



**HAL**  
open science

# Intérêt de la gamification dans l'enseignement de pathologie clinique vétérinaire : création d'un escape game pédagogique numérique

Marion Le Sueur

## ► To cite this version:

Marion Le Sueur. Intérêt de la gamification dans l'enseignement de pathologie clinique vétérinaire : création d'un escape game pédagogique numérique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04795429v1

**HAL Id: dumas-04795429**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04795429v1>**

Submitted on 21 Nov 2024 (v1), last revised 27 Nov 2024 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2024 - Thèse n° 69

**IMPACT DE DIFFÉRENTES PROCÉDURES DE  
PRÉLÈVEMENTS SANGUINS SUR LA TRUITE  
ARC-EN-CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) ET DURÉE  
DE RÉGÉNÉRATION SANGUINE ASSOCIÉE**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Nantes

le 3 octobre 2024

par

**Jessica, Manon GUY**

sous la direction de

**Monsieur Antoine ROSTANG**

Président du jury : **Madame Ségolène CALVEZ**, Professeur à Oniris

Membres du jury : **Madame Laetitia JAILLARDON**, Maître de conférence à Oniris  
**Monsieur Antoine ROSTANG**, Maître de conférence à Oniris

Membre invité : **Monsieur Nicolas SOETART**, Praticien hospitalier à Oniris



ANNÉE 2024 - Thèse n° 69

**IMPACT DE DIFFÉRENTES PROCÉDURES DE  
PRÉLÈVEMENTS SANGUINS SUR LA TRUITE  
ARC-EN-CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) ET DURÉE  
DE RÉGÉNÉRATION SANGUINE ASSOCIÉE**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Nantes

le 3 octobre 2024

par

**Jessica, Manon GUY**

sous la direction de

**Monsieur Antoine ROSTANG**

Président du jury : **Madame Ségolène CALVEZ**, Professeur à Oniris

Membres du jury : **Madame Laetitia JAILLARDON**, Maître de conférence à Oniris  
**Monsieur Antoine ROSTANG**, Maître de conférence à Oniris

Membre invité : **Monsieur Nicolas SOETART**, Praticien hospitalier à Oniris



## Liste du corps enseignant

### Département **BPSA** Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable : **Emmanuel JAFFRES** – Adjointe : **Frédérique NGUYEN**

Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (Pr émérite) Marc GOGNY (Pr émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)

### Département **SAESP** Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable : **Raphaël GUATTEO** – Adjoint : **Jean-Michel CAPPELIER**

Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ 5(Pr) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr émérite) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC)

## Département **DSC** Sciences cliniques

Responsable : **Catherine IBISCH** – Adjoint : **Marion FUSELLIER**

Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC Stagiaire)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) Francis FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)

## Département **GPA** Génie des procédés alimentaires

Responsable : **Sébastien CURET-PLOQUIN** – Adjointe : **Vanessa JURY**

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril GAILLARD (PCEA)	

## Département **MSC** Management, statistiques et communication

Responsable : **Samira ROUSSELIERE** – Adjointe : **Véronique CARIOU**

Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC) Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

## Mentions légales

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénom de l'auteur : Jessica Guy
- Année de soutenance : 2024
- Titre de la thèse : Impact de différentes procédures de prélèvements sanguins sur la truite arc-en-ciel et durée de régénération sanguine
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- Ecole de soutenance : Oniris VetAgroBio - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 156 p.



## Remerciements

À mon Jury,

Au Professeur Ségolène Calvez, Professeur à Oniris, pour m'avoir orientée vers ce sujet au tout début, pour son aide précieuse aux étapes clés du projet et enfin pour me faire l'honneur de présider mon Jury de thèse.

À Madame Laetitia Jaillardon, Maître de Conférences à Oniris, pour avoir accepté de participer à ce Jury.

À Monsieur Antoine Rostang, Maître de Conférences à Oniris, pour son encadrement bienveillant, pour son énergie infaillible tout au long de cette étude, pour ses conseils essentiels sur la présentation de ce travail.

À Monsieur Nicolas Soetart, Praticien Hospitalier à LabOniris, pour son implication dans ce projet, pour ses conseils précieux et son expertise indispensables en hématologie, pour avoir accepté de participer à ce Jury.

Pour leur contribution dans cette étude,

À M. Lionel Pineau, pour son aide bienveillante et essentielle au bon déroulement des manipulations à la station aquacole, pour ses conseils indispensables concernant le protocole et l'environnement des poissons.

À Mme. Florine Bachelet et Mme. Céline David, pour leur aide indispensable au cours des nombreuses manipulations, pour le temps passé à préparer le matériel utilisé sur chaque prélèvement.

À l'équipe APPIFISH, à savoir M. Kenny Oberlé, Mme. Emmanuelle Moreau, Mme. Nora Navarro-Gonzalez, Mme. Ségolène Calvez et Mr. Antoine Rostang, pour leur contribution essentielle aux phases expérimentales.

À Mme. Nadine Brisseau et Mme. Anne Lehébel, pour leur expertise en statistiques, pour la conception de modèles nécessaires à l'interprétation des résultats, pour leur disponibilité et leur implication bienveillante dans ce projet.

