



UNIVERSITÉ DE LIEGE

UNIVERSITÉ DE NAMUR



FACULTÉ DES SCIENCES

Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture

Travail de fin d'étude

Etude *in vitro* de la réponse immunitaire induite par les lipopolysaccharides (LPS) chez les leucocytes des juvéniles de la carpe commune nourris avec des AGLPIs (DHA et ARA) ou des huiles végétales

Réalisé par

Jean Marc-Arthur J. SALOMON

Promoteur

Patrick **KESTEMONT**

Encadrant

Thi Mai **NGUYEN**

Co-Promoteur

Robert **MANDIKI**

Année académique : 2018-2019

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MASTER

Spécialisation : Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture

Etude *in vitro* de la réponse immunitaire induite par les lipopolysaccharides (LPS) chez les leucocytes des juvéniles de la carpe commune nourris avec des AGLPIs (DHA et ARA) ou des huiles végétales

Par

Jean Marc-Arthur J. SALOMON

Année de soutenance : 2019

Sous la direction de :

Promoteur
Patrick **KESTEMONT**

Encadrant
Thi Mai **NGUYEN**

Co-Promoteur
Robert **MANDIKI**

Présenté le : 09/09/2019

devant le jury :

Patrick **KESTEMONT**

Robert **MANDIKI**

Thierry **JAUNIAUX**

REMERCIEMENTS

Ce travail présenté ici bénéficie, à des degrés variés, des efforts et supports d'un ensemble de personnes et d'institutions. Ainsi, je tiens à remercier :

- L'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES) de m'avoir octroyé cette bourse de Master de spécialisation ;
- L'Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive (URBE) pour l'accueil et les infrastructures mises à disposition afin de réaliser ce travail ;
- Le responsable du master professeur Charles MÉLARD pour son accompagnement tout le long de ce master ;
- Le promoteur professeur Patrick KESTEMONT et le co-promoteur professeur Robert MANDIKI pour la supervision du travail et les précieuses remarques ;
- L'encadreur Thi Mai NGUYEN pour son infatigable patience, son assistance, sa disponibilité et sa passion pour le travail bien fait ;
- Tous les professeurs à l'Université de Liège et à l'Université de Namur rencontrés dans le cadre de ce master ;
- Le doyen de la FSA de l'Université Caraïbe : Jean verdieu NELSON pour son support ;
- Les personnels et les techniciens de l'URBE ;
- Mes amis et collègues à l'Université de Liège : Andrianarivo PAUL, Enaud JEAN PIERRE, Emmanuel RENE, Germaine DOMINIQUE, James POLICIER, Mahugnon Hamil Bonard VODOUGNON, Marc JEAN-JACQUES, Pythagore Jean Fécu LAGUERRE ;
- Mes ami(e)s compatriotes Haïtien(ne)s : Jeannette TOUSSAINT, Robert ALCIDE, Troy E. SAINTIL ;
- Mes ami(e)s et collègues à MCN en Haïti : Altis Henri ROBERT, Anxo Fils ESTIGENE, Assade JOSEPH, Bethny Flore Landy ELISME, Berthony LAFRANCE, Ducasse JEAN-BOSCO, Mickenson ESTINFORT, Nerline FLEURISSAINT ;
- Ma famille : Bellandy J. SALOMON, Elna SALOMON, Frantzdy SALOMON, Inomise PIERRE, Jackson SALOMON et Sendy Augustin SALOMON ;
- Ma chérie Ronyde NARCISSE pour son support et son amour incommensurable ;
- Tous ceux et toutes celles qui m'ont conseillé et aidé d'une façon ou d'une autre dans la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

Ce travail a été réalisé pour étudier l'impact de diverses sources de lipides végétales chez les leucocytes des reins des juvéniles de la carpe commune (*Cyprinus carpio*) stimulés avec les lipopolysaccharides (LPS). Pour y parvenir, la dose optimale de LPS d'*E. coli* a d'abord été déterminée sur les leucocytes des juvéniles de la carpe commune. Ensuite, des leucocytes ont été collectés sur différents groupes de juvéniles de carpes nourries pendant 6 semaines avec 6 régimes alimentaires à base de diverses sources lipidiques : l'huile de foie de morue (CLO), l'huile de lin (LO), l'huile de sésame (SO), un mélange de l'huile de sésame et de l'huile de lin (SLO), l'huile de lin supplémentée avec 1% d'ARA (LOA) et l'huile de sésame supplémentée avec 2.3% de DHA (SOD). Chaque régime était testé en triplicat. Les leucocytes des reins de 36 poissons à raison de 6 poissons par régime ont été récoltés et cultivés pour enfin incuber au LPS pendant 4 et 24 heures afin d'analyser la réponse immunomodulatrice.

La dose optimale induisant une immunomodulation chez la carpe est de 10 µg/mL sur la base d'activation de 89% de leucocytes après incubation pendant 4 et 24 heures. Les résultats ont aussi montré une production de NO comparable entre le groupe témoin et les groupes traités indiquant que cette dose de LPS testée n'a pas eu d'effet négatif sur le système immunitaire et contribue uniquement à stimuler l'activation des leucocytes. La modulation du niveau d'expression des gènes pro-inflammatoires (*il-8*, *cxc*, *il-1*, *tnf-α*, *il-6*, *nf-κb* et *inos*) est induite 4h après incubation au LPS quel que soit le groupe de leucocyte pour ensuite revenir à un niveau basal après 24 heures. Cette augmentation après 4 heures est plus faible surtout pour les régimes LO et SO, ce qui indiquerait une atténuation des processus pro-inflammatoires pour les huiles végétales pures testées dans ces régimes. Enfin pour l'expression du gène anti-inflammatoire (*il-10*), les groupes de leucocytes Ctrl et LOA ne sont pas différents, ce qui indiquerait qu'aucune réponse anti-inflammatoire n'est produite après 4 heures pour ce groupe de leucocytes LOA.

En conclusion, cette étude montre que les huiles végétales (de lin et de sésame) utilisées pures ou en mélange ou encore en supplémentation avec le DHA ou l'ARA dans les régimes, réduisent les processus pro-inflammatoires induits par le LPS. Ces huiles, utilisées seules, donnent les mêmes résultats d'atténuation qu'en mélange ou encore en supplémentation. Donc, suite à ces résultats, les huiles de lin et de sésame sont vivement suggérées dans les régimes alimentaires par rapport aux mélanges d'huile de lin et de sésame ou aux supplémentations de ces huiles avec DHA et l'ARA.

Mots clés : *Cyprinus carpio*, huiles végétales, DHA, ARA, LPS, immunité

Table des matières

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ.....	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ANNEXES.....	vii
I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
1.1. Problématique et justification de l'étude.....	1
1.2. Objectifs de l'étude	2
1.3. Quelques paramètres d'élevage de l'espèce	2
1.4. Aperçu du système immunitaire chez les poissons	2
1.4.1. Immunité innée ou naturelle.....	3
1.4.2. Immunité adaptative ou acquise	3
1.5. Interactions entre les acides gras essentiels (DHA/EPA/ARA) et les fonctions immunitaires chez les poissons	4
1.5.1. Importance des AGLPIs dans le processus immunitaire chez les poissons.....	4
1.5.2. Particularités chez la carpe	6
1.6. Lipopolysaccharides.....	7
1.6.1. Structure et voies d'administration.....	7
1.6.2. Utilisation des lipopolysaccharides comme immunostimulant chez les poissons	8
1.7. Interaction entre les acides gras essentiels et la réponse immunitaire aux LPS	8
II. MATERIEL ET METHODES	10
2.1. Protocole expérimental.....	10
2.2. Méthodes	11
2.2.1. Phase expérimentale <i>in vitro</i>	11
2.2.2. Préparation et culture des leucocytes.....	11
2.2.3. Détermination de la densité cellulaire	11
2.2.4. Challenge LPS.....	12
2.3. Analyses de l'activité immunitaire.....	12
2.3.1. Le dosage de l'activité de la peroxydase	12
2.3.2. Le dosage de la production de l'oxyde nitrique (NO)	12
2.3.3. Le dosage de la concentration d'immunoglobulines totales (Ig totales)	13
2.3.4. Analyse du mode d'expression des gènes	13
2.4. Traitement des données et Analyses Statistiques	15
III. RÉSULTATS	16

3.1.	Détermination de la dose optimale de lipopolysaccharides (LPS)	16
3.2.	Influence de la qualité des AGLPIs sur la réponse immunitaire <i>in vitro</i> chez les leucocytes de la carpe commune.....	17
3.2.1.	Activité de la peroxydase	17
3.2.2.	La production d'oxyde nitrique	17
3.2.3.	Le taux d'immunoglobulines totales	18
3.3.	Niveau d'expression des gènes immunitaires.....	18
IV.	DISCUSSION	23
4.1.	Dose immunomodulatrice de LPS chez la carpe commune	23
4.2.	Effet des huiles végétales sur la réponse immunomodulatrice des leucocytes au LPS	23
4.3.	Effet de la supplémentation en ARA ou DHA sur la réponse immunomodulatrice des leucocytes au LPS	25
V.	CONCLUSION	26
VI.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG	: Acide Gras
AGPI	: Acide Gras Poly-Insaturé
AGPI-LC	: Acide Gras Poly-Insaturé Longue Chaîne
AGLPI	: Acide Gras Long Poly-Insaturé
ALA	: Alpha Linoléique Acide
ANOVA	: Analysis of variance
ARA	: Acide Arachidonique
C	: Carbone
°C	: Degré Celsius
CD	: Cellules Dendritiques
Ctrl	: Contrôle
DHA	: Acide Docosahexaénoïque
D-4desaturase	: Delta 4 desaturase
DOPAC	: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EPA	: Acide Eicosapentaénoïque
FAO	: Food and Agriculture Organization
HAP	: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
IFN	: Interferon
Ig	: Immunoglobulines
il	: Inter-leukine
<i>inos</i>	: Inducible nitric oxide synthase
LA	: Linoleic Acid
LC-PUFA	: Long Chain-Poly Unsaturated Fatty Acid
LPS	: Lipopolysaccharides
LT	: Leucotriènes
LymphocyteT	: Lymphocyte de Thymus
LZM	: Lysozyme
MCP-1	: Monocyte Chemo-attractant Protein-1
mg	: Milligramme
µg/mL	: Microgramme par millilitre
µmol/L	: Micromole par Litre
MT	: Million de Tonnes
MUFA	: Mono Unsaturated Fatty Acid
NF-κB	: Nuclear Factor-kappa B
NK	: Natural Killer
OLE	: <i>Olea europea L.</i>
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
PG	: Prostaglandines
PRR	: Pattern Recognition Receptor
PUFA	: Poly Unsaturated Fatty Acid
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
RPS	: Pourcentage de Survie Relatif
TCR	: T Cell Receptor
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor-Alpha

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Séquences d'amorces pour l'amplification de gènes impliqués dans la compétence immunitaire, la réponse pro-inflammatoire, la biosynthèse des acides gras et les processus de métabolisme des éicosanoïdes chez la carpe commune	14
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Origine et devenir des acides gras poly-insaturés (AGPI).....	5
Figure 2 : Origine des acides gras longs poly-insaturés par le processus de désaturation et d'élongation.....	5
Figure 3 : Structure et voie de transport du Lipopolysaccharide (LPS) chez E. coli	7
Figure 4 : Structure du plan de lecture de la lame de Neubauer	12
Figure 5 : Pourcentage de leucocytes viables de rein de la carpe après incubation de 24 heures avec 1, 10 et 100 µg/mL de LPS	16
Figure 6 : Niveau d'expression des gènes pro-inflammatoires il-1, il-6 et tnf-α pour des leucocytes de reins de carpe commune après incubation de 24 heures avec 1, 10 et 100 µg/mL de LPS	16
Figure 7 : Activité de la peroxydase dans le milieu de culture des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS	17
Figure 8 : La production d'oxyde nitrique dans le milieu de culture des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS	18
Figure 9 : Le taux d'immunoglobulines totales dans le milieu de culture des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS	18
Figure 10 : L'expression du gène inos au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	19
Figure 11 : L'expression du gène il-1 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	19
Figure 12 : L'expression du gène il-6 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	20
Figure 13 : L'expression du gène tnf-α au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	20
Figure 14 : L'expression du gène il-8 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	20
Figure 15 : L'expression du gène cxc au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	21
Figure 16 : L'expression du gène nf-kb au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	21
Figure 17 : L'expression du gène il-10 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	21
Figure 18 : L'expression du gène tlr4 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	21
Figure 19 : L'expression du gène pge2 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS.....	22

Figure 20 : L'expression du gène lox-5 au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS..... 22

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Tableau des ingrédients et compositions approximatives des six régimes expérimentaux a
ANNEXE 2 : Conclusions des tests statistiques pour les gènes a

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Problématique et justification de l'étude

Durant ces dernières décennies, le secteur aquacole a connu un essor fulgurant au niveau mondial avec l'intensification de la production du poisson afin de combler les besoins des populations en protéines de qualité. Cependant, ce développement aquacole mondial fait face à de nombreux problèmes. Parmi ces problèmes, autre que l'alimentation, on peut parler des maladies microbiennes qui sont devenues de plus en plus une contrainte à la production aquacole. En effet, en alimentation des poissons, le facteur le plus limitant est la production de farines et huiles de poissons issues de la pêche de capture qui, durant ces dernières années, connaît une diminution graduelle de 92,7 MT en 2011 à 90,9 MT en 2016 (FAO, 2018). Face à cette situation de diminution de production et de demande élevée et croissante en farines et huiles de poisson, beaucoup d'études sont orientées vers les formulations d'aliments où l'on substitue partiellement ou totalement la farine et l'huile de poisson par des ingrédients végétaux. Mais il faut que cette substitution assure non seulement une bonne croissance des poissons, mais aussi renforce les capacités de défense du système immunitaire des poissons. Des données montrent qu'il existe une relation entre certains acides gras longs polyinsaturés (AGLPIs) et l'état immunitaire de l'homme et des animaux. Certains AGLPIs sont impliqués dans plusieurs processus immunitaires notamment la prévention de l'inflammation, de l'infection et de l'allergie (Gottrand, 2007). Les AGLPIs comme DHA et EPA renforcent les fonctions phagocytaires, les activités respiratoires des leucocytes et les activités de lysozyme (LZM), de la superoxyde dismutase (SOD) en piégeant les radicaux libres produits par le métabolisme chez les poissons de mer (Wu et al., 2003; Xu et al., 2016; Zuo et al., 2012).

Chez les organismes aquatiques et notamment les poissons, beaucoup de substances immunostimulantes sont actuellement au stade d'études et les stratégies basées sur leurs utilisations sont rares. Parmi les substances fréquemment testées, on peut citer les combinaisons de levures et de vitamines, le lévamisole, les lipopolysaccharides (LPS), les polysaccharides (β -glucanes), le chitosane et d'autres produits dérivés de plantes et d'animaux (Barman & Mandal, 2011). Les LPS à faibles doses sont plus efficaces, stimulent les cellules du système immunitaire et induisent des réponses spécifiques ; mais par contre, ils sont des puissants inducteurs d'inflammation et peuvent être toxiques à fortes doses (Novoa et al., 2009; Nya & Austin, 2010). Chez la truite arc-en-ciel, des proportions de 19, 38 et 75 mg de LPS pour 1kg de poids vif entraînent des réductions de 5% mortalité induite par *Aeromonas hydrophila* (Nya & Austin, 2010; Siwicki & Cossarini-Dunier, 1990). Des études de (Novoa et al., 2009) ont aussi montré des concentrations létales de LPS 150 μ g/mL pour l'*Escherichia coli* et 50-100 μ g/mL pour le *Pseudomonas aeruginosa* chez les embryons de zebrafish sauvages.

Pour produire des réponses aux infections, le système immunitaire utilise les barrières anatomiques, humorales et cellulaires. Ces réponses peuvent parfois entraîner des processus d'inhibition de certains composants physiologiques ou parfois de l'épuisement de certaines cellules de l'organisme. Dans des cas extrêmes elles peuvent entraîner la mort des cellules telles que les lymphocytes B qui secrètent des anticorps et attaquent à distance les microbes qui se sont réfugiés à l'intérieur de cellules (Ameisen, 2003). Mais, remarquablement, certains AGLPIs peuvent inhiber ces effets inflammatoires. Il a été démontré que, lorsqu'il y'a une attaque bactérienne, les animaux qui ont un bon niveau de réserve de DHA et d'EPA montrent une plus grande capacité de résistance. Selon Li et al. (2005); Tamouza & Labie (2006), les concentrations d'EPA et de DHA à 10 μ mol/L et à 100 μ mol/L ont efficacement diminué l'efficacité de l'activation du facteur nucléaire kappaB (*nf-kb*) induite par les lipopolysaccharides (LPS) et de l'expression de la protéine monocyte chimio attractant-1 (MCP-1), intervenant dans régulation de la migration et de l'infiltration de monocytes et macrophages.

