Microbios Letters*, 40: 87-95.
- Cipriano, R.C., Bullock, G.L.**, 2001. *Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida**. Fish Disease Leaflet 66, National Fish Health Research Laboratory, West Virginia 25430, 30 p.
- Cipriano, R.C., Marchant, D., Jones, T.E., Schachte, J.H.**, 2002. *Practical application of disease resistance : a brook trout fishery selected for resistance to furunculosis*. *Aquaculture*, 206 (1-2): 1-17.
- Clem, L.W., Miller, N.W., Bly, J.E.**, 1991. *Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions, and temperature sensitivities*. pp 191-213. In: Warr, G.W., Cohen, N., 1991. *Phylogenesis of immune functions*. CRC Press, Florida, USA. 326 p.
- Coloso, R.M., King, K., Fletcher, J.W., Weis, P., Werner, A., Ferraris, R.P.**, 2003. *Dietary P regulates phosphate transporter expression, phosphatase activity, and effluent P partitioning in trout culture*. *Journal of Comparative Physiology*, B 173 : 519-530.

Compère, R., 1967. *L'étude de l'équilibre phosphocalcique du régime basée sur les variations du métabolisme phosphoré*. Éditions J. Duculot, S.A., Gembloux, Les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L., 132 p.

Correll, D.L., 1998. *The role of phosphorus in the eutrophication of receiving water: a review*. Journal of Environment Quality, 27: 261-266.

Coyne, R., Hjeltnes, B., Bergh, Ø., Anderson, K., Rudra, H., Smith, P., 2004. *Quantitative properties of data generated by the examination of Aeromonas salmonicida infected fish by the standard bacteriological loop*. Aquaculture, 236: 27-35.

Craddock, P.R., Yawata, Y., VanSanten, L., Gilberstadt, S., Silvis, S., Jacob, H.S., 1974. *Acquired phagocyte dysfunction: a complication of the hypophosphatemia of parenteral hyperalimentation*. New England Journal of Medicine, Vol. 290, No. 25, pp. 1403-1407.

Daly, J.G., Moore, A.R., Olivier, G., 1995. *A colorimetric assay for the quantification of brook trout (Salvelinus fontinalis) lymphocyte mitogenesis*. Fish and Shellfish Immunology, 5: 265-273.

Dautremepuits, C., Fortier, M., Croisetière, S., Belhumeur, P., Fournier, M., 2005. *Modulation of juvenile brook trout (Salvelinus fontinalis) cellular immune system after Aeromonas salmonicida challenge*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 110 (1-2): 27-36.

Demolon, A., 1949. *La carence phosphorique, ses répercussions en biologie*. Complément aux conclusions générales présentées aux « journées du phosphore », 1 vol. in-8°, Presses Universitaires de France, Paris, 154 p.

Demolon, A., Marquis, A., 1961. *Le phosphore et la vie*. Presses Universitaires de France, Collection QUE SAIS-JE, Paris, 127 p.

Douglas, P. A., 1990. *Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks*. American Fisheries Society Symposium, 8: 38-50.

- Ebanks**, R.O., Goguen, M., McKinnon, S., Pinto, D.M., Ross, N.W. 2005. *Identification of the major outer membrane proteins of Aeromonas salmonicida*. Diseases of Aquatic Organisms, 68: 29-38.
- Eckert**, R., Randall, D., Burggren, W., French, K., 1999. *Physiologie animale: mécanismes et adaptations*. 4^{ième} édition, De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 822 p.
- Ellis**, A.E., 2001. *Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria*. Developmental and Comparative Immunology, 25: 827-839.
- Enger**, Øivind, 1997. *Survival and inactivation of Aeromonas salmonicida outside the host – a most superficial way of life*. In: Bernoth E.-M. et al., *Furunculosis, multidisciplinary fish disease research*. Academic Press, California, USA, ISBN 0-12-093040-4. pp.159-177.
- Engstrom**, G.W., Horst, R.L., Reinhardt, T.A., Littledike, E.T., 1985. *Effect of dietary phosphorus levels on porcine renal 25-hydroxyvitamin D-1- α and 24R-hydroxylase activities and plasma 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration*. J. Anim. Sci., 60:1005-1011. In: Kegley, E.B., Spears, J.W., et al. 2001. *Dietary phosphorus and an inflammatory challenge affect performance and immune function of weanling pigs*. Journal of animal Science, 79: 413-419.
- Eya**, C.J., Lovell, R.T., 1998. *Effects of dietary phosphorus on resistance of channel catfish to Edwardsiella ictaluri challenge*. Journal of Aquatic Animal Health, 10 : 28-34.
- FAO** (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture), 2003. *État de l'aquaculture dans le monde*. Service des ressources des eaux intérieures et de l'aquaculture, division des ressources halieutiques, département des pêches de la FAO, circulaire sur les pêches n° 886, révision 2, Rome. ISSN1020-1459.
- Fortier**, Marlène, Institut National de Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Montréal, Québec, Canada, communications orales, 2004-2006.
- Ghittino**, P., 1989. *Nutrition and fish diseases*. In: Halver. John E., 1989. *Fish Nutrition*. 2nd edition, Academic Press, San Diego, California, pp. 682-713.