À l'équipe de LabOniris, et en particulier à Mme. Léa Urffer et Mme. Delphine Boucher, pour leur temps passé à analyser l'ensemble des prélèvements.

À mes relecteurs, essentiels à la production de ce manuscrit.

## Table des matières

Liste du corps enseignant.....	3
Mentions légales.....	5
Remerciements.....	7
Table des matières.....	9
Table des annexes.....	14
Table des figures.....	15
Table des tableaux.....	18
Table des abréviations et des sigles.....	19
Introduction.....	20
<b>Partie 1 - Contexte Scientifique : Erythropoïèse, volémie, et les différents facteurs impliqués chez la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....</b>	<b>21</b>
I. Hématologie de la truite arc-en-ciel.....	22
A. Le sang.....	22
a. Définition.....	22
b. Les globules rouges.....	22
c. Les globules blancs.....	22
d. Les plaquettes.....	22
e. Le plasma.....	22
B. L'érythropoïèse chez la truite arc-en-ciel.....	23
a. Définition.....	23
b. Organes érythropoïétiques.....	23
c. Erythropoïèse primitive et définitive.....	24
d. Cellules de la lignée érythrocytaire.....	25
C. Les érythrocytes au sein de l'organisme.....	27
a. La respiration chez les téléostéens.....	27
b. Rôle de l'hémoglobine.....	29
c. Impact de l'anémie et de la polyglobulie.....	30
d. Contraction splénique en réponse à un stress.....	30
e. Gonflement des érythrocytes.....	31
f. Système vasculaire secondaire.....	31
D. Méthodes de prélèvement sanguin.....	33
a. Prélèvement simple.....	33
1. Condition du poisson lors de la prise de sang.....	33
2. Localisation du prélèvement.....	34
b. Prélèvement en série.....	36

1. Pose d'un cathéter.....	36
2. Prélèvements sanguins en série sous anesthésie au niveau de la veine caudale.....	37
3. Remplacement du volume prélevé.....	37
II. Grandeurs utilisées en hématologie pour la lignée rouge, valeurs de référence et facteurs de variation.....	38
A. Variables hématologiques d'intérêt.....	38
a. La numération globulaire (GR).....	38
b. L'hématocrite (Ht).....	39
c. Le taux d'hémoglobine (Hb).....	40
d. Le volume globulaire moyen (VGM).....	41
e. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).....	42
f. La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH).....	43
g. Le taux de réticulocytes.....	45
h. La volémie chez les poissons.....	45
B. Facteurs de variation des variables hématologiques.....	46
a. Facteurs individuels.....	47
1. Âge.....	47
2. Sexe.....	47
3. Souche.....	47
b. Facteurs environnementaux.....	47
1. Température.....	47
2. Teneur en oxygène de l'eau.....	48
i. Milieu hypoxique.....	48
ii. Milieu hyperoxique.....	49
3. Teneur en dioxyde de carbone de l'eau.....	49
4. Lumière.....	50
i. Intensité de la lumière.....	50
ii. Spectre de lumière.....	50
iii. Photopériode.....	50
5. Exposition à des pH extrêmes.....	50
6. Exposition à des substances toxiques.....	51
c. Autres facteurs.....	51
1. Alimentation.....	51
2. Pertes sanguines.....	52
3. Effort physique.....	52
III. Stress et expérimentation animale.....	53
A. Définition.....	53
B. Réponse biologique au stress chez la truite arc-en-ciel.....	53

C. Sources de stress en expérimentation animale.....	54
a. Allotement.....	54
b. Lumière.....	55
1. Intensité de la lumière.....	55
2. Spectre de la lumière.....	55
c. Manipulation des poissons.....	56
d. Prélèvements sanguins.....	57
D. Biais expérimentaux.....	57
<b>Partie 2 - Etude expérimentale : Impact de différentes procédures de prélèvements sanguins sur la truite arc-en-ciel et durée de régénération sanguine.....</b>	<b>59</b>
I. Objectifs.....	60
A. Evaluation de l'influence du prélèvement sanguin sur les variables hématologiques.	60
B. Evaluation d'un temps de régénération sanguine selon le volume prélevé.....	60
II. Matériels et méthodes.....	62
A. Animaux.....	62
B. Environnement.....	63
C. Protocole 1 : suivi de paramètres biologiques et zootechniques toutes les deux semaines suite à 6 modalités de prélèvement différentes.....	64
a. Descriptif des différents types de protocoles de prélèvement.....	64
b. Déroulé des différents temps de prélèvement.....	65
c. Etude du saignement à la suite des prélèvements.....	66
d. Observation des truites arc-en-ciel suite aux prélèvements.....	68
D. Protocole 2 : suppression d'un prélèvement de contrôle à J15.....	68
E. Justification du nombre de poissons utilisés dans les expériences.....	68
F. Standardisation des prélèvements sanguins.....	69
G. Analyse des prélèvements sanguins.....	69
H. Analyse statistique.....	70
III. Résultats.....	72
A. Protocole 1 : Suivi de paramètres biologiques et zootechniques toutes les deux semaines suite à 6 modalités de prélèvement différentes.....	72
a. Croissance des poissons au cours de l'étude.....	72
1. Poids réel.....	72
2. Gain de poids.....	74
b. Mortalité.....	74
c. Evolution des variables hématologiques au cours des prélèvements répétés à J0 (groupes D, E et F).....	76
d. Variables hématologiques de la lignée rouge.....	79
1. Description de l'évolution de la lignée rouge.....	79