1.2. Objectifs de l'étude

La présente étude s'intéresse surtout à l'influence des AGLPIs (DHA et ARA) ou des huiles végétales sur la réponse immunitaire *in vitro* des leucocytes de la carpe commune (*Cyprinus carpio*) au LPS, plus particulièrement aux acteurs impliqués dans le processus des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Mais de manière spécifique, elle vise à :

- Déterminer la dose optimale de lipopolysaccharides (LPS) qui induit une immunomodulation chez les leucocytes de la carpe commune sans altérations cellulaires ni mortalités cellulaires élevées ;
- Déterminer le temps de réponse immunomodulatrice ;
- Analyser la réponse immunomodulatrice induite par la dose optimale de LPS chez les leucocytes des carpes préalablement nourries avec des régimes contenant différents types d'acides gras (huiles de poisson, huiles végétale, DHA et ARA).

1.3. Quelques paramètres d'élevage de l'espèce

La carpe commune est originaire d'Asie et d'Europe, puis elle a été introduite par la suite dans beaucoup d'autres continents. Ses premières tentatives de domestication remontent de l'Empire Romain (Flajšhans & Hulata, 2007). La production de carpes argentées et de carpes à grosse tête dans les eaux continentales en 2016 a atteint 8,8 millions de tonnes sur une production totale d'espèces qui ne sont pas alimentées (espèces non nourries) de 24,4 millions de tonnes, environ 11% (FAO, 2018). Cet accroissement de production fait de la carpe, l'espèce la plus produite au niveau mondial durant ces dernières années.

La carpe commune est l'une des espèces dont sa biologie est maîtrisée, une espèce d'eau douce qui vit dans les cours d'eau moyens et peu profonds. En milieu intensif tout comme en milieu extensif, elle s'adapte à des situations de confinement. La carpe est une espèce eurytherme supportant des grandes gammes de température et dont celles favorables pour une meilleure croissance sont comprises entre 23 et 30°C avec un pH compris entre 6,5 et 8,5. Elle tolère une concentration en oxygène entre 0,3 à 0,5 mg/L (Flajšhans & Hulata, 2007). La carpe comme toutes les autres espèces de poissons, a une sensibilité aux agents pathogènes et au stress occasionné par le confinement, par des manipulations ou par l'introduction d'espèces sauvages dans le milieu d'élevage. L'action combinée entre les agents pathogènes et le stress favorise souvent le développement des maladies. Il a été démontré que le stress diminue la résistance du poisson aux agents pathogènes bactériens et fongiques (Maule et al., 1989; Pickering & Pottinger, 1989; Wiik et al., 1989). En effet, les producteurs, pour combattre ces maladies, utilisent des solutions thérapeutiques à base d'antibiotiques non contrôlés et néfastes pour l'environnement. Cette situation occasionne parfois le développement du phénomène d'antibiorésistance. Pour cela, en termes d'alternative aux antibiotiques, il s'avère nécessaire de tester et d'analyser la contribution des acides gras longs poly-insaturés dans le mécanisme de défense du système immunitaire de la carpe.

1.4. Aperçu du système immunitaire chez les poissons

Comme chez les humains, le système immunitaire des poissons est formé de cellules et de composants humoraux (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014). Son objectif est de protéger le corps contre les éléments étrangers, des menaces de parasites, bactéries et virus. Chez les poissons, ce système est conditionné en particulier par l'environnement et aussi par leur condition ectotherme (Makrinos & Bowden, 2016; Tort et al., 2003). Il est divisé en système immunitaire inné et système immunitaire adaptative (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014; Rauta et al., 2012; Tort et al., 2003; Uribe et al., 2011).

1.4.1. Immunité innée ou naturelle

Beaucoup d'organismes pluricellulaires, à plus de 98%, sont capables de se défendre grâce à un système immunitaire inné (Tort et al., 2003). Ce système est constitué à partir des modules constitutifs (cutanéomuqueuse) et des modules induits permettant l'activation de la réaction inflammatoire à l'aide de cytokines. Lorsque l'agent pathogène ou le corps étranger franchit la barrière de l'organisme, une réponse immédiate non spécifique est produite par le système immunitaire inné (Rauta et al., 2012).

Le système immunitaire inné comprend un ensemble d'acteurs et de médiateurs solubles qui s'associent pour donner une réponse lors de l'attaque par un agent extérieur. Parmi les acteurs se trouvent les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et les basophiles), les phagocytes mononucléés (monocytes, macrophages, cellules dendritiques), les mastocytes et les cellules lymphoïdes (André et al., 2008; Yang et al., 2009). Les médiateurs solubles de l'immunité innée comprennent le système du complément, les cytokines pro-inflammatoires (*tnf*, *il-1*, *il-6*, *il-12*, *il-15* et interférons pour *ifn- α* , *β* et *γ*) (Charles et al., 2010), les cytokines chimio-attractantes (*il-8*), les cytokines régulatrices de l'inflammation (*il-10* ou le *tgf β* pour transforming growth factor beta) (Bacchetta et al., 2005; Tedgui & Mallat, 2004). Des enzymes et peptides antimicrobiens et autres médiateurs solubles (lipidiques de l'inflammation) font aussi partie de ce système de médiation de l'immunité inné (Carcelain et al., 2018).

Les cellules qui sont impliquées dans la première ligne de réponse innée sont les phagocytes (monocytes, macrophages, granulocytes, cellules dendritiques et mastocytes) ainsi que les cellules de Natural Killer (NK) (Anderson et al., 2008). Ces cellules une fois activées identifient les pathogènes au moyen de récepteurs appelés **Pattern Recognition Receptor (PRR)**. Ces récepteurs cellulaires eux-mêmes sont capables de reconnaître certains motifs moléculaires baptisés **Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP)**, partagés par de nombreux micro-organismes (Janeway, 1989). En fonction des récepteurs activés, les cellules dendritiques modulent différemment l'activité des lymphocytes T tandis que les cellules NK produisent des immuno-régulateurs (cytokines et chimokines) ainsi que la lyse des cellules cibles infectées ou anormales (cellules tumorales) (Bouachour, 2014).

1.4.2. Immunité adaptative ou acquise

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative ou acquise produit une réponse spécifique de l'antigène. Cette réponse est produite de manière spécifique par le fait que les cellules de l'immunité adaptative notamment les lymphocytes T fonctionnels portent un seul type de récepteur (TCR pour « T Cell Receptor ») acquis dans l'organe appelé thymus capable de reconnaître spécifiquement un déterminant antigénique (Mathieu et al., 2009). La réponse adaptative est généralement caractérisée par une mémoire immunologique et apparaît secondairement mais rapidement après une exposition répétée au même agent pathogène et demeure essentielle pour une immunité durable au niveau de son organisme (Secombes & Wang, 2012). Elle est produite suite à l'information très vite des acteurs de l'immunité innée aux acteurs cellulaires (lymphocytes) de l'immunité adaptative. Cette coordination est assurée par les cellules dendritiques (CD) qui sont des cellules fondamentales présentant l'antigène pour réguler la réponse immunitaire (Alli et al., 2004).

Au niveau de cette deuxième phase de réponse de l'organisme participe un ensemble de cellules notamment les cellules lymphoïdes et surtout les lymphocytes B qui sont responsables de la réponse immunitaire humorale en produisant des anticorps et les lymphocytes T responsables, responsables des réponses cellulaires (auxiliaire, cytotoxique ou régulatrice) (Carcelain et al., 2018). À chaque type de lymphocyte s'associe une immunité spécifique qui peut être soit à médiation humorale, soit à médiation cellulaire. L'immunité à médiation humorale est liée aux

lymphocytes B et aux cellules qui en dérivent directement, les plasmocytes. Les plasmocytes eux-mêmes produisent des immunoglobulines ou anticorps qui, appartenant à une famille de protéines globulaires, se divisent en plusieurs classes (IgG, IgM, IgA, IgD et IgE). Quant à l'immunité à médiation cellulaire, elle est liée aux cellules lymphocytes T. Ces deux types d'immunité spécifique interagissent ensemble dans la production des anticorps contre la plupart des antigènes (Galazka, 1993). Ces cellules s'impliquent au fur et à mesure jusqu'à ce que la phase non-spécifique est remplacée par la phase d'entretien qui est une phase spécifique menant à l'élimination du pathogène envahisseur tout en garantissant le moins de blessures possibles à l'hôte (Rebl & Goldammer, 2018).

Des travaux affirment une recombinaison somatique et aléatoire de l'ADN des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes, appelée recombinaison V(D)J (variable, diversité et jonction) (Roth, 2014). Selon Bengtén et al. (2000), au niveau de tous les gènes d'immunoglobuline chez les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les amphibiens se trouve la « configuration translocon », dans laquelle il existe des gènes variables (V) de nombreuses familles en amont, de nombreuses différences (D) (pour les chaînes lourdes) et de jonctions (J). Alors, l'activité des gènes RAG (recombination activating genes) a été démontrée dans les réarrangements des gènes des TCR (T-Cell Receptor) et des immunoglobulines. Les protéines RAG (RAG1 et RAG2) peuvent exécuter les transpositions *in vitro* et joueraient *in vivo* un rôle déterminant dans l'évolution spécifique de l'antigène du système immunitaire adaptatif (Bleyzac et al., 2005).

1.5. Interactions entre les acides gras essentiels (DHA/EPA/ARA) et les fonctions immunitaires chez les poissons

1.5.1. Importance des AGLPIs dans le processus immunitaire chez les poissons

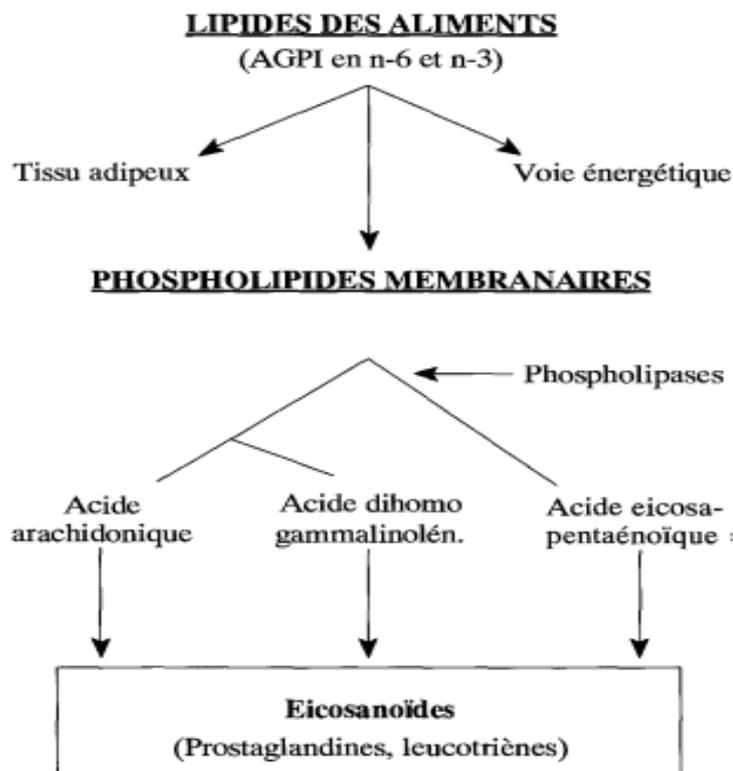
L'apport nutritionnel en lipides et notamment en acides gras est l'un des facteurs les plus importants dans la composition des aliments pour les poissons. Des études montrent l'existence d'une certaine interaction entre les fonctions du système immunitaire, notamment la modulation de l'inflammation et les AGLPIs (Delarue, 2001; Ghisolfi, 1993). Les AGLPIs participent non seulement à la constitution de la double couche phospholipidique des membranes cellulaires mais aussi, à leur cohésion physico-chimique et l'adhésion cellulaire (Colette & Monnier, 2011) ainsi que la production de leucotriènes (Calder et al., 1992; Kinsella et al., 1990; Rowley et al., 1995).

Les acides gras poly-insaturés (AGPI) qui résultent des apports de l'alimentation ou du métabolisme des deux acides gras essentiels, acides linoléique et α -linoléique, sont véhiculés vers les tissus par le courant sanguin (fig. 1). Ces acides sont plus fréquemment utilisés dans le processus de constitution des lipides structuraux cellulaires que dans la voie énergétique (Ghisolfi, 1993). Quant aux acides gras, ils résultent des processus d'élongation et de désaturation mis en place par l'organisme en faisant intervenir toute une cascade enzymatique comme D-4-, D-5-, D-6-désaturase et aussi des élongases (fig. 2) (Youinou et al., 1993). Ce sont des molécules peu abondantes sous forme libre dans les matières grasses fraîches. Ils sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique, hydrophobe et peuvent être saturés s'ils contiennent des doubles liaisons ou non saturés s'ils n'en contiennent pas (Colette & Monnier, 2011).

Les AGLPIs participent activement à la synthèse de toute une famille de molécules à caractère hormonal (œstrogènes, testostérone et cortisol) et jouent un rôle de messenger contribuant à la régulation de la multiplication cellulaire, la perméabilité membranaire et interviennent dans diverses autres fonctions physiologiques et immunitaires. Ils interviennent aussi dans les

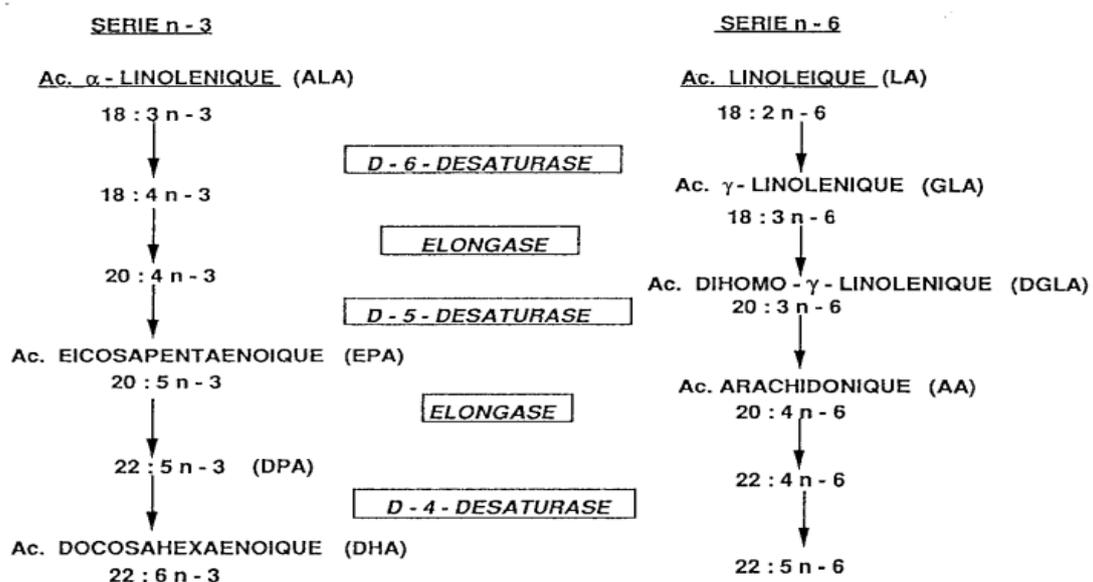
régulations métaboliques comme la synthèse enzymatique, la production de prostaglandines et le fonctionnement des récepteurs hormonaux (Hanna & Hafez, 2018).

Figure 1 : Origine et devenir des acides gras poly-insaturés (AGPI)



Source : Lipides, acides gras polyinsaturés et fonctions immunitaires (Ghisolfi, 1993).

Figure 2 : Origine des acides gras longs poly-insaturés par le processus de désaturation et d'élongation



Source : Lipides et immunité (Youinou et al., 1993).

Par ce processus d'élongation et de désaturation produisent les AGLPIs qui sont importants pour la défense de l'organisme contre les attaques pathogéniques. Ces AGLPIs favorisent la fluidité membranaire (Calder et al., 1992; Spector & Burns, 1987; Yang et al., 2011) et dans une certaine mesure influencent aussi l'accessibilité des hormones protéiques (Spector & Yorek, 1985). Ils sont capables d'inhiber un certain nombre d'aspects de l'inflammation, particulièrement l'ARA, l'EPA et le DHA en donnant lieu à des résolvines et des protectines anti-inflammatoires (Calder, 2012). Ces modifications apportées par les AGLPIs à la membrane peuvent entraîner un certain nombre de fonctions cellulaires comme le transport induit, la phagocytose, l'endocytose, l'exocytose, la cytotoxicité chimio thérapeutique, la production de prostaglandines et la croissance cellulaire (Hatala et al., 1994; Spector & Yorek, 1985).

D'autres effets peuvent être aussi engendrés suite à la modification des propriétés de la membrane cellulaire et les interactions intermembranaires. Selon Gorjão et al. (2009); Weldon et al. (2007), les enzymes immunitaires ou protéines telles que le lysozyme et d'autres compléments seraient influencées par le niveau de DHA et EPA contenu dans l'aliment. Par conséquent, l'utilisation des AGLPIs, tels que l'ARA, l'EPA et le DHA, est bénéfique et impact positivement la santé des poissons et aussi l'homme (Olivia-Teles, 2012). Ces acides, avec une supplémentation suffisante dans les régimes alimentaires, peuvent participer à la mise en place d'un bon statut immunitaire et une bonne résistance aux maladies des poissons. Des rapports de DHA / EPA supérieur à 3,1 ou une inclusion de DHA alimentaire dans des régimes inertes allant jusqu'à 3,17% peut augmenter la survie finale et la résistance au stress des larves de *Seriola rivoliana* (Mesa-Rodriguez et al., 2018). Ainsi, une alimentation contenant des niveaux faibles d'AGLPIs peut avoir des répercussions sur la santé et même sur la morphologie. Selon Ribeiro et al. (2015), une carence en AGLPIs dans les régimes à base d'huiles d'origine végétale pourrait entraîner la déformation du tube digestif. Cette carence peut aussi provoquer des problèmes morphologiques intestinales (Torrecillas et al., 2017) et de réduction ou d'inhibition de certains paramètres immunitaires (Conde-Sieira et al., 2018).