Gibson, D.M., Hendrie, M.S., Houston, N.C., Hobbs, G., 1977. *The identification of some Gram negative heterotrophic aquatic bacteria*. In: Skinner, F.A., Shewan, J.M. (eds). *Aquatic Microbiology*. Academic Press, London, pp. 135-159.

Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O., 2005. *Biotechnological production and applications of phytases*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5): 588-597.

Hardy, R.W., 1989. *Diet Preparation*. In: Halver, John E., 1989. *Fish Nutrition*. 2nd edition, Academic Press, San Diego, California, 798 p.

Hiney, M.P., Kilmartin, J.J., Smith, P.R., 1994. *Detection of Aeromonas salmonicida in Atlantic salmon with asymptomatic furunculosis infections*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19: 161-167.

Hiney, M.P., Smith, P.R., Bernoth, E.-M., 1997. *Covert Aeromonas salmonicida infections*. In: Bernoth E.-M. et al., *Furunculosis, multidisciplinary fish disease research*. Academic Press, California, USA, ISBN 0-12-093040-4. pp. 54-97.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2003. *Immunobiologie: le système immunitaire fondamentale et pathologique*. 2^{ième} édition française, De Boeck Université, Bruxelles, ISBN 2-7445-0150-6. 782 p.

Joyce, C., Deneau, A., Peterson, K., Ockenden, I., Raboy, V., Lott, J.N.A. 2005. *The concentrations and the distributions of phytic acid phosphorus and other mineral nutrients in wild-type and low phytic acid Js-12-LPA wheat (Triticum aestivum) grain parts*. *Canadian Journal of Botany*, 83(12): 1599-1607.

Johnston, P.V., 1988. *Lipid modulation of immune response*. *Nutrition and Immunology*. Chandra, R.K. (ed.), Alan R. Liss Inc., New-York, NY, pp. 37-86. In: Blazer, V., 1992. *Nutrition and disease resistance in fish*. *Annual Rev. of Fish Diseases*, Pergamon Press Ltd., USA, pp. 309-323

Jokinen, E.I., Vielma, J., Aaltonen, T.M., Koskela, J., 2003. *The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responses of European whitefish (Coregonus lavaretus L.).* Fish and Shellfish Immunology, 15: 159-168.

Kaattari, S.L., Piganelli, J.D., 1996. *The specific immune system : humoral defense.* In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment.* Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp.207-254.

Karp, G., 1998, *Biologie cellulaire et moléculaire, concepts et expériences.* De Boeck Université, 773 p., ISBN 2-7445-0017-8.

Kegley, E.B., Spears, J.W., Auman, S.K., 2001. *Dietary phosphorus and an inflammatory challenge affect performance and immune function of weanling pigs.* Journal of Animal Science, 79: 413-419.

Ketola, H.G., 1975. *Requirement of Atlantic Salmon for Dietary Phosphorus.* Trans. Am. Fish. Soc., 3: 548-552.

Kiersztein, M., Chervu, I., Smogorzewski, M., Fadda, G.Z., Alexiewicz, J.M., Massry, S.G., 1992. *On the mechanisms of impaired phagocytosis in phosphate depletion.* Journal of the American Society of Nephrology, 2 (10): 1484-1489.

Labbé, M., Fabrykant, M., 1933. *Le phosphore, techniques chimiques-physiologie-pathologie-thérapeutique.* Éditeurs Masson & C^{ie}, Librairie de l'Académie de Médecine, Paris, 395 p.

Lacroix, A., Fournier, M., Lebeuf, M., Nagler, J.J., Cyr, D.G., 2001. *Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (Hypoglossoides platessoides) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec.* Chemosphere 45: 599-607.

Lall, S.P., 1989. *The Minerals.* In: Halver, John E., 1989. *Fish Nutrition.* 2nd edition, Academic Press, San Diego, California, 798 p.