i. Numération globulaire.....	79
ii. Taux d'hémoglobine.....	79
iii. L'hématocrite.....	80
iv. Le VGM.....	80
v. La CCMH.....	82
vi. La TCMH.....	82
2. Comparaison au groupe témoin : le groupe A.....	83
i. Comparaison des index.....	83
ii. Utilisation d'un rapport avec le groupe témoin.....	85
3. Récupération des variables initiales.....	87
4. Comptages cellulaires.....	90
i. Quantité de cellules immatures basale.....	90
ii. Evolution des populations érythrocytaires.....	90
5. Lignée blanche.....	91
6. Saignements.....	93
B. Protocole 2 : suppression d'un prélèvement de contrôle à J15.....	94
a. Mortalité.....	94
b. Variables hématologiques.....	94
1. Récupérations des variables initiales.....	94
2. Population érythrocytaire.....	94
c. Comparaison au protocole 1.....	94
IV. Discussion.....	97
A. Saprolégniose.....	97
a. Période d'acclimatation au sein de la station.....	97
b. Luminosité de la salle.....	98
c. Densité des bacs.....	98
1. Poids des animaux.....	98
2. Densité et dominance.....	98
B. Alimentation des poissons.....	101
C. Croissance des poissons.....	101
D. Prélèvements sanguins.....	102
a. Site de prélèvement.....	102
b. Lésions visualisées au cours de l'étude.....	102
c. Prélèvements initiaux.....	105
d. Prélèvements de contrôle.....	106
e. Anticoagulant.....	106
1. Type d'anticoagulant.....	106
2. Quantité d'anticoagulant.....	107

E. Variables hématologiques.....	107
a. La réponse au stress.....	107
b. Description des variables hématologiques.....	109
1. Exclusion de certains poissons.....	109
2. Entre J0 et J1.....	109
3. Entre J1 et J42.....	111
4. À partir de J42.....	112
c. Comparaison au groupe A : groupe témoin.....	114
d. Temps de régénération sanguine.....	115
e. Comparaison des deux protocoles.....	116
f. Lignée blanche.....	117
F. Saignements et mortalité.....	118
G. Modélisation statistique.....	119
<b>Conclusion.....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>123</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>132</b>

## Table des annexes

Annexe 1 : Dessin schématique de l'anatomie externe de la truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Le dessin montre les emplacements des points de ponction de la veine caudale utilisés au cours de cette étude (De Kinkelin <i>et al.</i> , 2018).....	132
Annexe 2 : Planning des manipulations de l'ensemble de l'étude, avec le Protocole 1 commençant à J0, et le Protocole 2 à J56.....	133
Annexe 3 : Organisation de l'espace pour la manipulation du 18/03/2024 et répartition des groupes dans les bacs.....	134
Annexe 4 : Fiche de points limites.....	135
Annexe 5 : Essais hématologiques sur 9 poissons en amont de l'étude.....	136
Annexe 6 : Moyenne des variables hématologiques obtenues sur l'ensemble des prélèvements à J0T0h.....	137
Annexe 7 : Poissons exclus de l'analyse statistiques selon les anomalies cliniques, zootechniques et biologiques.....	138
Annexe 8 : Dictionnaire des données utilisées dans le logiciel R.....	139
Annexe 9 : Tableaux de résultats du poids moyen et de l'écart type associé à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	145
Annexe 10 : Tableaux de résultats du gain de poids moyen et de l'écart type associé à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	146
Annexe 11 : Tableaux de résultats du taux d'hémoglobine et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	147
Annexe 12 : Tableaux de résultats de la numération globulaire et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	149
Annexe 13 : Tableaux de résultats de l'hématocrite et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	151
Annexe 14 : Tableaux de résultats de la numération leucocytaire et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	153
Annexe 15 : Tableaux de résultats des saignements à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe.....	154