1.5.2. Particularités chez la carpe

Comme pour toute autre espèce de poissons, chez la carpe, la synthèse des acides gras se fait essentiellement dans le foie à l'aide du complexe synthétase. La carpe dispose de deux types de synthèse, celui des acides gras internes (synthèse de novo) et aussi la synthèse à partir des acides externes apportés à travers de l'alimentation. Les principaux AG néosynthétisés par les poissons sont le palmitate (16 :0), le stéarate (18 :0) et le myristate (14 :0) (Guillaume et al., 1999) et peuvent être variables selon l'espèce, l'habitat et les régimes alimentaires (Tocher et al. 2001). Ainsi, chez la truite, le palmitate domine à 57% suivi du myristate à 29% tandis que chez la carpe, ces deux AG sont synthétisés en proportion quasi-similaires (41 et 37% respectivement). Chez certaines espèces marines, ce sont le 16 :0 et le 18 :0 qui sont majoritaires (Guillaume et al., 1999). En grande partie, la composition en acide gras reflète celle apportée dans les ingrédients et des huiles utilisés. Des aliments ont été testés en incorporant diverses huiles comme source de DHA et d'EPA chez la carpe pour évaluer la capacité de défense du système immunitaire. Zemheri-Navruz et al. (2019) ont trouvé, pour l'utilisation d'un régime contenant 1 g/kg d'OLE (extrait alimentaire de feuille d'olive) sur une période de 60 jours, une amélioration de la défense immunitaire contre *Edwardsiella tarda* chez les juvéniles de la carpe commune. Selon ces auteurs, l'utilisation de l'OLE peut réguler positivement l'expression des gènes tels que : *il-1 β* , *il-8* et *tnf- α* au niveau la rate, la tête, le rein et le foie. Également, contre l'*Aeromonas hydrophila*, l'augmentation des niveaux de LA pour (linoleic acid) dans l'alimentation entraîne une augmentation jusqu'à 1,7% du taux de survie chez les juvéniles de cape (Jiang et al., 2010).

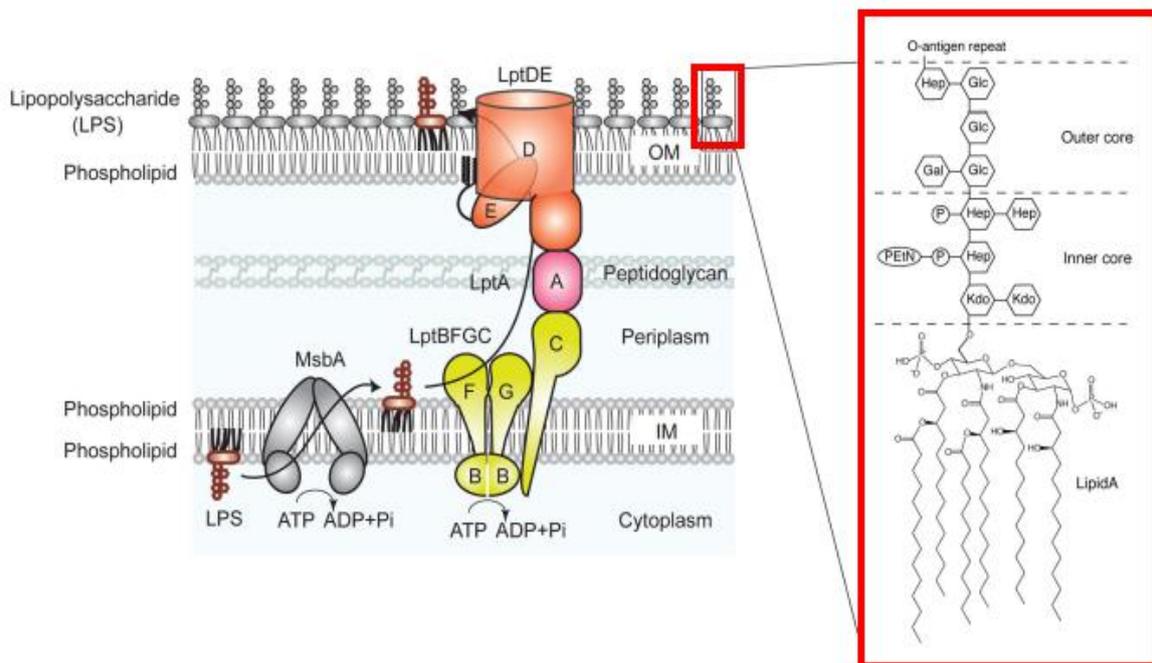
1.6. Lipopolysaccharides

1.6.1. Structure et voies d'administration

Les lipopolysaccharides (LPS), également appelés lipoglycane ou endotoxine, sont de grosses molécules constituées d'un lipide et d'un polysaccharide de la membrane externe des bactéries Gram négatives (fig. 3). Ils ont pour structure chimique trois entités synthétisées séparément : le lipide A, le noyau et l'antigène O qui seront regroupées par la suite. Entre la partie proximale, médiane et distale des LPS, se trouvent respectivement, le lipide A enchâssé dans la membrane externe, le noyau et l'antigène O libre dans le milieu extérieur (Erridge et al., 2002; Rodriguez-Loureiro et al., 2018; Szalo et al., 2006; Zhang et al., 2019). Le lipide A est constitué de quatre (4) chaînes hydrocarbonées et deux chaînes phosphorylées, pourtant, le polysaccharide est composé de huit à douze unités de sucre formant de phosphate et de groupes carboxyles. Deux catégories de LPS sont à distinguer suivant qu'ils possèdent ou non un antigène O. Les LPS lisses sont ceux possédant des antigènes O spécifiques à la souche et le LPS rugueux sont ceux ne possédant pas d'antigènes O (Rodriguez-Loureiro et al., 2018).

Bien qu'encore en phase expérimentale, les LPS sont utilisés pour stimuler le système immunitaire. Ils peuvent être administrés chez les vertébrés y compris les poissons de différentes manières. Chez les mammifères, l'administration intraveineuse des lipopolysaccharides (LPS) induit une toxicité sévère. La dose maximale tolérée de perfusion intraveineuse pour l'administration de LPS chez l'homme ne serait que de 1 à 4 ng/kg de poids corporel. Cependant, l'administration orale d'une forte dose de LPS n'a causée aucune toxicité ni inflammation systémique chez d'autres mammifères, oiseaux ou poissons (Inagawa et al., 2011), c'est une des voies d'administration sûres (Inagawa et al., 2014). D'autres voies d'administration sont aussi utilisées chez les poissons, notamment intrapéritonéale et immersion.

Figure 3 : Structure et voie de transport du Lipopolysaccharide (LPS) chez *E. coli*



Source : *Transport de lipopolysaccharides et assemblage à l'extérieur de la membrane* (Okuda et al., 2017).

1.6.2. Utilisation des lipopolysaccharides comme immunostimulant chez les poissons

Malgré les différents effets qui ont été démontrés, l'utilisation des traitements avec immunostimulants chez les poissons n'en est encore qu'au stade expérimental. Dans la plupart des cas, il faudra beaucoup d'essais complémentaires avec des précisions de doses et périodes de traitement les plus efficaces avant de parvenir à une application généralisée en fermes aquacoles (Nicolas et al., 2007). En expérimentation, les essais des immunostimulants et particulièrement les LPS ont été réalisés chez plusieurs espèces. Chez la truite arc-en-ciel, (Nikokelainen et al., 2004) ont travaillé sur une souche de *Lactobacillus rhamnosus* qui semble avoir des effets efficaces pour prévenir la furonculose. Les LPS ont été testés aussi sur le poisson zèbre afin d'induire une inflammation létale des neutrophiles pour contrôler l'action inhibitrice de la phyllyrine de *Forsythia suspensa* (Yang et al., 2017).

Des injections intrapéritonéales de LPS à 3 mg kg⁻¹ de poids du poisson ont été faites sur des perches jaunes (*Perca flavescens*) pour tester la présence de changements neurochimiques potentiellement associés à des changements dans le cortisol plasmatique de l'espèce (Haukenes et al., 2011). Ces injections, selon les auteurs, ont entraîné une augmentation des quantités d'oxyde nitrique perfusées dans les neurones et des concentrations élevées de DOPAC-dopamine (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid). Des essais de vaccination intrapéritonéales et par immersion dans un bain avec un antigène de LPS de *Yersinia ruckeri* ont été menés aussi sur la truite arc-en-ciel afin d'évaluer les taux de mortalité et la valeur relative du pourcentage de survie (RPS). Ces essais ont montré des effets positifs du LPS de *Yersinia ruckeri* comme étant un composé immunogène protecteur pour la truite arc-en-ciel (Ispir & Dorucu, 2014). Des micro-injections de LPS de 0,5 mg/mL et de 100 ng/mL ont été effectuées chez les larves de poisson zèbre et ont provoqué une augmentation de la production des cytokines *tnf- α* , *il-1 b* et *il-6* (Jakhar et al., 2018). Également, l'injection du LPS à une dose de 100 μ L a entraîné, au niveau de l'intestin des juvéniles de *Hucho taimen*, des diminutions de l'activité des enzymes antioxydantes et par contre a augmenté les niveaux d'expression des cytokines inflammatoires (Ren et al., 2019). Chez la daurade royale (*Sparus aurata*), des stimulations du système immunitaire ont été réalisées avec 1 mg de LPS d'*Aeromonas salmonica* et de *Vibrio anguillarum* par kg de poisson, pour lesquelles des augmentations significatives de prostaglandines, de lactate, de *tnf- α* , d'*il-1b* et d'*il-6* ont été constatées après de 6 h pour enfin diminuées progressivement jusqu'à 24 h (Boltaña et al., 2014). L'influence du bêta-1,3 / 1,6-glucane sur l'immunité innée et la protection contre *Aeromonas hydrophila* a été aussi testée chez la tanche (*Tinca tinca(L)*) nourri à des doses de 1 et 2 g kg⁻¹ de pellets pendant 1 mois et réduit la mortalité de 5-35% (Siwicki et al., 2010).

Chez la carpe, des doses de 20, 10 et 5 mg / kg / jour de LPS ont été administrés par voie orale et ont provoqué respectivement une augmentation des ARNm de l'interleukine *il-1 β* et du *tnf- α* , mais par contre, ont réduit l'expression des ARNm de l'*il-6* principalement dans le rein après 30 et 60 jours (Kadowaki et al., 2013). D'autres études se portant sur les actions des processus inflammatoires sur la muqueuse et les profils d'expression des gènes *il-17* ont été réalisées sur des carpes infectées par *A. hydrophila* où la plupart des gènes de l'*il-17* ont été régulés positivement 4 heures après l'infection avec 0,1 ml d'*A. hydrophila* dans les branchies, puis ont progressivement diminués (Dong et al., 2018).

1.7. Interaction entre les acides gras essentiels et la réponse immunitaire aux LPS

Ces derniers temps, la nature des régimes alimentaires émerge comme un nouveau moyen de prévention face aux maladies, aux pathogènes et autres expositions de l'organisme. Plusieurs études ont été menées dans cette ligne pour déterminer les participations éventuelles des acides

gras essentiels et particulièrement ceux polyinsaturés à longues chaînes dans les réponses immunitaires des poissons. Vraisemblablement, beaucoup de ces études montrent la possibilité de modification des propriétés physicochimiques des membranes cellulaires par ces acides gras polyinsaturés à longue chaîne de série n-3 (AGPI-LC, n-3). Ils sont présents naturellement dans les aliments d'origine marine comme les poissons gras, et pourraient aussi renforcer la capacité de défense de l'organisme contre les effets des toxiques chimiques. Des travaux sur l'action protectrice des acides gras n-3 sur l'apoptose induite par le benzo [a] pyrène, ont été réalisés par (Dendelé et al., 2014), où ils ont trouvé des effets marqués du DHA et de l'EPA vis-à-vis des conséquences biologiques de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en modifiant la teneur en acides gras des différentes fractions sous-membranaires. Selon (Tian et al., 2014), l'inclusion appropriée d'ARA (0,30%) dans l'alimentation a efficacement amélioré l'état de santé en diminuant le taux de transaminases, des concentrations de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des juvéniles de carpe roseau (*Ctenopharyngodon idella*).

Le processus de participation des AGLPI dans la réponse immunitaire aux LPS s'enclenche dès qu'ils sont libérés des membranes. Ces acides gras longs polyinsaturés de séries n-3 et n-6 entrent dans des voies de métabolisation grâce à l'action d'enzymes spécifiques, les cyclooxygénases et les lipoxygénases, et donnent naissance à des dérivés lipidiques appelés eicosanoïdes (prostanoides et leucotriènes). Ces eicosanoïdes sont considérés comme des hormones et jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques : régulation de la pression artérielle, vasoconstriction/vasodilatation, coagulation, inflammation mais aussi neuroprotection (Lavialle & Layé, 2010). Cependant, les médiateurs lipidiques qui sont considérés comme les principaux acteurs dans la réponse inflammatoire sont les résolvines et les protectines biosynthétisées à partir de l'EPA et du DHA (Serhan et al., 2008).

Chez les jeunes tilapias du Nil, des niveaux importants d'AGLPI du type n-3 et d'AG du type n-9 ont un effet immunomodulateur et améliorent le statut immunitaire et la résistance au *Streptococcus agalactiae* (Ferreira et al., 2015). Tandis que, suite à des teneurs en acide linoléique relativement élevées, l'activité des lysozymes, la teneur en immunoglobuline et la production d'anticorps chez le poisson-chat darkbarbel (*Pelteobagrus vachelli*) peuvent augmenter face à l'*Aeromonas hydrophilla* (Li et al., 2015). Des rapports alimentaires modérés DHA / EPA de 1,53 à 2,08 ont amélioré chez le bar japonais (*Dicentrarchus labrax*) non seulement la performance de croissance mais également certaines réponses immunitaires innées et la tolérance au stress (Xu et al., 2016). Ces impacts des AGLPIs sur le système immunitaire peuvent être constatés dans différentes activités notamment celle des macrophages qui peut être augmentée chez la truite (Ashton et al., 1994), du lysozyme, de la catalase et de la superoxyde dismutase dans le sérum chez les Juvéniles de pompano doré (*Trachinotus ovatus*) (M. Zhang et al., 2019), pendant que chez la daurade l'activité de la voie du complément peut diminuer suite à une déficience en AGLPI (Montero et al., 2005).

Les effets comparatifs des différents rapports d'acide α -linoléique (α -ALA) et d'acide linoléique (LA) chez la carpe ont été étudiés et montrent des capacités immunomodulatrices. Zeng et al. (2017) ont constaté une augmentation des activités du lysozyme, du complément et des taux d'ARNm des peptides antimicrobiens pour un rapport d'ALA/LA de 1,03 chez les juvéniles de la carpe roseau (*Ctenopharyngodon idella*). Pendant que, Tian et al. (2019) chez cette même espèce, après avoir expérimenté des régimes alimentaires additionnés de l'acide arachidonique (ARA) à différents pourcentages, ont constaté qu'un régime additionné de 0,30% peut réduire l'inflammation chez la carpe. Selon Nguyen et al. (2019), l'utilisation de l'huile végétale dans les régimes peut être bénéfique chez les poissons et particulièrement chez la carpe commune en favorisant un statut immunitaire et une résistance aux maladies similaires aux régimes fabriqués à base d'huile de poisson. Mais toutefois, les informations concernant la substitution totale de l'huile de poisson par les huiles végétales ou AGLPIs et sur les

interactions de ces AGLPIs avec le système immunitaire restent jusqu'à présent limitées chez la carpe commune.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Protocole expérimental

L'expérimentation a été menée en deux phases sur des juvéniles ($100,4 \pm 4,5$ g) de la carpe commune provenant d'une pisciculture belge (Rue de l'Île 78, 5580 Lessive, Rochefort, Belgique). Ils ont été acclimatés dans le labo pendant deux semaines au cours desquelles elles ont été nourries avec un mélange de tous les régimes expérimentaux.

La première phase concernait la détermination d'une dose optimale immunostimulante de LPS chez les leucocytes de la carpe et a été réalisée à partir d'un test de viabilité cellulaire. En ce qui concerne cette phase, 6 carpes en bonne santé ont été utilisées, anesthésiées puis disséquées pour prélever leurs leucocytes de rein. Après la récolte et la culture de ces leucocytes provenant du rein de chaque poisson, ils ont été incubés à 25° dans des plaques de 6 puits pendant 4 et dans les plaques de 96 puits pendant 24 heures. L'essai de viabilité a été réalisé à l'aide du kit MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent, Sigma, USA) après incubation de 24h du réactif avec les cellules suivant la méthode du fabricant. L'absorbance a été enregistrée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits. Le taux de viabilité cellulaire a été déterminé en divisant en valeur absolue la mesure des échantillons par la mesure du contrôle multipliée par 100.