Lapointe, M., 1990. *Modalités d'ensemencement pour l'omble de fontaine : revue et analyse critique de la littérature*. Ministère du loisir, de la chasse et de la pêche. Laboratoire de recherche sur les communautés aquatiques, département de chimie-biologie, UQTR. 51 p.

Larousse, Le petit, 1996. Dictionnaire encyclopédique illustré. 1782 p.

Law, W-Y., Chen, W-H., Song, Y-L., Dufour, S., Chang, C-F. 2001. *Differential in vitro suppressive effects of steroids on leukocyte phagocytosis in two teleosts, tilapia and common carp*. General and Comparative Endocrinology, 121: 163-172.

LeJeune, R., 1987. *Survol de la documentation relative à l'omble de fontaine anadrome*. Ministère du loisir, de la chasse et de la pêche. Direction de la faune aquatique. Rapp. techn., 39 p.

Lellis, W.A., Barrows, F.T., Hardy, R.W., 2004. *Effects of phase-feeding dietary phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. Aquaculture, 242 (1-4): 607-616.

Lemire, J.M., Adams, J.S., Sakai, R., Jordan, S.C., 1984. *1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells*. Journal of Clinical Investigation, 74: 657-661.

Leonardi, M.O., Klempau, A.E., 2003. *Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere*. Aquaculture, 221: 581-591.

Lunden, T., Bylund, G., 2000. *The influence of in vitro and in vivo exposure to antibiotics on mitogen-induced proliferation of lymphoid cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Fish & Shellfish Immunology, 10: 395-404.

Manning, M.J., Nakanishi, T., 1996. *The specific immune system: cellular defenses*, In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment*. Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp.159-205.

MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'Alimentation du Québec), 2004. *Lois et règlements relatifs à l'aquaculture en eau douce*. Document d'information STPED-04, Direction générale des pêches et de l'aquaculture commerciale. 14 p.

MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'Alimentation du Québec), 2005. *Stratégie de développement durable de l'aquaculture en eau douce au Québec. Portrait aquaenvironnemental, phase 1 – Rapport global*. Direction générale des pêches et de l'aquaculture commerciales. Direction de l'innovation et des technologies. 79 p.

Marquis, H., 1986. *Protection contre Aeromonas salmonicida par immunisation passive chez l'omble de fontaine (Salvelinus fontinalis) infecté par immersion*. Mémoire de maîtrise, pathologie et microbiologie vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, SF 607 U54 1986 v.003 ex.2, 116 p.

Marsh, M.C., 1902. *Bacterium truttae, a new bacterium pathogenic to trout*. Science, 16: 706.

McCarthy, D.H., 1977. *Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen – Aeromonas salmonicida*. In: Skinner, F.A., Shewan, J.M. (eds). *Aquatic Microbiology*. Academic Press, London, pp.299-324.

McDaniel, N.K., Sugiura, S.H., Kehler, T., Fletcher, J.W., Coloso, R.M., Weis, P., Ferraris, R., 2005. *Dissolved oxygen and dietary phosphorus modulate utilization and effluent partitioning phosphorus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) aquaculture*. Environmental Pollution, 138: 350-357.

MEF (Ministère de l'Environnement et de la Faune), 1998. *Critères de la qualité de l'eau de surface au Québec*. Direction des écosystèmes aquatiques, Québec, 387 pages.

MLCP (Ministère du loisir, de la chasse et de la pêche), 1982. *Compte-rendu de l'atelier sur la gestion de l'omble de fontaine au Québec*. Gouvernement du Québec. Direction générale de la faune. Direction générale des opérations régionales. 207 p.

Morin, R., 2004. *La production piscicole au Québec*. Document d'information STPED-02. Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'Alimentation du Québec. Direction générale des pêches et de l'aquaculture commerciales. 8 p.

MPO (Ministère des Pêches et Océans Canada), 2005. *Industrie canadienne de l'aquaculture (2003-2004) - Chiffres clés*. Direction générale des communications, Ottawa. MPO/2005-271, N°cat. Fs23-465/2004, ISBN 0-662-68877-5, 14 p.

Noga, E.J., 1996. *Fish disease: diagnosis and treatment*. Mosby- Year Book Inc., Missouri, USA, ISBN 1-55664-374-8, 367 p.

Odamaki, M., Furuya, R., Ohkawa, S., Yoneyama, T., Nishikino, M., Hishida, A., Kumagai, H. 1999. *Altered abdominal fat distribution and its association with non-diabetic haemodialysis patients*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14: 2427-2432.