## Table des figures

Figure 1 : Différences entre l'érythropoïèse primitive et définitive chez les mammifères (Palis, 2014).....	24
Figure 2 : Les étapes de l'érythropoïèse chez le poisson, inspiré des travaux de Kulkeaw et Sugiyama (2012), Soldatov (2023) et Stern (2022).....	25
Figure 3 : Photographies de frottis sanguins héparinés chez la truite arc-en-ciel, réalisées au microscope à LabOniris sur deux poissons de la présente étude (objectif x60). a. érythrocyte. b. érythroblaste polychromatophile. c. lymphocyte. d. érythroblaste basophile.....	26
Figure 4 : Dessins schématiques de la cavité branchiale et des branchies d'une truite arc-en-ciel montrant (a) une vue d'ensemble et (b) une coupe frontale passant par le maxillaire inférieur et les arcs branchiaux. (De Kinkelin <i>et al.</i> , 2018).....	27
Figure 5 : Dessins schématiques de la respiration branchiale ainsi que ses échanges de gaz : (a) anatomie schématique, (b) modèle des flux et (c) profils de pression partielle de l'O <sub>2</sub> dans l'eau (en haut) et dans le sang (en bas) (Piiper, 1982).....	28
Figure 6 : Dessin schématique d'une portion d'arc branchial chez un téléostéen (Hughes et Morgan, 1973).....	29
Figure 7 : Dessin schématique d'un trajet d'érythrocyte entre la circulation primaire et secondaire, visualisé préalablement par vidéo (Steffensen <i>et al.</i> 1986).....	32
Figure 8 : Dessin schématique de l'appareil circulatoire d'un poisson téléostéen (De Kinkelin <i>et al.</i> , 2019).....	34
Figure 9 : Les différents sites de prélèvements sanguins chez le poisson à travers l'exemple de la truite arc-en-ciel, photographie réalisée par A. Rostang, 2023.....	34
Figure 10 : (a) Anatomie interne de la vasculature caudale et des structures associées chez un achigan à grande bouche ( <i>Micropterus salmoides</i> ; Lacépède, 1802) et (b) dessin schématique de la vasculature caudale avec le placement de l'aiguille prélevant du sang, photographie réalisée par Alice Abrams et Paul Parson (Lawrence <i>et al.</i> , 2020).....	35
Figure 11 : Dessin schématique montrant la position des cathéters insérés dans l'aorte dorsale et dans l'aorte ventrale (Black, 2000).....	36
Figure 12 : Schéma illustrant la réponse hormonale à la suite d'un stress chez le poisson (FSBI, 2002).....	54
Figure 13 : Photographies illustrant des lésions de saprolégiose sur une truite arc-en-ciel (Marine directorate, 2023).....	58
Figure 14 : Photographie de la salle de travail de cette étude, Salle 3 de la station aquacole d'Oniris, cuves de 200 L.....	63
Figure 15 : Principe de la répartition des 108 poissons en 6 groupes subissant des modalités de prélèvement différentes, dans 12 bacs.....	65
Figure 16 : Scoring des saignements évalué selon la couleur des bacs. Photographie prise à la station aquacole d'Oniris. Score allant de 0 (à gauche) à 2 (à droite).....	67
Figure 17 : Lien entre le volume de sang présent dans 5 L d'eau et le scoring de saignement.	

Photographie prise à la station aquacole d'Oniris.....	67
Figure 18 : Evolution du poids moyen des poissons par groupe à chaque temps de prélèvement.....	72
Figure 19 : Evolution du poids des poissons par groupes à chaque temps de prélèvement...	73
Figure 20 : Evolution du poids des poissons par bac à chaque temps de prélèvement.....	73
Figure 21 : Evolution du gain de poids moyen des poissons par groupe à chaque temps de prélèvement.....	74
Figure 22 : Evolution de l'effectif des poissons par groupes au cours du temps.....	75
Figure 23 : Pourcentage de poissons ayant été euthanasiés pour atteinte de point limite par groupe.....	76
Figure 24 : Evolution de l'effectif des poissons par bac au cours du temps.....	76
Figure 25 : Evolution de la numération globulaire (haut), du taux d'hémoglobine (milieu) et de l'hématocrite (bas) entre J0 et J1.....	77
Figure 26: Evolution de l'index de la numération globulaire (haut), du taux d'hémoglobine (milieu) et de l'hématocrite (bas) entre J0 et J1.....	78
Figure 27 : Evolution de l'index de la numération globulaire par groupe à chaque temps de prélèvement.....	79
Figure 28 : Evolution de l'index du taux d'hémoglobine par groupe à chaque temps de prélèvement.....	80
Figure 29 : Evolution de l'index de l'hématocrite par groupe à chaque temps de prélèvement.	81
Figure 30 : Evolution de l'index du VGM par groupe à chaque temps de prélèvement.....	81
Figure 31 : Evolution de l'index de la CCMH par groupe à chaque temps de prélèvement.....	82
Figure 32 : Evolution de l'index de la TCMH par groupe à chaque temps de prélèvement.....	83
Figure 33 : Evolution de l'index de la numération globulaire à chaque temps de prélèvement selon le groupe.....	83
Figure 34 : Evolution de l'index de la numération globulaire à chaque temps de prélèvement selon le groupe.....	84
Figure 35 : Evolution de l'index de la numération globulaire à chaque temps de prélèvement selon le groupe.....	85
Figure 36 : Evolution du rapport de l'index de la numération globulaire de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement.....	86
Figure 37 : Evolution du rapport de l'index du taux d'hémoglobine de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement.....	86
Figure 38 : Evolution du rapport de l'index de l'hématocrite de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement.....	87
Figure 39 : Modèle de récupération des variables hématologiques, étudiant la récupération de 85 % de la numération globulaire initiale selon les groupes au cours du temps.....	88
Figure 40 : Modèle de récupération des variables hématologiques, étudiant la récupération de 85 % du taux d'hémoglobine initial selon les groupes au cours du temps.....	88
Figure 41 : Modèle de récupération des variables hématologiques, étudiant la récupération	