Concernant la deuxième phase de l'expérience, 270 juvéniles de carpe ont été répartis dans 18 bassins et nourris pendant 6 semaines avec 6 régimes alimentaires fabriqués au laboratoire. Ces six régimes expérimentaux ont été fabriqués à partir de trois sources lipidiques : huile de foie de morue (CLO) constituait le régime témoin, huile de lin (LO), huile de sésame (SO), un mélange d'huile de lin et d'huile de sésame (SLO ; v / v, 1/1), huile de lin supplémentée par 1% d'ARA et huile de sésame supplémentée par 2,3% de DHA. La concentration d'ARA pur dans le produit de (Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd) utilisé était de 10%, ce qui valait une quantité de 1g d'ARA pour 10g de produit par kilo d'aliment. Pour le DHA, 30 gélules de 0,2 g ont été utilisés soit une quantité totale de 6g de DHA par kilo d'aliment. Ces huiles végétales ont été sélectionnées en fonction de leurs teneurs respectives en LC-PUFA (tableau annexe 1). Dans chaque régime, des concentrés de protéines de poisson solubles (SFPC), du gluten, de la caséine et de la gélatine ont été utilisés comme sources de protéines. Les régimes expérimentaux étaient iso-azotés (protéines brutes = 30,6%) et isolipidiques (10%). La formulation et la composition approximative des régimes expérimentaux sont présentées dans le tableau en annexe. Les ingrédients ont été bien mélangés et humidifiés avec de l'eau fraîche (25%) pour une granulation atteignant une taille de 3 mm. Les pellets ont ensuite été séchés à l'air et stockés à 4 ° C.

Les carpes ont été nourries jusqu'à satiété apparente deux fois par jour (10h et 16h) pendant 4 semaines avec ces 6 régimes alimentaires. Au cours de l'essai d'alimentation, les conditions d'élevage ont été maintenues à une température de 19 à 22°C, un taux d'oxygène dissous moyen de 7,8 mg/L, un pH de 7.5 et une photopériode naturelle (lumière : sombre 12 : 12). Les nitrites et NH₃ / NH₄ ont été mesurés une fois par semaine avec une moyenne de 0,004 et 0,063 mg / L, respectivement. Le système de bassins a été siphonné quotidiennement pour évacuer les excréments des poissons.

Pour déterminer la réponse immunomodulatrice, 36 individus dont 6 par régime à raison de deux par bassin ont été prélevés parmi les ces 270 juvéniles de carpes. Les leucocytes issus des reins de chacune de ces carpes ont été incubés à 25° dans des plaques de 12 puits pendant 4 et 24 heures dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. À la récolte après chaque moment, les

cellules et les surnageants cellulaires ont été gardés dans des eppendorfs de à -80°. Les cellules ont été utilisées par la suite pour extraire les ARNs pour enfin réaliser le qPCR comme décrit ci-dessous alors que les surnageants ont été utilisés pour analyser les paramètres immunitaires tels que peroxydase, Ig totales et NO.

2.2. Méthodes

2.2.1. Phase expérimentale *in vitro*

D'abord, avant de réaliser les prélèvements, les solutions nécessaires (tampon + antibiotiques, tampon + nutriments) ont été préparées. Les reins prélevés ont été mis dans des flacons de 15 mL avec de la solution de milieu de culture (RPMI + antibiotiques) sur de la glace. Les reins sont lavés 2 fois avec du milieu de culture dans le couvercle de la boîte de pétri et broyés à l'aide des pistons autoclavés et des tamis "corning centistar".

2.2.2. Préparation et culture des leucocytes

Plusieurs étapes ont été suivies pour l'obtention et la conservation des leucocytes blancs après avoir broyé les reins. Il s'agit entre autres :

- Du transfert du liquide obtenu dans d'autres flacons de 15 mL à l'aide d'une pipette ;
- De la centrifugation du liquide à 1000 G et 25°C pendant 7 mn tout en jetant après le surnageant pour pouvoir homogénéiser ;
- D'ajouter 3 mL de solution Red Blood Cell Buffer (RBC) pour détruire les cellules rouges pendant 5mn ;
- D'ajouter 3 mL de RPMI + antibiotique (Penicillin-Streptomycin, sigma) dans les flacons pour neutraliser la réaction puis centrifuger et enlever le surnageant ;
- De rincer deux fois ces cellules isolées avec 3mL de milieu de culture (RPMI + antibiotique), centrifuger après chaque rinçage et enlever le surnageant à chaque fois ;
- D'ajouter 2 mL de solution de milieu de culture ;
- De compter les cellules afin de faire la dilution pour enfin incuber les cellules avec du milieu de culture, des antibiotiques et des nutriments ;
- De garder les cellules enfin à -80°C pour en faire l'extraction d'ARN puis ADNc et le qPCR.

2.2.3. Détermination de la densité cellulaire

Après avoir dilué 1/100 de la solution cellulaire obtenue avec du RPMI+anti, le bleu Trypan à 0.4% a été ajouté selon un ratio 50 µL pour 1 mL de solution de culture dans un eppendorf. Ceci a permis de compter les cellules à partir de la chambre de Neubauer (fig. 4), des lames, des lamelles et d'un microscope. Le calcul du nombre de cellules par µL de solution a été fait avec la formule suivante :

$$K \text{ ou } B = \frac{\text{nombre de cellules comptées} \times \text{concentration solution prélevée} \times 10^6}{\text{nombre de dilution}}$$

L'oxyde nitrique (NO) est un bio-méiateur synthétisé par les NO synthases (NOS) à partir de la réaction catalytique incluant la guanidine et l'arginine. Il joue un rôle important dans la défense immunitaire et confère aux macrophages une activité cytotatique ou cytotoxique contre les microbes, les lymphocytes et les cellules tumorales (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998). La concentration de l'oxyde nitrite a été mesurée avec 100 µl de surnageant cellulaire dans les plaques à 96 puits incubées avec un volume égal au réactif de Griess (sulfanilamide à 1%, dichlorhydrate de naphthyléthylène diamine à 0,1% et acide phosphorique à 2,5%) à température ambiante. Cette incubation a été réalisée pendant 10 minutes dans une microplaque, ce qui est largement utilisé comme standard dans différents modèles (Corbett et al., 2015; Jung et al., 2013). L'absorbance à 540 nm a été déterminée en utilisant un lecteur de microplaques Dynatech (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA). Le nitrite de sodium (NaNO₂) préparé parallèlement aux échantillons a été utilisé comme courbe standard (Corbett et al., 2018; García-Barragán et al., 2018).

2.3.3. Le dosage de la concentration d'immunoglobulines totales (Ig totales)

La concentration d'immunoglobulines totales a été déterminée en faisant la différence de teneur en protéines avant et après une incubation avec du PEG (polyéthylène glycol) à 12%. En effet, la teneur totale en protéines dans le milieu de culture a été déterminée par la méthode micro Lowry modifiée de Peterson et de la solution de Bradford (Sigma Diagnostics P 5656, Sigma, St Louis, MO, USA). Une courbe d'étalonnage a été déterminée en utilisant le sérum albumine bovine comme standard (10 mg mL⁻¹). Dans des plaques de 96 puits, 50 µL d'échantillon dilué 5 fois et 50 µl de solution PEG ont été ajoutés pour ensuite incubé au vortex à 250 rpm à la température ambiante pendant 2 heures sous agitation constante. Après incubation, les solutions ont été centrifugées à 7 000 g pendant 10 min. La teneur en protéines dans le surnageant a été déterminée en faisant la lecture au spectromètre. La teneur totale en immunoglobulines a été déterminée en soustrayant la teneur en protéines du surnageant de la teneur totale en protéines du plasma polyéthylène glycol comme décrit par Anderson & Siwicki, (1995).

2.3.4. Analyse du mode d'expression des gènes

L'ARN total du rein a été extrait à l'aide de 1 ml de réactif Trizol (Extract-all®, Eurobio, Courtaboeuf, France) et dont la qualité a été vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) et d'une électrophorèse sur un gel à 1,5% d'agarose. Pour éviter la contamination par l'ADN, les échantillons d'ARN ont été traités à l'aide d'un kit RTS DNase™ (MO BIO Laboratories, Carlsbad, Californie, USA). Suivi de cette étape, l'utilisation d'un kit de synthèse d'ADNc iScript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) pour faire la transcription inverse en ADNc de 1 µg d'ARN. L'ADN complémentaire (ADNc) a été dilué avec de l'eau ultrapure (eau distillée Invitrogen™ UltraPure™ sans DNase, RNo, scientifique de Thermo Fisher) et utilisé pour une qPCR en temps réel afin de déterminer les niveaux d'expression des gènes.

Le logiciel Primer3 a été utilisé pour concevoir et vérifier les amorces spécifiques servant à déterminer l'expression de *tlr-4* (toll like receptor 4), *pge2* (gènes de la prostaglandine E2 synthase), *lox5* (Arachidonate 5-lypoxigénase), *il8* (interleukine 8), *cxc* (Chemokine), *il-1* (Interleukine 1), *tnf-α* (Tumeur necrosis factor alpha), *il-6* (interleukine 6), *nf-kb* (Nuclear factor-kappa B), *inos* (Inducible nitric oxide synthase), *il-10* (Interleukine 10). La qualité de ces amorces a été aussi vérifiée sur le logiciel Amplifx par rapport aux séquences de la carpe commune publiées sur Genbank (tableau 1). Toutefois, avant l'analyse, l'efficacité de chaque gène a été confirmée.

Les gènes de référence utilisés lors de l'expériences sont les gène 40s (protéine ribosomale 40S) et 18s (ARN ribosomal 18S) (Nguyen et al., 2019). L'amplification de l'ADNc a été réalisée en

triplicat en utilisant un kit iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Les cycles thermiques et la détection de fluorescence ont été réalisés à l'aide d'un système de PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) suivant ces conditions : 10 min de dénaturation initiale à 95 ° C, 40 cycles à 95 ° C pour 30 s et 60 ° C pendant 30 s. Pour l'analyse, une courbe standard a été produite à partir d'un pool d'ADNc de tous les échantillons et incluse pour calculer l'efficacité de la PCR et normaliser les niveaux de transcription. Les niveaux relatifs d'ARN ont été quantifiés pour chaque gène par densitométrie qui a été réalisée en mesurant les valeurs de luminescence photostimulée à l'aide du logiciel StepOne Software v2.1. Les ratios produits du gène candidat / gène de référence ont été calculés par la suite pour chaque gène et utilisés pour évaluer les différences de niveaux d'expression entre les groupes expérimentaux comme décrit Nguyen et al. (2019).

Tableau 1 : : Séquences d'amorces pour l'amplification de gènes impliqués dans la compétence immunitaire, la réponse pro-inflammatoire, la biosynthèse des acides gras et les processus de métabolisme des éicosanoïdes chez la carpe commune

Genes	Function	Genbank No.	Primer sequence	PCR efficiency (%)
<i>Immune gene</i>				
<i>il8</i>	Interleukin 8	EU011243	Fw: GTCGCTGCATTGAAACTGAGAG Rv: TTAACCCAGGGTGCAGTAGG	101.1
<i>cxc</i>	Chemokine	AJ550164	Fw: TTGAAACAGAGAGCCAACGCATT Rv: GCTGGTGTGTTTGTGGCAATGA	104
<i>nkef</i>	Natural killer enhancing factor	AB048789	Fw: TGTGATGCCAGATGGACAGT Rv: CCTGTTTCCGAGGTGTGTT	94.2
<i>lys</i>	Lysozyme activity, C type	AB027305	Fw: GTGTCTGATGTGGCTGTGCT Rv: GAACGCACTCTGTGGGTCTT	103
<i>b/c2</i>	Classical and alternative complement pathways	AB047361	Fw: CAGGCGAATGGGAAATGGAG Rv: GCGTAACATTGTGGCTCTGTTC	106.1
<i>Fatty acid biosynthesis</i>				
<i>elovl5</i>	Elongase very long delta 5	KF924199	Fw: CACCAGATCACCTTCCTGCAT Rv: AGCTGCCCTTGAGTGATGTA	105.4
<i>fads</i>	FA desaturase delta 6	AF309557	Fw: CCTCGGACACTATGCTGGAGA Rv: CCCGATTAACAGCGGCTTCA	90.5
<i>Eicosanoid metabolism process</i>				
<i>pla</i>	Secreted phospholipase	KF793834	Fw: CTGCATGACAAGTGATGAGCAA Rv: CTGGTGCTCAAATCCATCAGGT	98.9
<i>pge2</i>	Prostaglandin E2 synthase	XM_019098948	Fw: AAGGAATTCATGGGAGGCGATCA Rv: CACACGTCCGGTACCAGTTCTTCA	96.7
<i>lox5</i>	Lipoxygenase 5	XM_019066935	Fw: CCCTCCAGCCCAAATTTGAC Rv: ATCCACGCCTGAAGTTCTGA	99.5
<i>Housekeeping gene</i>				
<i>18S</i>	18S ribosomal RNA	FJ710826 (Zhang et al., 2016)	Fw: GAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC Rv: AATCTGTCAATCCTTTCCGTGTCC	99.8
<i>40S</i>	40S ribosomal protein	AB012087 (Zhang et al., 2016)	Fw: CCCAAGGCCAACAGGGAAA Rv: AGGGCGTAACCTTCGTAGAT	97.8

2.4. Traitement des données et Analyses Statistiques

Les données ont été traitées grâce au Microsoft Excel 2016 et analysées à l'aide du logiciel statistique R version 3.5.1. La normalité et l'homogénéité des valeurs moyennes de toutes les variables ont été vérifiées par des tests de Shapiro et de Bartlett. Les moyennes ont été par la suite soumises à une analyse de variance à deux et à 3 facteurs (ANOVA2 et 3) ou un test de Kruskal-Wallis suivant le cas. L'ANOVA2 a été effectuée pour comparer les variances entre LPS et type de cellule de régime comme facteurs et à 3 facteurs pour comparer les variances entre LPS, type de cellule de régime et le temps (4 et 24 heures). Les différences entre les moyennes ont été considérées comme significatives à une valeur de $p < 0,05$.

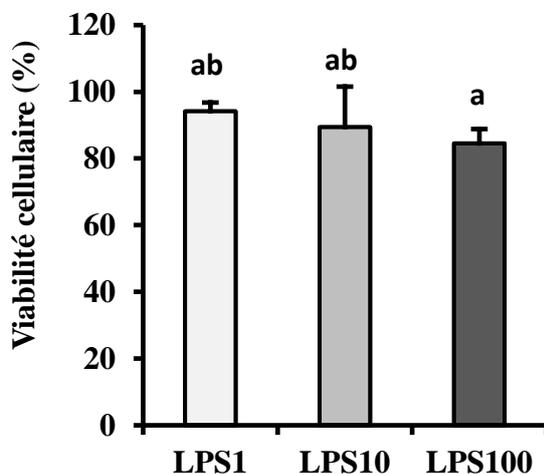
III. RÉSULTATS

3.1. Détermination de la dose optimale de lipopolysaccharides (LPS)

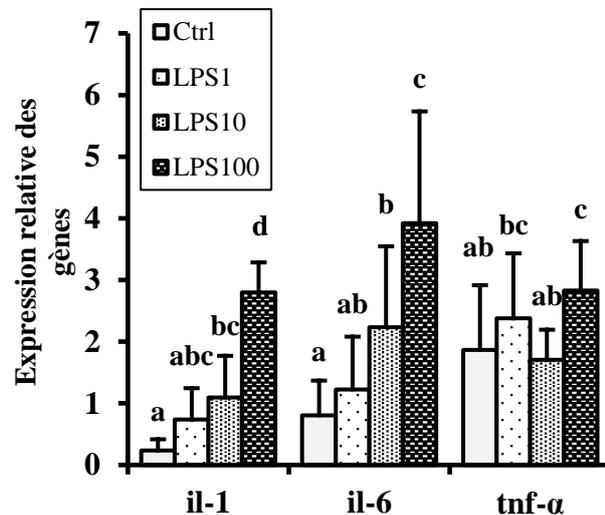
La dose optimale de lipopolysaccharides (LPS) d'*Escherichia coli* qui induit une immunomodulation sans altérations ni mortalité cellulaire élevée a été déterminée à partir d'un challenge test sur les leucocytes des reins de la carpe commune. Les taux de viabilité cellulaire présentés pour la plus longue période d'incubation (24 h) ne montrent pas de différence significative pour les différentes concentrations testées de LPS (1µg/mL, 10 µg/mL et 100 µg/mL), néanmoins une tendance à la diminution est observée chez les leucocytes soumis à la dose de 100 µg/mL (fig. 5).