Olivier, G., Moore, A.R., Fildes, J., 1992. *Toxicity of Aeromonas salmonicida cells to Atlantic salmon, Salmo salar, peritoneal macrophages*. *Developmental and comparative immunology* 16, pp.49-61. In: Bernoth, E.-M, et al. *Furunculosis, multidisciplinary fish disease research*. Academic Press Ltd, California, USA, p 42.

Olivier, G., 1997. *Effect of nutrition on furunculosis*. In: Bernoth, E.-M, et al. *Furunculosis, multidisciplinary fish disease research*. Academic Press Ltd, California, USA, pp. 327-344.

Pavan, M.E., Abbott, S.L., Zorzopulos, J., Janda, J.M., 2000. *Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1119-1124.

Prescott, Harley, Klein, 1995. *Microbiologie*. 2^{ième} édition, De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1014 p.

Press, C.M., Dannevig, B.H., 1994. *Immune and enzyme-histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic Salmon (Salmo salar L)*. *Fish and Shellfish immunology*, 4(2): 79-93.

- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 2004.** *Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids.* Fish and Shellfish Immunology, 16: 25-39.
- Raison, R.L., 2002.** *Immunology and sustainable aquaculture.* Developmental and Comparative Immunology, Editorial, 26: 129-130.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W.L., 1999.** *Influence of microbial phytase on apparent ileac amino acid digestibility of feedstuffs for broilers.* Poultry Science, 78, pp. 699-706.
- Roberts, R.J., Bullock, A.M., 1989.** *Nutritional Pathology.* In: Halver, John E., 1989. *Fish Nutrition.* 2nd edition, Academic Press, San Diego, California, pp.423-473.
- Roberts, R.J., Hardy, R.W., Sugiura, S.H., 2001.** *Screamer disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile.* Journal of Fish Diseases, 24:543-549.
- Rodehutscord, M., 1996.** *Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 200 g to supplements of dibasic sodium phosphate in a semipurified diet.* American Institute of Nutrition, 0022-3166/96, pp. 324-331.
- Salmenniemi, V., Ruotsalainen, E., Pihlajamäki, J., Vanhkonen, I., Kainulainen, S., Punnonen, K., Vanninen, E., Laakso, M. 2004.** *Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome.* Circulation, 110: 3842-3848.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Láiz-Carrion, R., Miguez, J.M., Martín Del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. 2004.** *Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*.* Journal of experimental zoology, 303A: 761-775.
- Satoh, S., Hernández, A., Tokoro, T., Morishita, Y., Kiron, V., Watanabe, T., 2003.** *Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and low fish meal based diet.* Aquaculture, 224: 271-282.

Schreck, C.B., 1996. *Immunomodulation: endogenous factors*. In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment*. Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp.311-337.

Secombes, C.J. 1996. *The non-specific immune system: cellular defenses*. In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment*. Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp. 63-157.

Sierra-Johnson, J., Johnson, B.D., *Facial fat and its relationship to abdominal fat: a marker for insulin resistance?* Medical Hypotheses, 63 (5): 783-786.

Smith, L.S., 1989. *Digestive functions in teleost fishes*. In: Halver, John E., 1989. *Fish Nutrition*. 2nd edition, Academic Press, San Diego, California, pp. 331-421.

Smith, Peter, 1996. *The epizootiology of furunculosis: the present state of our ignorance*. In: Bernoth, E.-M, et al. *Furunculosis, multidisciplinary fish disease research*. Academic Press Ltd, California, USA, pp.25-53.

Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. *Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems*. Environmental Pollution 100, pp. 179-196.

Spallholz, J.E., Stewart, J.R., 1989. *Advances in the role of minerals in immunology*. Biological Trace Element Research, 19:129-151. The Humana Press Inc.

Stoskopff, M.K., 1993, *Fish medicine*. WB. Saunders Compagny, Philadelphia, Pennsylvania. 882 p.

Sugiura, S.H., Dong, F.M., Hardy, R.W., 2000a. *A new approach to estimating the minimum dietary requirement of phosphorus for large rainbow trout on nonfecal excretions of phosphorus and nitrogen*. American Society for Nutritional Sciences, Nutrient Requirements, pp. 865-872.

Sugiura, S.H., Dong, F.M., Hardy, R.W., 2000b. *Primary responses of rainbow trout to dietary phosphorus concentrations*. Aquaculture, 6: 235-245.