de 85 % de l'hématocrite initial selon les groupes au cours du temps.....	89
Figure 42 : Pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre d'érythrocytes total en fonction du temps.....	91
Figure 43 : Evolution de la moyenne de l'index de la numération leucocytaire par groupe à chaque temps de prélèvement.....	92
Figure 44 : Evolution de l'index de la numération leucocytaire de chaque truite par groupe à chaque temps de prélèvement.....	92
Figure 45 : Pourcentage de poissons ayant présenté au moins un saignement au cours de l'étude par groupe.....	93
Figure 46 : Pourcentage de prélèvements ayant provoqué un saignement de score 1 ou 2 à J0 et à partir de J1 par groupe.....	93
Figure 47 : Comparaison de l'évolution de l'index de la numération globulaire (haut), du taux d'hémoglobine (milieu) et de l'hématocrite (bas) selon le temps de prélèvement entre le protocole 1 (B) et le protocole 2 (B').....	95
Figure 48 : Comparaison de l'évolution de l'index du VGM (haut), de la CCMH (milieu) et de la TCMH (bas) selon le temps de prélèvement entre le protocole 1 (B) et le protocole 2 (B')....	96
Figure 49 : Photographie illustrant la perte d'écailles importante chez le poisson B16P1 5 jours après l'introduction du poisson B21P1.....	100
Figure 50 : Photographie illustrant une lésion de saprolégniose sur le flanc gauche en dessous de la ligne latérale (B15P4).....	103
Figure 51 : Photographie illustrant une lésion de saprolégniose à gauche de la queue (B16P3)	103
Figure 52 : Photographie illustrant une lésion de saprolégniose avec perte de matière caudalement à la nageoire adipeuse (B13P1).....	104
Figure 53 : Photographie illustrant un furoncle à gauche de la queue (B16P4).....	104
Figure 54 : Photographie illustrant des pétéchies à proximité du site de prélèvement ainsi qu'une légère hyperhémie de la nageoire caudale (B18P9).....	105

## Table des tableaux

Tableau I : Intervalles ou valeurs moyennes de la numération globulaire chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales.....	38
Tableau II : Intervalles ou valeurs moyennes de l'hématocrite chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales.....	39
Tableau III : Intervalles ou valeurs moyennes du taux d'hémoglobine chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales.....	40
Tableau IV: Intervalles ou valeurs moyennes du VGM chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales.....	42
Tableau V : Intervalles ou valeurs moyennes de la CCMH chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales.....	43
Tableau VI : Intervalles ou valeurs moyennes de la TCMH chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales.....	44
Tableau VII : Tableau regroupant les méthodes utilisées et les volémies obtenues (en pourcentage du poids vif) dans diverses études.....	46
Tableau VIII : Estimation du temps de récupération nécessaire selon le volume de sang prélevé selon les deux modalités de prélèvement chez des rongeurs (Diehl <i>et al.</i> , 2001).....	64
Tableau IX : Les différents volumes prélevés au cours de la manipulation selon le groupe auquel appartient chaque poisson. Une valeur en pourcentage correspond au pourcentage du poids vif de l'individu prélevé, tous les poissons sont prélevés du même volume à partir de J1.....	66
Tableau X : Hazard ratios issus du modèle de Cox permettant de comparer les risques de récupération de 85 % des valeurs initiales des différents groupes avec pour référence le groupe A.....	89
Tableau XI: Classement des groupes selon les HR et les contrastes des emmeans, soit la probabilité la plus élevée de récupérer 85 % des valeurs initiales selon la variable étudiée..	90
Tableau XII : Pourcentages de cellules immatures obtenus à partir de comptages cellulaires chez un poisson par groupe pour le protocole 1, et une moyenne des comptages des poissons du groupe B' du protocole 2.....	117
Tableau XIII : Effectifs des poissons conservés dans les analyses statistiques jusqu'à J84.....	119

## Table des abréviations et des sigles

ACTH	Adrénocorticotrophine
APAFIS	Autorisation de Projet Utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques
B	Bac
CCPA	Conseil Canadien de Protection Animale
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CIPA	Comité Interprofessionnel des Produits de l'Agriculture
CRH	Corticotropin-releasing hormone
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FSBI	Fisheries Society of the British Isles
GR	Numération globulaire
HB/HGB	Taux d'hémoglobine
HR	Hazard Ratio
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
Ht	Hématocrite
IDX	Index
J	Jour
LD	Light/Dark (régime lumineux)
MS222	Méthanesulfonate de tricaine
P	Poisson
RBC	Numération globulaire
T	Temps
TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
VGM	Volume globulaire moyen
WBC	Numération leucocytaire

## Introduction

La France est le 4<sup>ème</sup> pays européen consommant le plus de poissons, avec une consommation moyenne de 32,56 kg/habitant et par an en 2022. Représentant une production nationale de 43 834 tonnes en 2022 (CIPA, 2023), la pisciculture d'eau douce contribue à une part non négligeable de l'apport en poissons pour la consommation française, la truite arc-en-ciel représentant le cœur de cette production. En effet, 96 % de la production nationale de poissons en eau douce concerne la truite arc-en-ciel, un des cinq poissons les plus consommés par les Français (Pisciculteurs de France, 2023).