Par contre, en ce qui concerne la réponse en termes d'expression des gènes, une augmentation significative ($p < 0,05$) du niveau d'expression des gènes pro-inflammatoires *il-1* et *il-6* est observée entre les groupes de leucocytes du groupe contrôle et ceux soumis à des concentrations de 10 µg/mL et de 100 µg/mL de LPS, avec des valeurs les plus élevées pour le groupe soumis à 100 µg/mL (fig. 6). Pour le gène *tnf-α*, une différence significative ($p < 0,05$) est seulement observée entre le groupe soumis à une dose de 100 µg/mL et le groupe contrôle. Les groupes de leucocytes soumis à la dose de 1 µg/mL ne présentent aucune différence significative pour les trois gènes.

La dose de LPS de 10 µg/mL a été adoptée et utilisée parce qu'elle induit un effet immunomodulateur relativement plus élevé par rapport à la dose de 1 µg/mL et plus faible par rapport à 100 µg/mL pour un pourcentage de viabilité cellulaire non différent statistiquement par rapport à ces concentrations.



(Fig. 5)



(Fig. 6)

Figure 5 : Pourcentage de leucocytes viables de rein de la carpe après incubation de 24 heures avec 1, 10 et 100 µg/mL de LPS

Figure 6 : Niveau d'expression des gènes pro-inflammatoires *il-1*, *il-6* et *tnf-α* pour des leucocytes de reins de carpe commune après incubation de 24 heures avec 1, 10 et 100 µg/mL de LPS

3.2. Influence de la qualité des AGLPIs sur la réponse immunitaire *in vitro* chez les leucocytes de la carpe commune

Pour analyser la réponse immunitaire humorale, l'activité de la peroxydase, la production d'oxyde nitrique (NO) ainsi que la concentration d'immunoglobulines totales (Ig totales) ont été mesurées. Elles ont été mesurées successivement après 4h et 24h chez les leucocytes des reins des carpes communes nourries avec les différents régimes pendant 4 semaines et incubés avec du LPS.

3.2.1. Activité de la peroxydase

En ce qui concerne l'activité de la peroxydase, les résultats montrent qu'il n'existe aucune différence entre les groupes de leucocytes des carpes après 4h et 24h (fig. 7). Néanmoins, malgré qu'aucune différence ne soit constatée entre les groupes de leucocytes après 4h d'incubation au LPS, seuls les groupes de leucocytes des carpes nourries avec le régime SLO et SOD affichent une tendance à la hausse par rapport au groupe témoin. Après 24h, les groupes de leucocytes des carpes nourries avec les régimes CLO, SLO et SOD ont aussi affiché une tendance croissante par rapport au groupe témoin mais n'est pas significative.

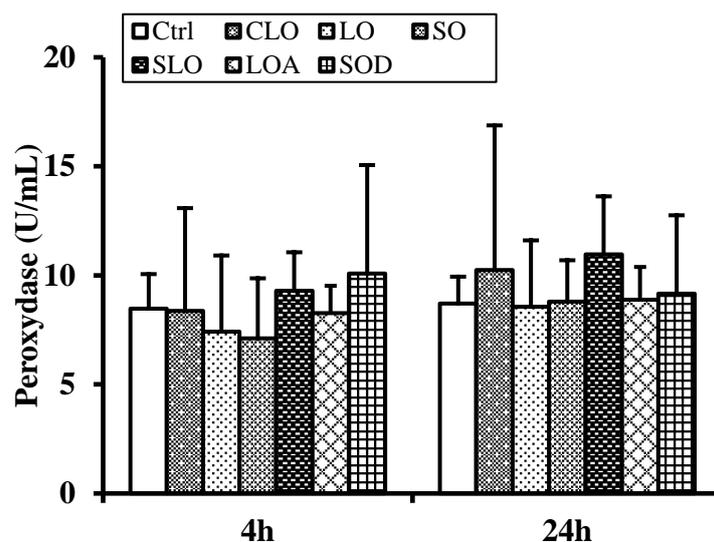


Figure 7 : Activité de la peroxydase dans le milieu de culture des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

3.2.2. La production d'oxyde nitrique

De même que l'activité de la peroxydase, la production d'oxyde nitrique dans le surnageant cellulaire ne présente pas de différence entre les groupes des leucocytes (fig. 8). Une production de NO comparable après 4 et 24 heures entre les groupes de leucocytes incubés au LPS 10 µg/mL et le groupe contrôle. Néanmoins, une tendance à la hausse pour le groupe SLO après 24 heures est constatée. Cette tendance est due à une grande variabilité entre unités expérimentales.

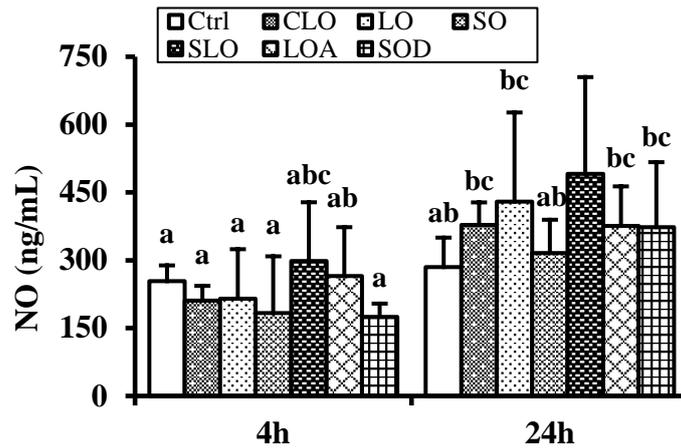


Figure 8 : La production d'oxyde nitrique dans le milieu de culture des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

3.2.3. Le taux d'immunoglobulines totales

En ce qui concerne la concentration d'immunoglobulines totales, elle n'est pas significativement activée pour tous les types de leucocytes après 4h (fig. 9). Néanmoins, une tendance à la hausse est observée pour les groupes LO et SOD, et les valeurs pour ces groupes étaient significativement ($p < 0,05$) plus élevées comparativement à celles des groupes SLO et LOA. Après 24h, il y a tendance à l'augmentation pour tous les types de leucocytes, et de manière significative pour LO ($p < 0,05$).

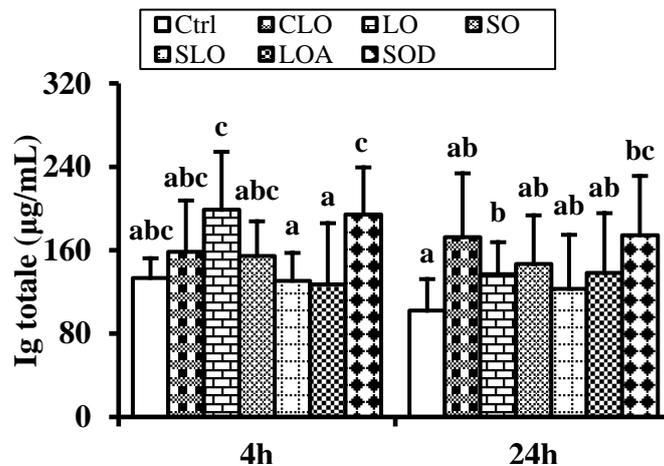


Figure 9 : Le taux d'immunoglobulines totales dans le milieu de culture des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

3.3. Niveau d'expression des gènes immunitaires

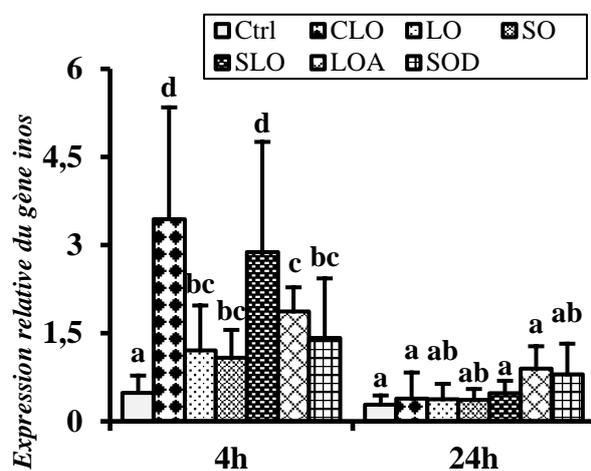
L'expression des gènes pro-inflammatoires (*il-8*, *cxc*, *il-1*, *tnf-a*, *il-6*, *nf-kb* et *inos*) a été testée au niveau des leucocytes des reins des carpes nourries avec les différents régimes (fig. 10 à 16). En ce qui concerne l'expression de ces gènes, les valeurs des groupes incubés au LPS à 4 heures pour l'ensemble des gènes pro-inflammatoires sont très significativement ($p < 0,001$) plus élevées par rapport à celles des groupes incubés pendant 24 heures. Une augmentation du niveau d'expression du gène *inos* est observée après 4h d'incubation au LPS quel que soit le type de leucocytes. Cette augmentation du niveau d'expression *inos* est significativement ($p < 0,01$) plus faible pour les leucocytes des groupes LO, SO, LOA et SOD comparativement à celle des autres groupes CLO et SLO (fig. 10). Concernant l'augmentation du niveau

d'expression du gène *il-1*, les valeurs des groupes LO, SO sont significativement ($p < 0.01$) plus faibles comparativement à celles des autres groupes CLO, SLO, LOA et SOD (fig. 11). L'augmentation du niveau d'expression pour les gènes (*il-6* et *tnf- α*) observée est significativement plus faible pour les groupes de leucocytes respectifs LO, SO et LOA par rapport au groupe CLO pour le gène *il-6* (fig. 12) et LO par rapport à tous les autres groupes pour le gène *tnf- α* (fig. 13).

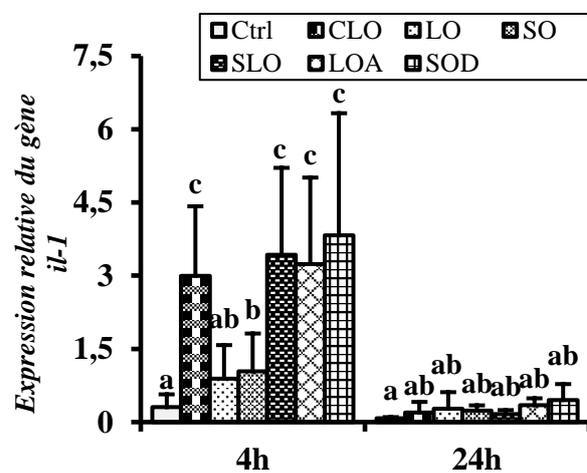
Pour le gène *il-8*, une stimulation est observée quel que soit le type de leucocytes. Cette surexpression est significativement ($p < 0.01$) plus faible pour les leucocytes des groupes LO, SO et LOA comparativement aux autres groupes (fig. 14). Par contre, pour les gènes *cxc* et *nf- κ b*, aucune différence n'est constatée entre les différents groupes. Néanmoins, une tendance décroissante est constatée respectivement pour les leucocytes des groupes LO, SLO, LOA et SOD comparativement aux autres groupes pour *cxc* (fig. 15) et des groupes CLO, LO, SLO et LOA comparativement aux autres groupes pour *nf- κ b* (fig. 16).

L'expression du gène anti-inflammatoire *il-10* est très significativement ($p < 0.001$) plus élevée après 4 heures d'incubation au LPS quel que soit le type de leucocytes par rapport à ceux de 24 heures. Pour ce gène *il-10*, les valeurs sont très significativement ($p < 0.001$) plus élevées pour tous les types de leucocytes comparativement à celles du groupe Ctrl après 4h d'incubation, excepté pour le groupe LOA (figure 17). Ce qui indique une stimulation de l'expression de ce gène anti-inflammatoire *il-10* pour tous les types de leucocytes, sauf pour le groupe LOA.

En ce qui concerne l'expression du gène *tlr4* (fig. 18), aucune différence significative n'est observée entre groupes de leucocytes des carpes nourries avec les différents régimes quelle que soit la durée d'incubation. Également en termes d'expression des gènes impliqués dans le processus de métabolisme des eicosanoïdes chez la carpe commune, aucune différence significative entre groupes de leucocytes n'est observée pour les gènes *pge* (fig. 19) et *lox5* (fig. 20) quelle que soit la durée d'incubation.



(Fig. 10)



(Fig. 11)

Figure 10 : L'expression du gène *inos* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 μ g/mL de LPS

Figure 11 : L'expression du gène *il-1* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 μ g/mL de LPS

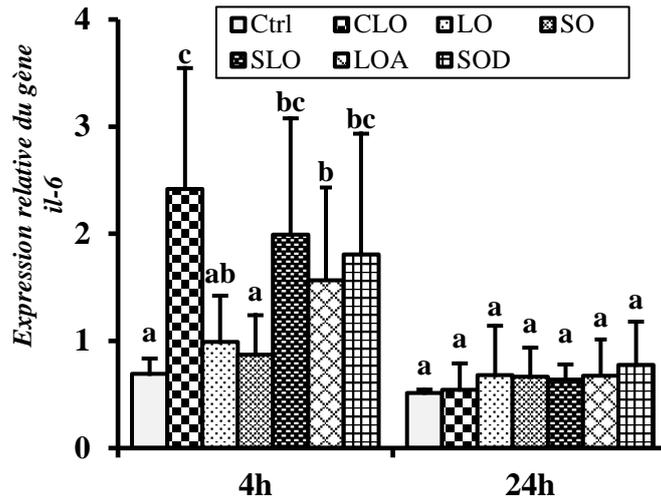
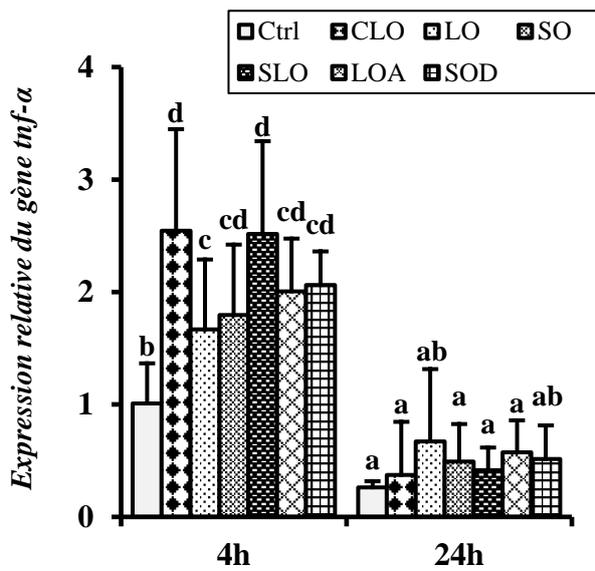
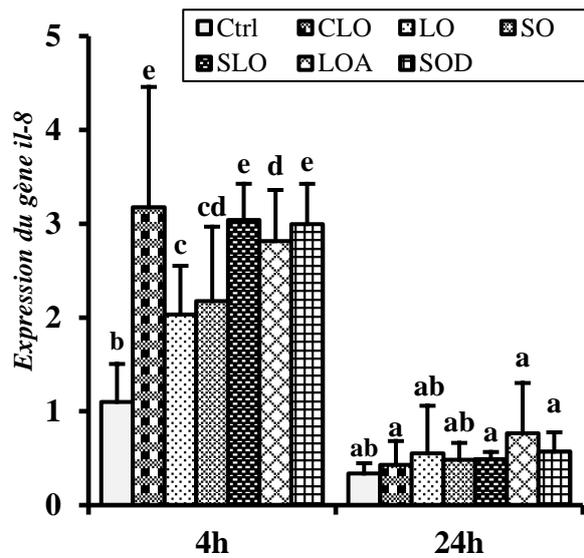


Figure 12 : L'expression du gène *il-6* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS



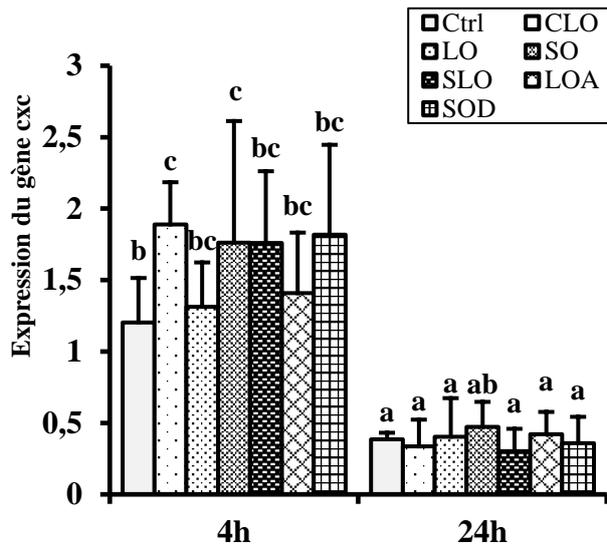
(Fig. 13)



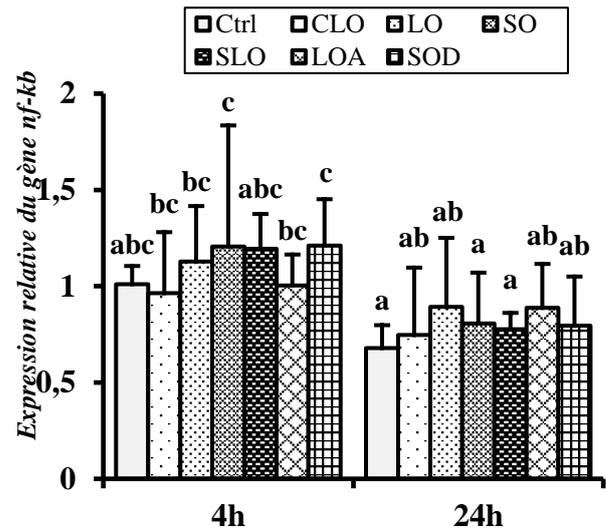
(Fig. 14)