- Sugiura, S.H., Hardy, R.W., Roberts, R.J., 2004.** *The pathology of phosphorus deficiency in fish-a review.* Journal of Fish Diseases, 27: 255-265.
- Takashima, F., 1982.** *An atlas of fish histology: normal and pathological features.* Ed. T. Hibiya, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Takeuchi, M., Nakazoe, J., 1981.** *Effect of dietary phosphorus on lipid content and its composition in carp.* Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 47(3): 347-352.
- Tarte, P.A., 2004.** *Analyse du CMH de classe II β chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et résistance   *Aeromonas salmonicida*.* Mémoire de maîtrise, Département de microbiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, W 4 U58 2004 v.143 ex.2, 101 p.
- Thuvander, A., Norrgren, L., 1987.** *Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy.* Journal of Fish Biology, 31: 197-208.
- Thuvander, A., 1990.** *The immune system of salmonid fish: establishment of methods for assessing effects of aquatic pollutants on the immune response.* Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala 1990, ISBN 91-576-4283-4.
- Tillitt, D.E., Giesy, P.J., Fromm, P.O., 1988.** *In vitro mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*).* Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 89A, No 1, pp.25-35.
- Tizard, I.R., 2000.** *Veterinary immunology : an introduction.* 6nd edition, W.B. Saunders Compagny, ISBN 0-7216-8218-9, pp. 434-447.
- Vielma, J., Lall, S.P., 1998.** *Control of phosphorus homeostasis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in fresh water.* Fish Physiology and Biochemistry, 19: 83-93.

Warr, G.W., Simon, R.C., 1983. *The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout (Salmo gairdneri) re-examined.* Developmental and Comparative Immunology, 7: 379-384.

Weyts, F.A.A., Cohen, N., Flik, G., Verburg-Van Kemenade, B.M.L., 1999. *Interaction between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish.* Fish and Shellfish Immunology, 9: 1-20.

Wood, R.J., Serfaty-Lacrosnière C., 1992. *Gastric acidity, atrophic gastritis, and calcium absorption.* Nutr. Rev., 50: 33-40.

Wooster, G.A., Bowser, P.R., 1996. *The aerobiological pathway of a fish pathogen: survival and dissemination of Aeromonas salmonicida in aerosols and its implications in fish health management.* Journal of the World Aquaculture Society, 27: 7-14.

Yano, T., 1996. *The non-specific immune system: humoral defense.* In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment.* Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp.105-157.

Zapata, A.G., Chibà, A., Varas, A., 1996. *Cells and tissues of the immune system of fish.* In: Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The fish immune system, organism, pathogen and environment.* Vol. 15 of Fish Physiology series, Academic Press, California, pp.1-63.

Zhang, X., Roland, D.A., McDaniel, G.R., Rao, S.K., 1999. *Effect of Natuphos phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acids of broilers.* Poult Sci. 78, 1567-1592.

Sites internet

Site web de About (Health & Fitness) :

<http://stress.about.com/od/stresshealth/a/cortisol.htm> consultation août 2006

Site web de Biam (Banque de Données Automatisée sur les Médicaments) :

<http://www.biam2.org/www/Sub179.html#SubMeca> consultation août 2006

Site web du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) :

www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/degradation/09_eutrophisation.htm
consultation août 2006

Site web de ITIS (Integrated Taxonomic Information System):

<http://www.itis.usda.gov/index.html> consultation août 2006

Site web de Laease (Groupe technologies de Santé): www.laease.com/phosphore.html

consultation août 2006

Site web de OBIS (Ocean Biogeographic Information System):

<http://www.iobis.org/Welcome.htm> consultation août 2006

Site web de ULaval: <http://www.vrr.ulaval.ca/bd/chercheur/fiche/424160.html>

consultation août 2006

Site web de ULg (Université de Liège): <http://www.ulg.ac.be/physioan/traite.htm>

consultation août 2006

Annexe 1

Arrivée des poissons dans l'unité # 1 du LARSA le 6 avril 2005

	Bassin 1 (Normo-P)	Bassin 2 (Low-P)
Nombre de poissons	1251	1251
Biomasse totale (kg)	44,955 kg	45,038 kg
Poids moyen (g)	35,9 g	36,0 g
Charge (kg/m³)	14,99 kg/m ³	15,01 kg/m ³
Température (°C)	14 °C	14 °C

Annexe 2

Les différents types de moulées utilisés durant l'étude

Endroit	Type de moulée	Utilisation
Pisciculture des Alléghanys	Nutra Fry™ de 3mm de la compagnie Skretting (Moore-Clark)	à la pisciculture d'où viennent les poissons puis quelques jours à leur arrivée au LARSA
LARSA	Corey Vigor™ de 3mm de la compagnie Corey Aquafeeds	pendant la fabrication de la moulée expérimentale du 6 avril au 11 juillet 2005
LARSA	moulée expérimentale fabriquée à Université Laval : Low-P et Normo-P	pour tout l'essai nutritionnel et les tests immunologiques du 11 juillet au 11 novembre 2005
Station épuration des eaux usées de Montréal	moulée expérimentale fabriquée à Université Laval : Low-P et Normo-P	pour tous les essais infectieux entre le 14 novembre 2005 et le 16 mars 2006