La gestion d'un élevage nécessite une attention particulière aux agents pathogènes responsables de maladie, via l'utilisation de vaccins ou d'anti-infectieux. Afin de mieux répondre aux enjeux actuels, et notamment de lutter contre le développement de résistances aux antibiotiques, il est nécessaire de travailler sur les schémas posologiques ou les voies d'administration des médicaments. Déterminer de nouveaux protocoles pour ces médicaments nécessite de nouveaux projets en expérimentation animale. Bien souvent, la conduite de prélèvements sanguins multiples, ou sans euthanasie des animaux, permet des suivis longitudinaux plus informatifs, ce qui se traduit par une réduction du nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation (conformément à la règle des 3-R). Reste à définir la quantité de sang que l'on peut prélever sur le poisson. Actuellement, seule le CCPA (Conseil Canadien de protection animale) a édicté une ligne directrice concernant les prélèvements de sang sur le poisson dans le cadre de l'expérimentation animale. Il préconise un prélèvement de 0,1 % du poids vif total de l'animal, représentant 0,2 mL de sang pour une truite de 200 g. Selon les poids de départ des poissons étudiés et l'hétérogénéité des poids au sein du groupe, cela représente souvent une quantité trop faible de sang pour pouvoir mesurer la totalité des paramètres souhaités, ou pour faire des prélèvements répétés. Afin de proposer des études plus pertinentes et moins gourmandes en animaux, il est nécessaire de mieux comprendre l'impact de prélèvements sanguins sur l'homéostasie des poissons afin de déterminer de nouveaux seuils de prélèvements plus adaptés aux besoins de la recherche, comme cela a été fait, par exemple, chez la souris (Nahas *et al.*, 2000).

Cette étude propose donc d'évaluer l'influence de différentes stratégies de prélèvements sanguins sur les variables hématologiques chez des truites arc-en-ciel pesant entre 300g et 700g, mais également d'évaluer le temps de régénération sanguine dans les différentes conditions testées. Dans une première partie, nous explorerons les spécificités de l'hématologie chez les poissons puis, dans une seconde partie, nous étudierons l'impact de prélèvements sanguins de différents volumes réalisés selon deux modalités (prélèvements uniques ou répétés) ainsi que le temps de récupération associé.

**Partie 1 - Contexte Scientifique**

**Erythropoïèse, volémie, et les différents facteurs  
impliqués chez la truite arc-en-ciel  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

## I. Hématologie de la truite arc-en-ciel

### A. Le sang

#### a. Définition

Le sang est un fluide circulant dans les vaisseaux sanguins (veines, artères, capillaires) qui irrigue tous les tissus de l'organisme, en y apportant les éléments nutritifs et l'oxygène, et en y recueillant les déchets. Il est composé de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes en suspension dans le plasma (Atkins *et al.*, 2017).

#### b. Les globules rouges

Les globules rouges, aussi appelés érythrocytes ou hématies, sont des cellules qui transportent l'oxygène et le disséminent aux autres tissus de l'organisme. Ceci est possible grâce à un complexe constitué de 4 protéines particulières, synthétisées lors de la maturation des érythrocytes et capable de se lier à l'oxygène puis de le libérer aux tissus adéquats : l'hémoglobine. C'est donc cette hémoglobine qui confère aux globules rouges la capacité de transporter de l'O<sub>2</sub>, mais aussi leur couleur rouge (Adair *et al.*, 1925). Les globules rouges représentent la principale population cellulaire de sang.

#### c. Les globules blancs

Les globules blancs, aussi appelés leucocytes, sont des cellules nucléées qui participent au système immunitaire d'un individu. Ils sont présents dans le sang, la lymphe (un liquide biologique blanchâtre d'une composition analogue à celle du plasma), les organes lymphoïdes et dans certains tissus conjonctifs. Différents types de leucocytes existent et interagissent afin d'assurer une immunité complète (Ellis, 1977). On parle de leucocytose et de leucopénie pour désigner une augmentation ou une diminution de la numération leucocytaire.

#### d. Les plaquettes

Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des fragments cellulaires qui participent à la coagulation, phénomène d'agglomération des globules rouges permettant de former un caillot qui maintient l'intégrité du système vasculaire sous haute pression lors de lésions vasculaires. La thrombose est la formation d'un caillot sanguin (thrombus) à l'intérieur des vaisseaux pouvant entraîner des répercussions cliniques (Furie et Furie, 1988).

#### e. Le plasma

Le plasma correspond à la partie liquide du sang dans laquelle baignent les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Il est composé d'eau, d'hormones, d'éléments

nutritifs comme des vitamines, des lipides, des acides aminés, des glucides ou des sels minéraux, ainsi que de protéines dont certaines participent activement aux processus inflammatoires ou à la coagulation sanguine (Benjamin et McLaughlin, 2012).

## B. L'érythropoïèse chez la truite arc-en-ciel

### a. Définition

L'érythropoïèse correspond à l'ensemble des processus de production des globules rouges, à savoir la prolifération et la différenciation progressive de cellules souches hématopoïétiques en érythrocytes hémoglobinisés. L'érythropoïèse basale correspond à l'érythropoïèse destinée à remplacer les érythrocytes sénescents afin de maintenir une quantité d'érythrocytes stable, tandis que l'érythropoïèse de stress a lieu en réponse à un stimulus anémiant comme une hémorragie ou une hémolyse, une destruction parfois pathologique des globules rouges (Swardson, 2022).