Figure 13 : L'expression du gène *tnf-a* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

Figure 14 : L'expression du gène *il-8* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS



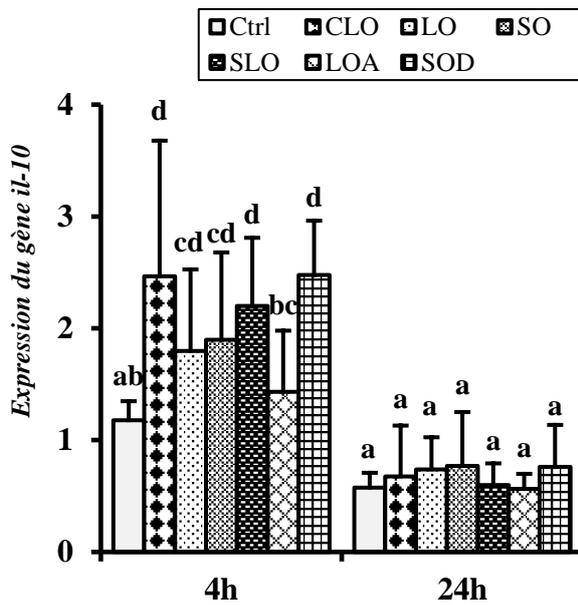
(Fig. 15)



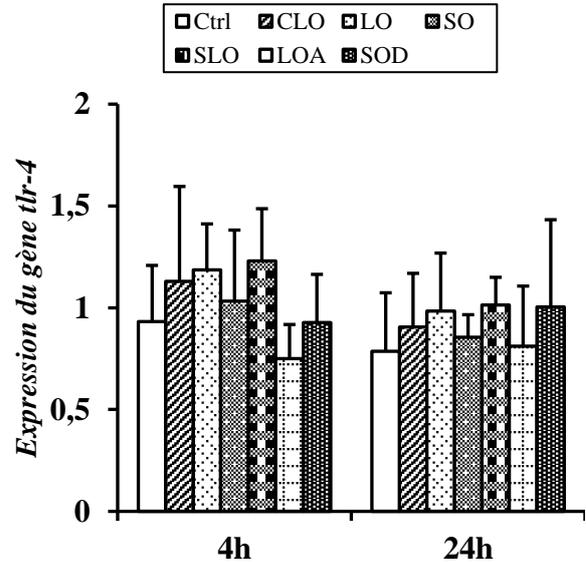
(Fig. 16)

Figure 15 : L'expression du gène *cxc* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

Figure 16 : L'expression du gène *nf-kb* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS



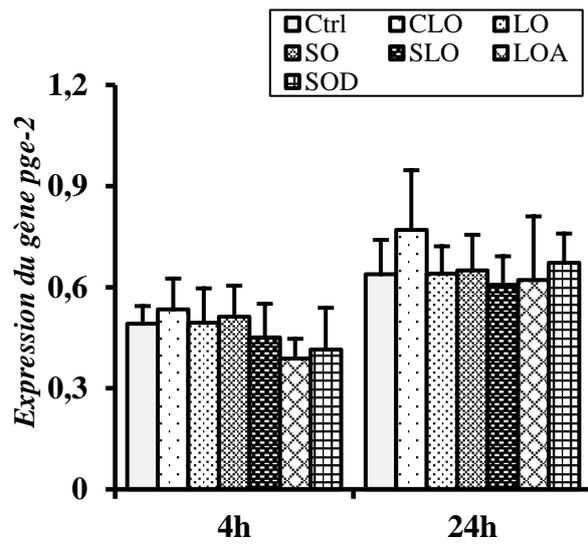
(17)



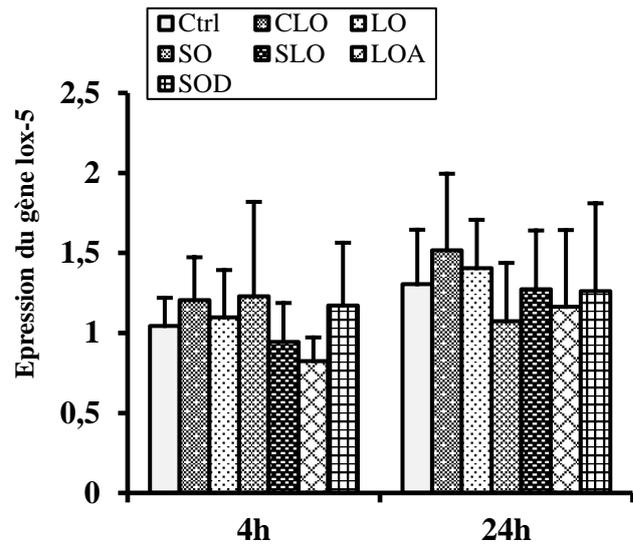
(18)

Figure 17 : L'expression du gène *il-10* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

Figure 18 : L'expression du gène *tlr-4* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS



(Fig. 19)



(Fig. 20)

Figure 19 : L'expression du gène *pge2* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

Figure 20 : L'expression du gène *lox-5* au niveau des différents groupes de leucocytes de reins de la carpe commune après incubation de 4 et 24 heures avec 10 µg/mL de LPS

IV. DISCUSSION

4.1. Dose immunomodulatrice de LPS chez la carpe commune

Les résultats du test préliminaire de ce travail démontrent que le lipopolysaccharide provenant d'une souche bactérienne d'*E. coli* est capable, à une dose de 10 µg/mL, de stimuler le système immunitaire chez la carpe commune. *In vitro*, l'expression des gènes pro-inflammatoires (*il-1*, *il-6*) a été significativement influencée par cette dose de LPS pour un taux de viabilité cellulaire de 89%. Chez la carpe, les tests *in vitro* sur des leucocytes sont rares mais la stimulation du système immunitaire par le LPS a déjà été montrée *in vivo* chez plusieurs espèces de poisson. Des doses de LPS variant entre 5 µg/kg/j et 75 mg/kg ont été testées *in vivo* sur les espèces *Cyprinus carpio* (Kadowaki et al., 2013) et *Oncorhynchus mykiss Walbaum* (Nya & Austin, 2010). *In vivo*, les doses de LPS testées sur les espèces *Cyprinus carpio* (Siwicki & Cossarini-Dunier, 1990) et *Danio rerio* (Jakhar et al., 2018; Novoa et al., 2009) varient aussi entre 0.05 µg/mL et 200 µg/mL. Ceci indique que l'efficacité de la dose de LPS peut varier considérablement entre les espèces de poissons.

4.2. Effet des huiles végétales sur la réponse immunomodulatrice des leucocytes au LPS

En guise de réponse immunitaire, après 4 et 24 heures, aucune différence n'a été constatée pour la production d'oxyde nitrique, mais une tendance à la hausse a été observée après 24h pour les leucocytes issus des poissons nourris avec l'huile SLO. Cette tendance des leucocytes du régime SLO traduirait une plus grande production de NO qui pourrait occasionner une inhibition de certaines fonctions pro-inflammatoires de ce groupe de leucocytes. Cette tendance pourrait s'expliquer par une concurrence entre les deux voies métaboliques pour la synthèse des AGLPIs provenant de ces sources lipidiques différentes. L'oxyde nitrique (NO), synthétisé par l'oxyde nitrique synthase (NOS), est parmi les plus petites molécules bioactives connues qui peuvent être produites par diverses cellules, et capables d'inhiber la polarisation des macrophages M1 et peuvent tuer les micro-organismes (Xue et al., 2018). Cependant, cette molécule, à des doses élevées, peut jouer un rôle majeur comme molécule effectrice cytotoxique et de programmer l'apoptose des cellules dans les macrophages activés et inhibe leur action bactéricide (Sennequier & Vadon-Le Goff, 1998). La NO synthase inductible (*iNOS*) activée dans les macrophages M1 (Mege & Capo, 2010) peut entraîner la mort de l'hôte en produisant un médiateur inflammatoire, le NO (Akira et al., 2001). Dans cette étude, puisque pas d'augmentation de l'oxyde nitrique à 4 et 24 heures, ceci confirme le manque de toxicité de la dose de LPS utilisée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Kumar & Joy, 2018) en utilisant *in vitro* des doses de LPS de 10 et 20 µg/mL chez le poisson-chat *Heteropneustes fossilis* en ayant pas trouvé d'augmentation de NO chez les macrophages du rein.

Après 4 et 24 heures d'incubation, le taux d'immunoglobulines totales était comparable pour tous les groupes avec une tendance à la hausse particulièrement pour SOD et LO après 4 heures et pour LO après 24 heures. Ces résultats mettent en évidence la stimulation du système immunitaire par la dose de LPS en produisant une quantité supérieure d'immunoglobulines par rapport au groupe contrôle. D'autres auteurs chez d'autres espèces ont aussi trouvé des résultats similaires. Bich Hang et al. (2016) ont trouvé *in vivo* une augmentation de la quantité totale d'immunoglobulines après une administration orale de 0,01% de LPS d'*Escherichia coli* pendant 2 à 4 semaines chez le poisson-chats rayé (*Pangasianodon hypophthalmus*). Chez les larves de la daurade (*Sparus aurata*), une quantité d'immunoglobulines totales significativement plus élevée par rapport aux témoins a été aussi trouvée (Hanif et al., 2005).

L'expression de plusieurs gènes immunitaires a été étudiée. Le gène *tlr4* reconnaissant le lipopolysaccharide de la paroi des bactéries à Gram-négatif (Huet et al., 2004) n'avait pas été exprimé différemment entre les différents groupes de leucocytes et aussi entre les différents moments (4 et 24 heures). Néanmoins, malgré que les groupes ne se différencient pas significativement, une tendance croissante était observée pour les valeurs des groupes incubés pendant 4 heures par rapport à celles des groupes incubés pendant 24 heures sauf le groupe SO. Ce qui traduirait l'activation des leucocytes par le LPS malgré une stimulation insuffisante de l'expression de ce gène *tlr4*. Des études antérieures menées par Berczi et al. (1966) ont révélé que les vertébrés inférieurs, notamment les poissons et les amphibiens, étaient résistants aux effets toxiques du LPS. De plus, il a été démontré que des concentrations extrêmement élevées de LPS sont nécessaires pour activer des leucocytes isolés *in vitro* provenant de plusieurs espèces de téléostéens éloignées phylogénétiquement (Sepulcre et al., 2007; Zou et al., 2007). Les résultats trouvés dans le cadre de cette étude sont en accord avec ceux obtenus par ces auteurs et permettent d'affirmer que l'engagement du récepteur par son ligand pour l'expression du gène *tlr4* peut dépendre de la dose et de l'espèce. Cette dernière affirmation est soutenue par des résultats de (Sepulcre et al., 2009) qui ont démontré par l'expression du gène *tlr4*, l'activation des leucocytes de la daurade par le LPS d'*E. coli* mais par contre l'absence d'orthologue *tlr4* chez les tétraodons.

Pour tous les gènes pro-inflammatoires testés (*il-1*, *il-6*, *tnf- α* , *il-8*, *cxc*, *nf-kb* et *inos*) et anti-inflammatoire (*il-10*), une augmentation est observée après 4h d'incubation au LPS quel que soit le type de leucocytes pour revenir à un niveau basal après 24 heures. Li et al. (2019) ont aussi trouvé une forte expression des gènes *il-1 β* et *il-8* après 3 heures d'injection des *Clarias gariepinus* avec du LPS d'*A. veronii* pour ensuite baissée à un niveau basal après 24 et 48 heures. En ce qui concerne le gène *inos*, son expression présentait une augmentation après 4h d'incubation au LPS quel que soit le type de leucocytes mais qui est plus faible pour les leucocytes des groupes LO, SO, LOA et SOD par rapport aux autres groupes. Cette expression plus faible du gène *inos* pour ces groupes représente l'atténuation des processus pro-inflammatoire par les huiles végétales pures et celles supplémentées en ARA ou DHA. Ces résultats indiqueraient que la carpe, à partir des précurseurs dans les huiles végétales pures, sont capables de synthétiser des AGLPIs en quantité suffisante par rapport aux huiles supplémentées en DHA et ARA, mais des analyses des profils en AGLPIs sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Plus particulièrement, la réduction de l'expression des gènes pro-inflammatoires testés a été généralement observée en ce qui concerne les huiles végétales pures (LO et SO). Pour le gène *il-1*, les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les leucocytes des groupes LO et SO comparativement à ceux des autres groupes, ce qui met en évidence l'impact d'atténuation des huiles pures de lin et de sésame. Par contre, pour les gènes *il-8* et *il-6*, les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les leucocytes des groupes LO, SO et LOA par rapport au groupe CLO. Pour ces derniers gènes pro-inflammatoires, à part des groupes LO et SO, l'impact d'atténuation a été aussi constaté pour LOA. Le gène *tnf- α* était faiblement exprimé pour les leucocytes du groupe LO par rapport aux autres groupes. Cette plus grande capacité d'atténuation des effets de LPS du groupe LO pourrait s'expliquer par le fait que l'huile de lin est riche en acide linoléique (Bayrak et al., 2010) comparativement aux autres huiles végétales comme l'huile de sésame. Il a été montré que des juvéniles de carpes nourries avec l'huile de lin sont capables de synthétiser une quantité d'EPA et de DHA plus élevée que l'huile de tournesol (Nguyen et al., 2019). Ces acides (EPA et DHA) peuvent réduire la teneur en acide arachidonique dans les membranes des cellules inflammatoires et sont donc disponibles pour la production d'eicosanoïdes (Calder, 2006). Ainsi, la disponibilité de ces AGLPIs entraîne une diminution de la production d'eicosanoïdes issus d'acide arachidonique. Ces résultats sont en accord avec

ceux obtenu par Allam-Ndoul et al. (2016) où ils ont observé une modulation des niveaux d'expression de gènes inflammatoires comme *il1b*, *mcp1*, *tnfa*, *ptgs2*, *alox5* et *nos2* pour l'utilisation d'une concentration de 50 µM d'EPA sur une lignée cellulaire THP-1 humaine.

Le niveau d'expression du gène anti-inflammatoire (*il-10*) était plus activé pour tous les types de leucocytes après 4h d'incubation comparativement au groupe Ctrl, excepté le groupe LOA. Ce qui indique qu'aucune huile n'a interféré avec les processus anti-inflammatoires de défense contre les effets du LPS. Ce qui explique que l'utilisation dans les régimes alimentaires de l'huile pure de lin et de sésame et aussi l'huile de lin supplémentée avec le DHA n'altère pas la capacité immunomodulatrice des leucocytes par le LPS.

Les eicosanoïdes sont des dérivés d'oxydations d'acides gras polyinsaturés responsables de la signalisation des molécules comprenant des prostaglandines (PG), des leucotriènes (LT) et lipoxines connues pour influencer un large éventail des processus immunitaires (Knight & Rowley, 1995). L'expression des gènes (*pge2* et *lox-5*) impliqués dans le métabolisme des eicosanoïdes ne montre aucune différence significative entre les valeurs pour les groupes incubés après 4 et 24 heures. Ces résultats montrent que la substitution de l'huile foie de morue (CLO) dans les régimes par les huiles végétales n'a pas affecté significativement le taux d'expression de ces gènes. Des résultats qui sont similaires à ceux trouvés par (Ganga et al., 2005) qui ont démontré chez la daurade royale (*Sparus aurata*), que la substitution de l'huile de poisson par des huiles végétales n'avait pas affecté le taux plasmique de *pge2*, mais de manière significative diminue le taux plasmatique de *pge3*, une prostaglandine dérivée de l'EPA.

4.3. Effet de la supplémentation en ARA ou DHA sur la réponse immunomodulatrice des leucocytes au LPS

L'effet d'apports exogènes de DHA (2.3%, SOD) ou d'ARA (1%, LOA) contenus dans les régimes dans l'huile de sésame ou de lin a été analysé dans cette étude. Au niveau des résultats, les valeurs des leucocytes du groupe LOA affichent toujours une tendance décroissante mais non significative par rapport à celles du groupe SOD après les incubations 4 heures pour les gènes pro-inflammatoires testés. Ceci traduirait une capacité d'atténuation comparable du mélange d'huile de lin additionnée de 1% d'ARA par rapport au mélange d'huile de sésame additionnée de 2.3% de DHA après 4 heures d'incubation au LPS à 10 µg/mL. Par contre, pour l'expression du gène anti-inflammatoire *il-10*, les valeurs des leucocytes du groupe LOA sont significativement plus faibles que celles des leucocytes du groupe SOD. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'acide arachidonique exogène a été déjà disponible dans le régime, la formation d'EPA et du DHA pourrait être occasionnellement inhibée de façon concurrente. Ainsi, dans le cas d'une supplémentation d'AGLPIs, le DHA stimulerait plus les processus anti-inflammatoires et donc induirait une plus grande action immuno-protectrice que l'ARA. Mais, une étude de Wall et al. (2010), a révélé que les eicosanoïdes dérivés d'AGPI n-6 (ARA) ont des fonctions pro-inflammatoires et immuno-actives.