Annexe 3

Composition des régimes alimentaires pour 6 kg de moulée expérimentale sèche

Ingrédients	moulée équilibrée (Normo-P)	moulée déficiente (Low-P)
Farine de poisson <i>Sea Pro 75 Non-Hydrolysed fish meal, # 01-011, Bio Oregon</i>	900g	900g
Farine de sang <i>Cellule sanguine AP301 JEFO NUTRITION INC.</i>	600g	600g
Farine de plume <i>Rothsay Feather meal Rothsay</i>	600g	600g
Farine à pâtisserie <i>Robin hoods</i>	654g	744g
Tourteau de soya <i>Tourteau de soya (46%), # 224 Meunerie Gérard Soucy</i>	360g	360g
Gluten de blé <i>Wheat gluten, # XAD115 Corey Feed Mills Ltd</i>	300g	300g
Gluten de maïs <i>Corn gluten, # S.C.342 Bi-Pro Marketing limited</i>	1020g	1020g
Lactosérum <i>Whey, parmalat 73% lactose, #506 Meunerie Gérard Soucy</i>	300g	300g
Huile de poisson <i>Hearing oil, # XL1005 Corey Feed Mills Ltd</i>	420g	420g
Phosphore minéral (CaHPO₄) <i>Phosphate de calcium dibasique 99%, #CR- 0118, Laboratoire MAT</i>	90g	0g
Vitamines et minéraux <i>Salmonid vit/min premix, # XV1006 Corey Feed Mills Ltd</i>	36g	36g
Sipernat <i>Sipernat 50 JEFO NUTRITION INC.</i>	120g	120g
Huile de poisson après séchage (pour appétence)	600g	600g

Annexe 4

Québec, 29 novembre 2005

- Analyses de phosphore (P), de matière sèche (DM) et de cendre (ASH) pour la moulée expérimentale Normo-P et Low-P
- Analyses réalisées par Annie Desmeules, le 25 octobre 2005.

Résultats :

	#	% DM	% ASH	% P (DM)	% P dig.	Dig P/Dig E (g / MJ)
Déficiente	1	92,73	5,06	0,50		
	2	92,72	5,01	0,51	0,24	0,138
	3	92,75	5,04	0,47		
Normale	1	94,33	6,11	0,77		
	2	94,32	6,12	0,84	0,47	0,277
	3	94,34	6,14	0,79		

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Département des sciences animales

Pavillon Paul Comtois

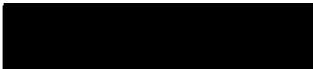
(418) 656-2131 poste 6580

Local 4131

Télécopieur : (418) 656-3766

Québec, (Québec)

G1K 7P4



Annexe 5

Résumé de l'échéancier du protocole d'alimentation au LARSA

Dates importantes	Protocole
6 avril 2005	Alimentation à 50% des chartes avec moulée commerciale.
26 juin 2005	Augmentation des rations pour permettre aux biofiltres de s'adapter au protocole à satiété
11 juillet 2005	Début de l'alimentation à satiété avec les moulées expérimentales normale et faible en phosphore
15 août 2005	Atteinte de la ration maximale permise pour le bon fonctionnement des biofiltres soit 1200 g de moulée par bassin (unité 3).
14 septembre 2005	Dénombrement des poissons pour biomasse exacte. Le calcul des rations à 100% des chartes commerciales avec FCR de 1,0 donne environ 700g de moulée par bassin.
11 novembre 2005	Fin de l'essai nutritionnel. Mise au jeûne des poissons pour le transfert de Québec à Montréal.