### b. Organes érythropoïétiques

Plusieurs sites d'érythropoïèse se succèdent chez la truite arc-en-ciel. Dans les premiers stades de vie, les érythrocytes sont formés en premier lieu directement dans la circulation, puis dans le sac vitellin et enfin dans la masse cellulaire intermédiaire. Chez l'adulte, le pronéphros et la rate sont les sites érythropoïétiques principaux (Murad et Houston, 1991).

Chez la plupart des espèces appartenant à l'infra-classe des Téléostéens (poissons vertébrés), l'organe hématopoïétique dominant et le réservoir des cellules sanguines est le pronéphros, la partie antérieure des reins (Kondera, 2019). C'est un analogue fonctionnel de la moelle osseuse rouge chez les mammifères et les oiseaux. Une prolifération intense de cellules érythroïdes a lieu pendant la période larvaire au niveau du pronéphros, elle diminue par la suite chez les adultes (Soldatov, 2003).

Un autre organe impliqué dans l'érythropoïèse est la rate. Son implication dans l'érythropoïèse chez les salmonidés reste très discutée. Ainsi, aucune modification sanguine majeure n'a été notée par Murad et Houston en 1991 à la suite de splénectomies chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Pourtant, Lane note une récupération sanguine beaucoup plus difficile par suite d'un saignement de 12 % chez des truites arc-en-ciel ayant subi une splénectomie en comparaison avec des truites non opérées (Lane, 1978). Des travaux de Houston en 1996 ont également permis de démontrer l'implication de la rate dans l'érythropoïèse chez certains téléostéens comme les poissons rouges (Houston *et al.*, 1996b). Finalement, la rate serait un organe avec une activité érythropoïétique nettement inférieure à celle présente au niveau du pronéphros (Stern, 2022).

D'autres sites érythropoïétiques mineurs ont également été rapportés chez la truite arc-en-ciel, comme la moelle osseuse (Vermeulen et Kaiser, 2008).

### c. Erythropoïèse primitive et définitive

Deux phases d'érythropoïèse se succèdent au cours du développement : l'érythropoïèse primitive et l'érythropoïèse définitive. Ces deux phases sont présentes chez les poissons comme chez les mammifères, quoique les organes érythropoïétiques diffèrent. Par ailleurs, les érythrocytes des poissons conservent un noyau, contrairement à ceux des mammifères.

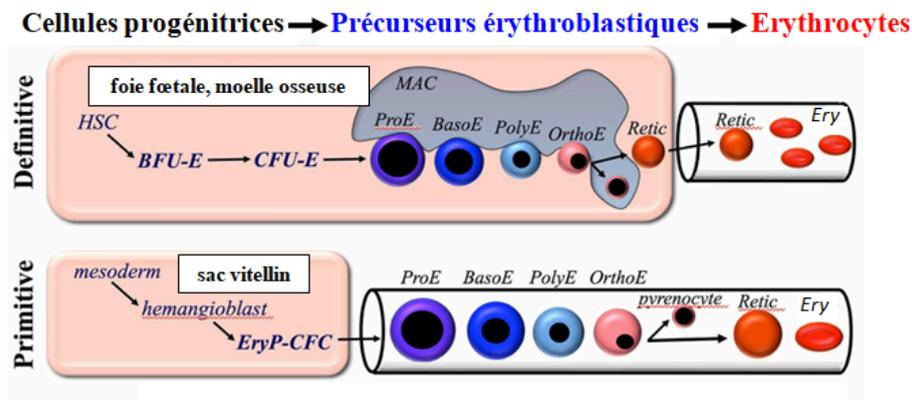


Figure 1 : Différences entre l'érythropoïèse primitive et définitive chez les mammifères (Palis, 2014)  
Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) ou hémangioblastes (primitive) permettent de créer les cellules progénitrices (BFU-E, CFU-E ou EryP-CFC en primitive) qui se différencient en proérythroblast, en érythroblast basophile, en érythroblast polychromatophile, en érythroblast orthochromatophile (acidophile), puis en réticulocyte et en érythrocyte.

L'érythropoïèse primitive a lieu pendant la phase embryonnaire, et se caractérise par une libération de précurseurs érythroïdes dans la circulation sanguine qui vont y poursuivre leur maturation (Palis, 2014).

Elle commence au niveau des îlots sanguins du sac vitellin deux jours après la fécondation. Sept jours après la fécondation, l'érythropoïèse bascule au niveau de la masse cellulaire intermédiaire et s'intensifie. Les proérythroblast s'y forment, prolifèrent puis rentrent dans la circulation sanguine. Ils colonisent alors le pronéphros en entourant les vaisseaux situés entre les glomérules et les tubules rénaux, structures qui permettent la formation de l'urine (Stern, 2022).

Au cours du développement larvaire, l'érythropoïèse définitive débute. Elle continuera pendant la fin du développement et se poursuivra à l'état d'alevin, de juvénile puis d'adulte. Contrairement à l'érythropoïèse primitive, elle se caractérise par une maturation des précurseurs au sein des organes érythropoïétiques, suivie par une libération d'érythrocytes matures dans la circulation sanguine (Palis, 2014).