En termes d'expression des gènes pro-inflammatoires testés après 4 heures d'incubation au LPS, les valeurs du groupe LO sont inférieures à celles du groupe LOA pour les gènes *il-1* et *il-8*, et celles du groupe SO sont inférieures à celles du groupe SOD pour les gènes *il-1*, *il-6* et *il-8*. Pour le gène anti-inflammatoire (*il-10*), son expression est supérieure pour le régime LO par rapport au régime LOA. Cette situation prouve une capacité d'atténuation supérieure pour les huiles pures de lin et de sésame par rapport à celles supplémentées, peut-être à cause d'une éventuelle interférence de l'ARA exogène dans les voies de biosynthèses in vivo de l'EPA et DHA.

V. CONCLUSION

Les résultats de cette étude permettent de suggérer que l'utilisation de certaines huiles végétales peut être bénéfique pour le processus de réponse anti-inflammatoire du système immunitaire. Les résultats ont montré qu'à partir des huiles végétales, la réponse pro-inflammatoire peut être réduite sans affecter les processus anti-inflammatoires du système immunitaire des leucocytes à une exposition au LPS bactérien. De plus, lorsqu'elles sont utilisées supplémentées, elles n'altèrent pas la capacité pro-inflammatoire mais la supplémentation de l'huile de lin en ARA pourrait réduire certaines fonctions anti-inflammatoires alors que l'addition de DHA à l'huile de sésame n'aurait pas d'effets négatifs sur ces processus. Ainsi, la substitution de l'huile de poisson à 100% soit par l'huile de lin, soit l'huile de sésame ou par un mélange l'huile de sésame et DHA dans les régimes donne de meilleurs résultats d'immunomodulation chez les leucocytes de la carpe. En revanche, l'utilisation du régime formulé à partir de l'huile de lin supplémentée par l'AGLPI exogène ARA donne des résultats moins satisfaisant par rapport aux autres régimes. Pour cela, d'autres études d'approfondissement se portant sur la détermination du pourcentage d'ARA à apporter en supplément des différentes huiles végétales pauvres en acides précurseurs d'ARA, sont suggérées.

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8), 675–680.
- Allam-Ndoul, B., Guénard, F., Barbier, O., & Vohl, M. C. (2016). Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *Lipids in Health and Disease*, 15(69), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0241-4>
- Alli, R., Savithri, B., Das, S., Varalakshmi, C., Rangaraj, N., & Khar, A. (2004). Involvement of NKR-P2/NKG2D in DC-mediated killing of tumor targets: Indicative of a common, innate, target-recognition paradigm? *European Journal of Immunology*, 34, 1119–1126. <https://doi.org/10.1002/eji.200324793>
- Ameisen, J.-C. (2003). La mort et la sculpture du vivant. *Études Sur La Mort*, 124, 91–120.
- Anderson, D. P., & Siwicki, A. K. (1995). *Basic hematology and serology for fish health programs* (pp. 185–202). pp. 185–202.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, 20, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
- André, J.-M., Catala, M., Morère, J.-J., Escudier, E., Katsanis, G., & Poirier, J. (2008). Histologi: les tissus. In *Histologie: les tissus*.
- Ashton, I., Clements, K., Barrow, S. E., Secombes, C. J., & Rowley, A. F. (1994). Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1214, 253–262. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90071-X)
- Baaziz, M., Qacif, N., Bendiab, K., & Aouad, A. (2006). Les peroxidases des plantes. Aspect théorique et applications pratiques. *Enzymologie et Métabolisme*, 17–21.
- Bacchetta, R., Gregori, S., & Roncarolo, M. G. (2005). CD4+ regulatory T cells: Mechanisms of induction and effector function. *Autoimmunity Reviews*, 4, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.04.005>
- Barman, D., & Mandal, S. C. (2011). The History of. *Aquaculture Europe*, 36(3), 24–27.
- Bayrak, A., Kiralan, M., Ipek, A., Arslan, N., Cosge, B., & Khawar, K. M. (2010). Fatty acid compositions of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) genotypes of different origin cultivated in Turkey. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24(2), 1836–1842. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0034-2>
- Bengtén, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, L. W., Pilström, L., & Warr, G. W. (2000). Immunoglobulin Isotypes: Structure, Function, and Genetics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 248, 189–219. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59674-2_9
- Berczi, I., Bertok, L., & Bereznai, T. (1966). Comparative Studies On The Toxicity Of Escherichia Coli Lipopolysaccharide Endotoxin In Various Animal Species. *Canadian Journal Of Microbiology*, 12, 1070–1071.

- Bich Hang, B. T., Nguyen, P. T., & Kestemont, P. (2016). Oral administration of Escherichia coli lipopolysaccharide enhances the immune system of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). *Aquaculture Research*, 47, 1299–1308. <https://doi.org/10.1111/are.12589>
- Biller-Takahashi, J. D., & Urbinati, E. C. (2014). Fish immunology. The modification and manipulation of the innate immune System: Brazilian studies. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 86(3), 1483–1495. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130159>
- Bleyzac, P., Exbrayat, J.-M., & Fellah, J. S. (2005). Émergence du système immunitaire adaptatif: Hypothèses en présence. *Médecine/Sciences*, 21(2), 210–215. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005212210>
- Boltaña, S., Tridico, R., Teles, M., Mackenzie, S., & Tort, L. (2014). Lipopolysaccharides isolated from *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* show quantitative but not qualitative differences in inflammatory outcome in *Sparus aurata* (Gilthead seabream). *Fish and Shellfish Immunology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.003>
- Bouachour, T. (2014). *Activation des cellules Natural Killer par les endocannabinoïdes Anandamide et 2-Arachidonoyl-glycérol*. Ecole doctorale Biologie Santé Nantes-Angers.
- Calder, P C, Bevan, S. J., & Newsholme, E. A. (1992). The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunology*, 75, 108–115.
- Calder, Philip C. (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition ISSN:*, 50(52), 54–61. <https://doi.org/10.1080/17482970601066389>
- Calder, Philip C. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 645–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x>
- Carcelain, G., Chevailler, A., Fournel, S., Gubler, B., Lelièvre, J.-D., Seillès, E., & Vitte, J. (2018). *Immunologie fondamentale et immunopathologie Enseignements thématique et intégré Tissu lymphoïde et sanguin Immunopathologie et immuno-intervention* (Elsevier Masson SAS, Ed.).
- Charles, J., Chaperot, L., Salameire, D., Di Domizio, J., Aspor, C., Gressin, R., ... Leccia, M.-T. (2010). Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: Focus on their role in autoimmunity and cancer. *European Journal of Dermatology*, 20(1), 16–23. <https://doi.org/10.1684/ejd.2010.0816>
- Colette, C., & Monnier, L. (2011). Acides gras: Classification, fonction et équilibre entre les différentes familles. *Medecine Des Maladies Metaboliques*, 5(3), 237–245. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(11\)70234-6](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(11)70234-6)
- Conde-Sieira, M., Batista, S., Valente, L. M. P., Gesto, M., Míguez, J. M., Soengas, J. L., ... Villanueva, J. L. R. (2018). Influence of vegetable diets on physiological and immune responses to thermal stress in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *PLoS ONE*, 13, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194353>
- Corbett, Y., D'Alessandro, S., Parapini, S., Scaccabarozzi, D., Kalantari, P., Zava, S., ...

- Basilico, N. (2018). Interplay between Plasmodium falciparum haemozoin and l-arginine: Implication for nitric oxide production. *Malaria Journal*, *17*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2602-0>
- Corbett, Y., Parapini, S., D'Alessandro, S., Scaccabarozzi, D., Rocha, B. C., Egan, T. J., ... Basilico, N. (2015). Involvement of Nod2 in the innate immune response elicited by malarial pigment hemozoin. *Microbes and Infection*, *17*, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.11.001>
- Delarue, J. (2001). Acides gras polyinsaturés et inflammation. *Nutr Clin Métabol*, *15*, 172–178.
- Dendelé, B., Tekpli, X., Hardonnière, K., Holme, J. A., Debure, L., Catheline, D., ... Lagadic-Gossmann, D. (2014). Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chemico-Biological Interactions*, *207*, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.002>
- Dong, C., Kong, S., Zheng, X., Zhang, J., Nie, G., Li, X., & Xu, P. (2018). Genome-wide identification of interleukin-17 (IL17) in common carp (*Cyprinus carpio*) and its expression following *Aeromonas hydrophila* infection. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.038>
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, *4*, 837–851.
- FAO. (2018). *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018. Atteindre les objectifs de développement durable*.
- Ferreira, M. W., Costa, D. V. Da, Leal, C. A. G., Figueiredo, H. C. P., & Rosa, P. V. (2015). Dietary Oil Sources on the Innate Immunity and Resistance of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Streptococcus agalactiae* Challenge. *Journal of the World Aquaculture Society*, *46*(3), 252–262. <https://doi.org/10.1111/jwas.12192>
- Flajšhans, M., & Hulata, G. (2007). Common Carp (*Cyprinus carpio*). In *Genimpact-Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations*.
- Galazka, A. M. (1993). Immunologie générale. In *Les bases immunologiques de la vaccination* (pp. 1–23). Genève: Organisation mondiale de la Santé.
- Ganga, R., Bell, J. G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., & Izquierdo, M. S. (2005). Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *142*, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.09.010>
- García-Barragán, Á., Gutiérrez-Pabello, J. A., & Alfonseca-Silva, E. (2018). Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *59*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.001>
- Ghisolfi, J. (1993). Lipides, acides gras polyinsaturés et fonctions immunitaires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *7*, 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(05\)80194-3](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(05)80194-3)
- Goetz, F. W., Iliev, D. B., McCauley, L. A. R., Liarte, C. Q., Tort, L. B., Planas, J. V., & MacKenzie, S. (2004). Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Molecular Immunology*, *41*, 1199–1210. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.005>

Corjão, R., Azevedo-Martins, A. K., Rodrigues, H. G., Abdulkader, F., Arcisio-Miranda, M., Procopio, J., & Curi, R. (2009). Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacology and Therapeutics*, *122*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.01.004>

Gottrand, F. (2007). Acides gras polyinsaturés et immunité. *Archives de Pédiatrie*, *14*, 5–7.

Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., & Métailler, R. (1999). *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés* (INRA éditions & IFREMER, Eds.).

Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., & Dimitriadis, G. J. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, *19*, 345–361. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.009>

Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, *11*, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>

Hatala, M. A., Rayburn, J., & Rose, D. P. (1994). Comparison of linoleic acid and eicosapentaenoic acid incorporation into human breast cancer cells. *Lipids*, *29*(12), 831–837. <https://doi.org/10.1007/BF02536250>

Haukenes, A. H., Barton, B. A., & Renner, K. J. (2011). Plasma cortisol and hypothalamic monoamine responses in yellow perch *Perca flavescens* after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *Fish Physiology and Biochemistry*, *37*, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9443-2>

Huet, O., Choukroun, G., & Mira, J. P. (2004). Toll like receptor, inflammatory response and sepsis. *Reanimation*, *13*, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2004.02.002>

Inagawa, H., Kohchi, C., & Soma, G. I. (2011). Oral administration of lipopolysaccharides for the prevention of various diseases: Benefit and usefulness. *Anticancer Research*, *31*, 2431–2436.

Inagawa, H., Kohchi, C., & Soma, G. I. (2014). Usefulness of oral administration of lipopolysaccharide for disease prevention through the induction of priming in macrophages. *Anticancer Research*, *34*, 4497–4502.

Ispir, U., & Dorucu, M. (2014). Efficacy of lipopolysaccharide antigen of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout by intraperitoneal and bath immersion administration. *Research in Veterinary Science*, *97*, 271–273. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.07.020>

Jakhar, R., Sharma, C., Paul, S., & Kang, S. C. (2018). Immunosuppressive potential of astemizole against LPS activated T cell proliferation and cytokine secretion in RAW macrophages, zebrafish larvae and mouse splenocytes by modulating MAPK signaling pathway. *International Immunopharmacology*, *65*, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.014>

Janeway, C. A. J. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in

Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54, 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>

Jiang, J., Zhao, M. J., Lin, F., Yang, L., & Zhou, X. Q. (2010). Effect of conjugated linoleic acid on cyprinus carpio var. Jian regarding growth, immunity, and disease resistance to aeromonas hydrophila. *Lipids*, 45, 531–536. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3425-0>

Jung, J.-Y., Madan-Lala, R., Georgieva, M., Rengarajan, J., Sohaskey, C. D., Bange, F. C., & Robinson, C. M. (2013). The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infection and Immunity*, 81(9), 3198–3209. <https://doi.org/10.1128/IAI.00611-13>

Kadowaki, T., Yasui, Y., Nishimiya, O., Takahashi, Y., Kohchi, C., Soma, G. I., & Inagawa, H. (2013). Orally administered LPS enhances head kidney macrophage activation with down-regulation of IL-6 in common carp (Cyprinus carpio). *Fish and Shellfish Immunology*, 34, 1569–1575. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.372>

Kinsella, J. E., Broughton, K. S., & Whelan, J. W. (1990). Dietary unsaturated fatty acids: interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1, 123–141. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(90\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90011-9)

Knight, J., & Rowley, A. F. (1995). Immunoregulatory activities of eicosanoids in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Immunology*, 85, 389–393.

Kumar, R., & Joy, K. P. (2018). In vitro effects of lipopolysaccharide and stress hormones on phagocytosis and nitric oxide production by enriched head kidney macrophage cultures in the catfish Heteropneustes fossilis. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 84(3), 707–721. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2018/49312>

Lavialle, M., & Layé, S. (2010). Acides gras poly-insaturés (omega 3, omega 6) et fonctionnement du système nerveux central. *Innovations Agronomiques*, 10, 25–42.

Li, H., Ruan, X. Z., Powis, S. H., Fernando, R., Mon, W. Y., Wheeler, D. C., ... Varghese, Z. (2005). EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells : Evidence for a PPAR- γ - dependent mechanism. *Kidney International*, 67, 867–874. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00151.x>

Li, M., Chen, L., Li, E., Yu, N., Ding, Z., Chen, Y., & Qin, J. G. (2015). Growth, immune response and resistance to Aeromonas hydrophila of darkbarbel catfish, Pelteobagrus vachelli (Richardson), fed diets with different linolenic acid levels. *Aquaculture Research*, 46(4), 789–800. <https://doi.org/10.1111/are.12236>

Li, Z., Wang, X., Chen, C., Gao, J., & Lv, A. (2019). Transcriptome profiles in the spleen of African catfish (Clarias gariepinus) challenged with Aeromonas veronii. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 858–867. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.029>

Makrinos, D. L., & Bowden, T. J. (2016). Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.008>

Mathieu, M., Forquet, F., Blanc, D., Guimezanes, A., Thimonier, J., & Mokrane, A. (2009). *MALADIES AUTO-IMMUNES: CLES DE COMPREHENSION* (S. Aractingi, P. Chatelin, C. Karagoglou, P. Naquet, R. Picard, M. Rivière, ... D. Donnet-Kamal, Eds.). Paris.

- Maule, A. G., Tripp, R. A., Kaattari, S. L., & Schreck, C. B. (1989). Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology*, *120*, 135–142. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1200135>
- Mege, J. L., & Capo, C. (2010). Is macrophage polarization the gordian knot of bacterial infections? *Medecine/Sciences*, *26*(1), 83–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026183>
- Mesa-Rodriguez, A., Hernández-Cruz, C. M., Betancor, M. B., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. S., & Roo, J. (2018). Effect of increasing docosahexaenoic acid content in weaning diets on survival, growth and skeletal anomalies of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*, Valenciennes 1833). *Aquaculture Research*, *49*, 1200–1209. <https://doi.org/10.1111/are.13573>
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Ginés, R., & Izquierdo, M. S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, *248*, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.003>
- Nguyen, T. M., Kestemont, P., Mellery, J., Larondelle, Y., Mandiki land, S. N. M., & Tran, T. N. T. (n.d.). Digestibility of different plant-derived oils and influence of their combination on fatty acid composition of liver and muscle in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Unpublished Results*.
- Nguyen, T. M., Mandiki, S. N. M., Tran, T. N. T., Larondelle, Y., Mellery, J., Mignolet, E., ... Kestemont, P. (2019). Growth performance and immune status in common carp *Cyprinus carpio* as affected by plant oil-based diets complemented with β -glucan. *Fish and Shellfish Immunology*, *92*, 288–299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.011>
- Nicolas, J.-L., Gatesoupe, F.-J., Frouel, S., Bachere, E., & Gueguen, Y. (2007). Quelles stratégies alternatives aux antibiotiques en aquaculture ? *INRA Production Animales*, *20*(3), 253–258.
- Nikokelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., & Lilius, E.-M. (2004). Trout health gets a boost from probiotic *Lactobacillus*. *Feed Mix*, *12*(2), 18–21.
- Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L., & Figueras, A. (2009). LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, *26*(2), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.004>
- Nya, E. J., & Austin, B. (2010). Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Applied Microbiology*, *108*, 686–694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04464.x>
- Okuda, S., Sherman, D. J., Silhavy, T. J., Ruiz, N., & Biology, C. (2017). Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane : the PEZ model. *Nat Rev Microbiol.*, *14*, 1–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.25.Lipopolysaccharide>
- Olivia-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, *35*, 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid

fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1–4), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF00004714>

Rauta, P. R., Nayak, B., & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters*, 148, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>

Rebl, A., & Goldammer, T. (2018). Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 77, 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.016>

Ren, G., Xu, L., Lu, T., Zhang, Y., Wang, Y., & Yin, J. (2019). Protective effects of lentinan on lipopolysaccharide induced inflammatory response in intestine of juvenile taimen (*Hucho taimen*, Pallas). *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.121>

Ribeiro, L., Moura, J., Santos, M., Colen, R., Rodrigues, V., Bandarra, N., ... Dias, J. (2015). Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 447, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.017>

Rodriguez-Loureiro, I., Latza, V. M., Fragneto, G., & Schneck, E. (2018). Conformation of Single and Interacting Lipopolysaccharide Surfaces Bearing O-Side Chains. *Biophysical Journal*, 114, 1624–1635. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.014>

Roth, D. B. (2014). V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr.*, 6(2), 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014>

Rowley, A. F., Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J. W., & Vickers, P. J. (1995). Eicosanoids and their role in immune modulation in fish—a brief overview. *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 549–567. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(95\)80041-7](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80041-7)

Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., ... Esteban, M. Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.011>

Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In W. P. Limited (Ed.), *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-016-4.50001-5>

Sennequier, N., & Vadon-Le Goff, S. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/Sciences*, 14, 1185–1195.