Annexe 6

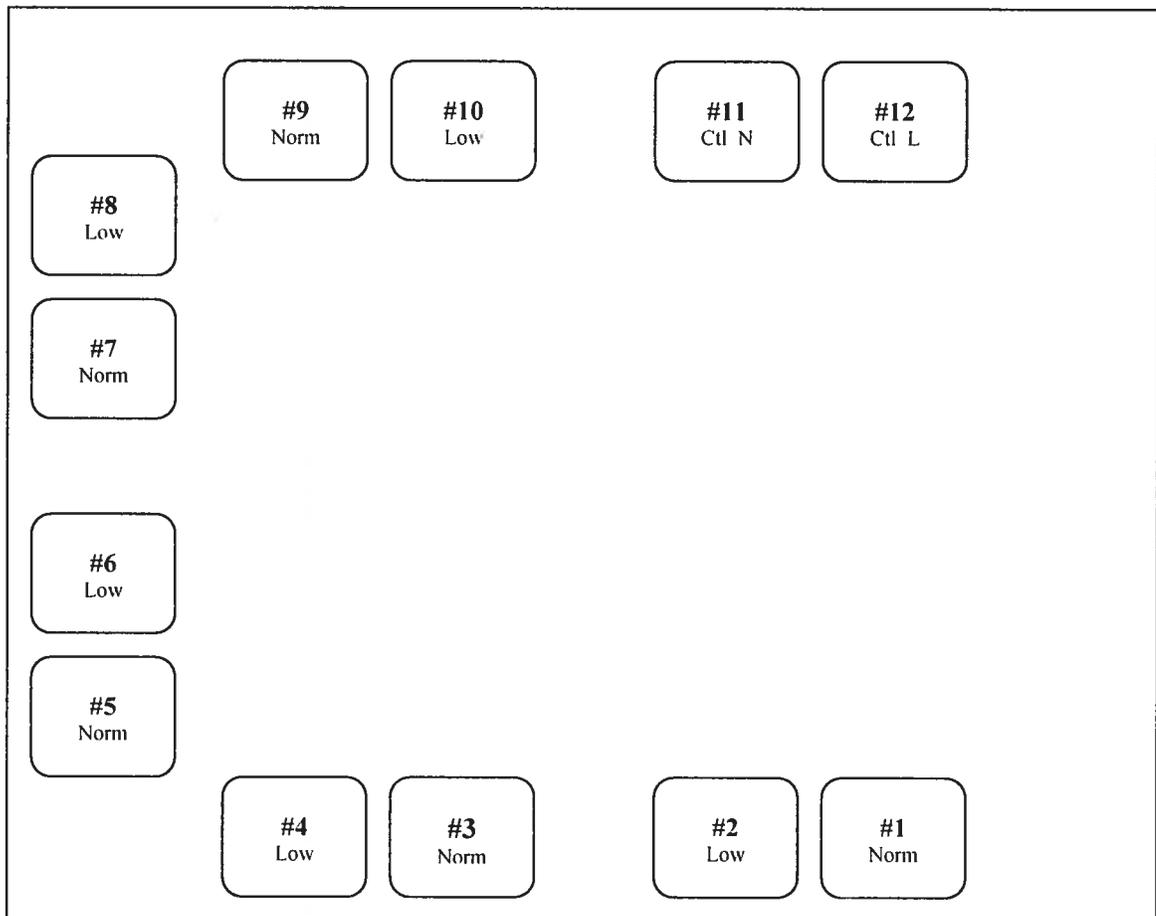
Plan des installations aquatiques du laboratoire d'écotoxicologie de la station d'épuration des eaux usées de Montréal

Patrick Cejka

Service de l'environnement
12001, Maurice Duplessis
Montréal (Québec)
Canada H1C 1V3

► Téléphone : (514) 280-4415

► Télécopieur : (514) 280-4387



Annexe 7

Les rations alimentaires données aux poissons doivent être ajustées en fonction de leur croissance. Pour ce faire, il n'est pas nécessaire de peser tous les poissons mais il faut un échantillon représentatif d'au moins 20% des poissons de l'unité.

Les pesés mensuelles permettent aussi de calculer l'indice de croissance des poissons, l'entassement, la biomasse et le facteur de condition. Ces calculs sont très utiles pour détecter un problème de nutrition ou de santé chez le poisson.

Ce document est une gracieuseté d'Émilie Proulx du laboratoire de Grant Vandenberg de l'Université Laval.

Calculs

$$\text{Thermal Growth Coefficient (TGC)} = \frac{\sqrt[3]{\text{Poids moyen final}} - \sqrt[3]{\text{Poids moyen initial}}}{\text{Température} \times \text{Temps(jours)}} \times 100$$

$$\text{Efficacité Alimentaire (F:G)} = \frac{\text{Quantité de nourriture distribuée (g)}}{\text{Gain de poids des poissons (g)}}$$

$$\text{Biomasse} = \text{Poids moyen poissons (kg)} \times \text{Nombre total poissons}$$

$$\text{Entassement} = \frac{\text{Biomasse}}{\text{volume (m}^3\text{)} \times \text{Longueur moyenne poissons (cm)}}$$

$$\text{Facteur de condition (FC)} = \frac{\text{Poids poissons (g)}}{(\text{Longueur poissons (cm)})^3} \times 100$$

* Efficacité alimentaire = G : F

Conversion alimentaire (FCR) = F : G

$$\text{Facteur de condition (FC)} = \frac{\text{Poids poissons (g)}}{(\text{Longueur poissons (cm)})^3} \times 100$$

* Efficacité alimentaire = G : F

Conversion alimentaire (FCR) = F : G

Table de croissance (Moore-Clark)

CALCUL : Biomasse x Ratio x FCR_{anticipé} / 100

Fish WT g	2oC %/B.W.	4oC %/B.W.	6oC %/B.W.	8oC %/B.W.	10oC %/B.W.	12oC %/B.W.	14oC %/B.W.	16oC %/B.W.	18oC %/B.W.
0,5	0,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	4,00	6,00	6,00
1	1,00	1,00	2,00	2,00	3,00	4,00	4,00	5,00	5,00
2	0,50	1,00	1,50	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00
3	0,67	1,00	1,67	2,33	3,00	3,33	4,00	4,67	5,00
4	0,50	1,25	1,75	2,25	3,00	3,50	4,00	4,50	5,25
5	0,60	1,20	1,80	2,20	2,80	3,40	4,00	4,60	5,20
6	0,50	1,17	1,67	2,33	2,83	3,50	4,00	4,50	5,00
7	0,57	1,14	1,71	2,29	2,86	3,43	3,86	4,43	5,00
8	0,50	1,13	1,63	2,25	2,75	3,25	3,88	4,38	5,00
9	0,56	1,11	1,67	2,11	2,67	3,22	3,78	4,22	4,78
10	0,50	1,00	1,50	2,10	2,60	3,10	3,70	4,20	4,60
20	0,40	0,80	1,20	1,60	1,95	2,35	2,75	3,20	3,50
30	0,33	0,67	1,03	1,37	1,70	2,03	2,37	2,70	3,07
40	0,30	0,60	0,90	1,20	1,48	1,78	2,08	2,38	2,70
50	0,26	0,54	0,80	1,06	1,32	1,58	1,86	2,12	2,38
60	0,25	0,48	0,73	0,98	1,22	1,47	1,70	1,95	2,20
70	0,23	0,46	0,69	0,93	1,14	1,39	1,61	1,83	2,06
80	0,23	0,44	0,66	0,89	1,10	1,33	1,55	1,78	1,99
90	0,21	0,43	0,64	0,86	1,08	1,29	1,51	1,71	1,93
100	0,21	0,42	0,63	0,84	1,05	1,26	1,48	1,69	1,88
110	0,21	0,41	0,62	0,83	1,03	1,24	1,44	1,65	1,85
120	0,20	0,41	0,61	0,81	1,01	1,22	1,42	1,63	1,82
130	0,20	0,40	0,60	0,79	0,99	1,19	1,39	1,58	1,78
140	0,19	0,39	0,59	0,79	0,98	1,18	1,36	1,56	1,77
150	0,19	0,39	0,58	0,77	0,97	1,16	1,35	1,55	1,75
160	0,19	0,38	0,57	0,76	0,95	1,14	1,33	1,53	1,70
170	0,19	0,38	0,56	0,75	0,94	1,12	1,31	1,50	1,69
180	0,18	0,37	0,56	0,74	0,92	1,11	1,29	1,48	1,66
190	0,18	0,36	0,55	0,73	0,91	1,09	1,27	1,45	1,63
200	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90	1,08	1,25	1,44	1,62
250	0,17	0,34	0,51	0,68	0,84	1,02	1,19	1,36	1,52
300	0,16	0,32	0,48	0,65	0,81	0,97	1,13	1,28	1,45
350	0,15	0,31	0,47	0,62	0,78	0,93	1,09	1,25	1,40
400	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	1,06	1,20	1,35
450	0,15	0,29	0,44	0,58	0,73	0,88	1,02	1,16	1,31
500	0,14	0,28	0,43	0,57	0,71	0,85	0,99	1,13	1,27
550	0,14	0,28	0,42	0,55	0,69	0,83	0,97	1,11	1,25
600	0,14	0,27	0,41	0,54	0,68	0,82	0,95	1,09	1,22
650	0,13	0,27	0,40	0,53	0,67	0,80	0,93	1,06	1,19
700	0,13	0,26	0,39	0,52	0,65	0,78	0,91	1,04	1,18
750	0,13	0,26	0,39	0,51	0,64	0,77	0,90	1,03	1,16
800	0,13	0,25	0,38	0,51	0,63	0,76	0,88	1,01	1,14
850	0,12	0,25	0,37	0,50	0,62	0,75	0,87	0,99	1,12