Sepulcre, M. Pilar, López-Castejón, G., Meseguer, J., & Mulero, V. (2007). The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology*, 44, 2009–2016. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.022>

Sepulcre, María P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L., & Mulero, V. (2009). Evolution of Lipopolysaccharide (LPS) Recognition and Signaling: Fish TLR4 Does Not Recognize LPS and Negatively Regulates NF- κ B Activation.

The Journal of Immunology, 182, 1836–1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801755>

Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, N. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.*, 8, 349–361. <https://doi.org/10.1038/nri2294>. Resolving

Siwicki, A. K., & Cossarini-Dunier, M. (1990). Effect of levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in carp (*Cyprinus carpio*). *Annales de Recherches Vétérinaires*, 21, 95–100.

Siwicki, Andrzej K., Zakęś, Z., Terech-Majewska, E., Kazuń, K., Lepa, A., & Głąbski, E. (2010). Dietary Macrogard reduces *Aeromonas hydrophila* mortality in tench (*Tinca tinca*) through the activation of cellular and humoral defence mechanisms. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20, 435–439. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9133-2>

Spector, A. A., & Burns, C. P. (1987). Biological and Therapeutic Potential of Membrane Lipid Modification in Tumors. *Cancer Research*, 47, 4529–4537.

Spector, A. A., & Yorek, M. A. (1985). Membrane lipid composition and receptor function. *Journal of Lipid Research*, 26, 1015–1035.

Szalo, I. M., Taminiau, B., & Mainil, J. (2006). Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Annales de Médecine Veterinaire*, 150, 108–124.

Tamouza, R., & Labie, D. (2006). Un polymorphisme fréquent dans le promoteur d'un chimio-attractant des monocytes modifie la susceptibilité à la tuberculose pulmonaire. *Medecine/Science*, 22(6–7), juin-juillet. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062267571>

Tedgui, A., & Mallat, Z. (2004). Inflammation et athérosclérose. *Flammarion Médecine-Sciences*, 11–17.

Tian, Jing-jing, Lei, C., Ji, H., Zhou, J., Yu, H., Li, Y., ... Xie, J. (2019). Dietary arachidonic acid decreases the expression of transcripts related to adipocyte development and chronic inflammation in the adipose tissue of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 30, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.02.006>

Tian, Jingjing, Ji, H., Oku, H., & Zhou, J. (2014). Effects of dietary arachidonic acid (ARA) on lipid metabolism and health status of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture*, 430, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.020>

Tocher, D. R., Bell, J. G., MacGlaughlin, P., McGhee, F., & Dick, J. R. (2001). Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: Effects of dietary vegetable oil. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 130, 257–270. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00429-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00429-8)

Torrecillas, S., Mompel, D., Caballero, M. J., Montero, D., Merrifield, D., Rodiles, A., ... Izquierdo, M. (2017). Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.005>

Tort, L., Balasch, J. C., & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between

innate and adaptative responses. *Immunologia*, 22(3), 277–286.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), 486–503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>

Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, 68(5), 280–289. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>

Weldon, S. M., Mullen, A. C., Loscher, C. E., Hurley, L. A., & Roche, H. M. (2007). Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.04.003>

Wiik, R., Andersen, K., Uglenes, I., & Egidius, E. (1989). Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. *Aquaculture*, 83, 201–215. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90033-1)

Wu, F. C., Ting, Y. Y., & Chen, H. Y. (2003). Dietary docosahexaenoic acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defence responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 14, 223–238. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0433>

Xu, H., Wang, J., Mai, K., Xu, W., Zhang, W., Zhang, Y., & Ai, Q. (2016). Dietary docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) ratio influenced growth performance, immune response, stress resistance and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 47, 741–757. <https://doi.org/10.1111/are.12532>

Xue, Q., Yan, Y., Zhang, R., & Xiong, H. (2018). Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19123805>

Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P., & Oppenheim, J. J. (2009). Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends in Immunology*, 30(11), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.004>

Yang, L., Zhou, X., Huang, W., Fang, Q., Hu, J., Yu, L., ... Zhang, W. (2017). Protective Effect of Phillyrin on Lethal LPS-Induced Neutrophil Inflammation in Zebrafish. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43, 2074–2087. <https://doi.org/10.1159/000484192>

Yang, X., Sheng, W., Sun, G. Y., & Lee, J. C. M. (2011). Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochemistry International*, 58, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.004>

Youinou, P., Menez, J. F., Le Goff, P., & Boles, J.-M. (1993). Lipides et immunité. *Nutrition Clinique et Metabolisme*, 7, 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(05\)80041-X](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(05)80041-X)

Zemheri-Navruz, F., Acar, Ü., & Yilmaz, S. (2019). Dietary supplementation of olive leaf

extract increases haematological, serum biochemical parameters and immune related genes expression level in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 89, 672–676. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.037>

Zeng, Y. Y., Feng, L., Jiang, W. D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., ... Zhou, X. Q. (2017). Dietary alpha-linolenic acid/linoleic acid ratios modulate immune response, physical barrier and related signaling molecules mRNA expression in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 62, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.003>

Zhang, M., Chen, C., You, C., Chen, B., Wang, S., & Li, Y. (2019). Effects of different dietary ratios of docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) on the growth, non-specific immune indices, tissue fatty acid compositions and expression of genes related to LC-PUFA biosynthesis in juvenile golden pompano *Trachin.* *Aquaculture*, 505, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.061>

Zhang, W., Jia, Y., Ji, X., Zhang, R., Liang, T., Du, Q., & Chang, Z. (2016). Optimal reference genes in different tissues, gender, and gonad of Yellow River carp (*Cyprinus carpio* var) at various developmental periods. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(6), 1615–1622.

Zou, J., Tafalla, C., Truckle, J., & Secombes, C. J. (2007). Identification of a Second Group of Type I IFNs in Fish Sheds Light on IFN Evolution in Vertebrates. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3859–3871. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3859>

Zuo, R., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Xu, H., ... Zhang, Y. (2012). Effects of dietary docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid ratio (DHA/EPA) on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of paras. *Aquaculture*, 334–337, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.045>

Annexe 1 : Tableau des ingrédients et compositions approximatives des six régimes expérimentaux

Ingredients (g/kg dry matter – DM)	Experimental diets					
	CLO	LO	SO	SLO	LOA	SOD
Soluble fish protein concentrate (SFPC) ^a	270.0	270.0	270.0	270.0	270.0	270.0
Wheat Gluten ^b	110.0	110.0	110.0	110.0	110.0	110.0
Gelatin ^c	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Casein ^d	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Starch ^e	375.0	375.0	375.0	375.0	365.0	352.0
Cod liver oil (CLO) ^f	100.0					
Linseed oil (LO) ^g		100.0		50.0	100.0	
Sesame oil (SO) ^h			100.0	50.0		100.0
Vitamin premix ⁱ	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral premix ^j	65.0	65.0	65.0	65.0	65.0	65.0
Arachidonic acid, ARA ^k					10.0	
Docosahexaenoic, DHA ^l						23.0
Cellulose ^m	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Total	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
Linoleic acid, LA (%) ¹	13.6	21.5	42.6	34.2	21.5	42.6
α -linolenic acid, ALA (%) ²	1.1	44.1	0.8	19.5	44.1	0.8
Arachidonic acid, ARA (%) ³	0.3	--	--	--	1.0	--
Eicosapentaenoic acid, EPA (%) ⁴	6.3	--	--	--	--	--
Docosahexaenoic acid, DHA (%) ⁵	9.2	--	--	--	--	6.0
Crude protein, CP (% DM)	30.6	30.6	31.1	30.5	30.4	30.8
Crude fat, CF (%)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Gross energy, GE (MJ/Kg DM)	17.6	17.2	17.7	17.6	17.4	17.7
CP/GE (g/MJ)	21.0	21.5	20.9	21.0	21.3	21.0
CF/GE (g fat/MJ GE)	5.7	5.8	5.6	5.7	5.8	5.7

Experimental diet nomenclature: CLO: cod liver oil-based diet; LO: linseed oil-based diet; SO: sesame oil-based diet; SLO: blend of sesame and linseed oil-based diet (v/v, 1/1); LOA: linseed oil + ARA; SOD: sesame oil + DHA

^aCook carp concept, 56 Rue de Metz, 57130 Jouy-aux-Arches, France

^{b,c,d,e,f,g,h,m} Sigma aldrich, St Louis, MO, USA

^e Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)

ⁱMineral premix (to provide g/kg mixture) was prepared in the laboratory as CaHPO₄.2H₂O = 295.5; Ca(H₂PO₄)₂.H₂O = 217; NaHCO₃ = 94.5; KCl = 100; NaCl = 172.4; KI = 0.2; MgCl₂ = 63.7; MgSO₄ = 34.3; MnSO₄.4H₂O = 2; FeSO₄.4H₂O = 10; CuSO₄.5H₂O = 0.4; ZnSO₄.7H₂O = 10

^jVitamin (VTM) premix (to provide g/kg mixture) was prepared in the laboratory as Retinyl acetate/VTM A acetate = 0.67; Cholecalciferol/VTM D3 = 0.01; Tocopheryl acetate/VTM E acetate = 34.2; Menadione/VTM K3 = 2.2; Butylated hydroxyanisole/BHA = 1.5; Butylated hydroxytoluene/BHT = 1.5; Ascorbic acid/VTM C = 120; Thiamin/VTM B1 = 5.6; Riboflavin/VTM B2 = 12; Pyridoxine/VTM B6 = 4.5; Calcium pantothenate (toxic)/VTM B5 = 14.1; p-aminobenzoic acid/VTM H1 = 40; Cyanocobalamin/VTM B12 = 0.03; Niacin/VTM B3 = 30; Biotin/VTM H, Coenzyme R = 0.1; Choline chloride = 350; Folic acid/VTM M = 1.5; Inositol = 50; Canthaxanthin/E161g = 10

^k Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd

^l Vitazita, Dirk Hartogweg 14, 5928 LV Venlo, Holland

^{1,2,3,4,5} Nguyen et al. (n.d.)

Annexe 2 : Conclusions des tests statistiques pour les gènes

il-10

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	2.390	5	1.9866	0.08669	
LPS	6.999	1	29.0834	0.0000004368	***
Time	32.459	1	134.8821	< 2.2e-16	***
Diet:LPS	0.861	5	0.7154	0.61325	
Diet:Time	1.992	5	1.6559	0.15189	
LPS:Time	4.267	1	17.7330	0.0000541734	***
Diet:LPS:Time	0.622	5	0.5173	0.76268	
Residuals	25.027	104			
Moy. rep.	1.12117609				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

lox 5

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	2.4282	5	3.2045	0.009890	**
LPS	0.0179	1	0.1184	0.731456	
Time	1.4976	1	9.8817	0.002176	**
Diet:LPS	0.002176	5	0.6432	0.667264	
Diet:Time	0.4874	5	1.2551	0.289065	
LPS:Time	0.9510	1	0.1317	0.717387	
Diet:LPS:Time	0.0200	5	0.5212	0.759740	
Residuals	15.7611	104			
Moy. rep.	1.15460255				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

il-8

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	6.273	5	4.4146	0.001098	**
LPS	25.125	1	88.4112	1.453e-15	***
Time	72.696	1	255.8068	< 2.2e-16	***
Diet:LPS	0.319	5	0.2244	0.951238	
Diet:Time	4.284	5	3.0153	0.013933	*
LPS:Time	14.823	1	52.1610	8.762e-11	***
Diet:LPS:Time	0.385	5	0.2707	0.928211	
Residuals	29.555	104			
Moy. rep.	1.17895856				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

cxc

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	1.066	5	1.2478	0.292300	
LPS	1.404	1	8.2193	0.005018	**
Time	36.858	1	215.7121	< 2.2e-16	***
Diet:LPS	0.945	5	1.1061	0.361752	
Diet:Time	1.431	5	1.6749	0.147160	
LPS:Time	1.509	1	8.8310	0.003679	**
Diet:LPS:Time	0.713	5	0.8351	0.527674	
Residuals	17.770	104			
Moy. rep.	0.91166148				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

pgel

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	0.25642	5	3.4991	0.005792	**
LPS	0.00000	1	0.0002	0.988006	
Time	0.89856	1	61.3072	4.322e-12	***
Diet:LPS	0.09248	5	1.2619	0.286037	
Diet:Time	0.03906	5	0.5330	0.750868	
LPS:Time	0.01913	1	1.3051	0.255910	
Diet:LPS:Time	0.08900	5	1.2145	0.307573	
Residuals	1.52430	104			
Moy. Repl.	0.5604173				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

tlr4

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	2.1327	5	6.0661	0.00005734	***
LPS	0.3965	1	5.6382	0.019407	*
Time	0.4856	1	6.9059	0.009891	**
Diet:LPS	0.2368	5	0.6735	0.644422	
Diet:Time	0.3679	5	1.0465	0.394527	
LPS:Time	0.0104	1	0.1477	0.701497	
Diet:LPS:Time	0.1769	5	0.5031	0.773290	
Residuals	7.3128	104			
Moy. Repl.	0.92696358				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

nf-kb

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	0.2967	5	0.8082	0.54635	
LPS	0.5074	1	6.9119	0.00986	**
Time	3.0873	1	42.0552	0.00000003048	***
Diet:LPS	0.3308	5	0.9013	0.48327	
Diet:Time	0.0920	5	0.2507	0.93863	
LPS:Time	0.0017	1	0.0227	0.88049	
Diet:LPS:Time	0.3347	5	0.88049	0.47645	
Residuals	7.6347	104			
Moy. Repl.	0.91056971				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

il6

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	3.2435	5	2.3382	0.0468776	*
LPS	8.2774	1	29.8357	0.000000322852	***
Time	10.8214	1	39.0055	0.000000009366	***
Diet:LPS	1.3504	5	0.9735	0.4376198	
Diet:Time	4.2858	5	3.0896	0.0121796	*
LPS:Time	4.2784	1	15.4216	0.0001549	***
Diet:LPS:Time	1.5813	5	1.1400	0.3440836	
Residuals	28.8529	104			
Moy. Repl.	0.87256258				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

il-1

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	16.632	5	4.4230	0.001081	**
LPS	47.448	1	63.0889	2.454e-12	***
Time	56.354	1	74.9313	6.636e-14	***
Diet:LPS	7.701	5	2.0481	0.077945	
Diet:Time	15.530	5	4.1298	0.001840	**
LPS:Time	34.174	1	45.4392	9.027e-10	***
Diet:LPS:Time	7.241	5	1.9257	0.096260	
Residuals	78.216	104			
Moy. Repl.	0.81196101				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

inos

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	12.250	5	4.4234	0.001081	**
LPS	22.945	1	41.4277	0.000000003832	***
Time	23.671	1	42.7397	0.000000002377	***
Diet:LPS	2.503	5	0.9040	0.481530	
Diet:Time	10.662	5	3.8501	0.003059	**
LPS:Time	10.754	1	19.4164	0.000025621094	***
Diet:LPS:Time	4.680	5	1.6901	0.143463	
Residuals	57.600	104			
Moy. repl.	0.83565503				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

tnf- α

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Diet	2.748	5	2.3107	0.04921	*
LPS	13.452	1	56.5542	2.019e-11	***
Time	46.103	1	193.8229	< 2.2e-16	***
Diet:LPS	0.287	5	0.2414	0.94319	
Diet:Time	3.797	5	3.1931	0.01010	*
LPS:Time	5.416	1	22.7687	5.988e-06	***
Diet:LPS:Time	0.344	5	0.2893	0.91795	
Residuals	24.737	104			
Moy. repl.	0.97527875				
Signif. codes:	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				