#### d. Cellules de la lignée érythrocytaire

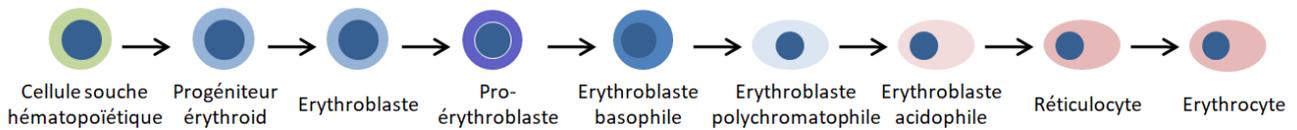
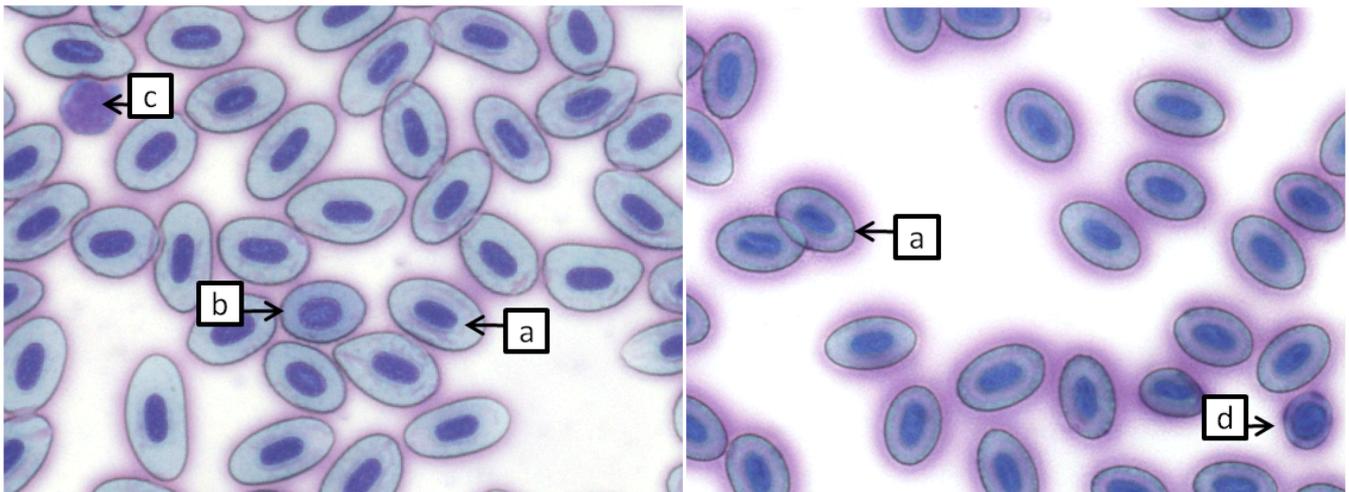


Figure 2 : Les étapes de l'érythropoïèse chez le poisson, inspiré des travaux de Kulkeaw et Sugiyama (2012), Soldatov (2023) et Stern (2022)

Comme chez les mammifères, la lignée érythrocytaire des poissons suit plusieurs étapes de différenciation à partir des cellules souches hématopoïétiques. Celles-ci se différencient en progéniteurs érythroïdes, qui eux-mêmes se différencient par la suite en érythroblastes. C'est à partir de ce stade proérythroblaste, que les cellules précurseurs des érythrocytes sont différenciables, plutôt rondes avec un cytoplasme bleu foncé de taille importante. L'érythroblaste basophile quant à lui plus petit, conserve son cytoplasme bleu mais est légèrement ovale, tandis que l'érythroblaste polychromatophile aura un cytoplasme plus clair tout en étant légèrement plus allongé que le basophile. L'érythroblaste polychromatophile est la dernière cellule de l'érythropoïèse capable de réaliser une mitose, soit une division cellulaire. Enfin l'érythroblaste acidophile est la première cellule à présenter un cytoplasme rosé, témoin de l'accumulation d'hémoglobine, qui se foncera légèrement lors de la maturation en érythrocyte. Bien qu'il soit séparé par très peu de différences morphologiques, l'érythroblaste acidophile se différencie en réticulocytes avant de devenir un érythrocyte. Au cours de cette maturation, la chromatine se condense provoquant une diminution de la taille du noyau. Une diminution de la quantité de ribosomes libres dans le cytoplasme est également constatée (Soldatov, 2003 ; To et Villatoro, 2019).

La durée de l'érythropoïèse serait, par ailleurs, liée aux conditions environnementales, notamment la concentration en dioxygène ou en dioxyde de carbone (Härdig *et al.*, 1978).



*Figure 3 : Photographies de frottis sanguins héparinés chez la truite arc-en-ciel, réalisées au microscope à LabOniris sur deux poissons de la présente étude (objectif x60). a. érythrocyte. b. érythroblaste polychromatophile. c. lymphocyte. d. érythroblaste basophile.*

Les érythrocytes des salmonidés sont ellipsoïdes avec un cytoplasme éosinophile pâle abondant avec un noyau central ovale. En effet, contrairement aux érythrocytes des mammifères, les érythrocytes de poissons conservent leur noyau au cours de leur maturation. Le cytoplasme est la plupart du temps rose pâle et homogène, mais celui-ci peut parfois présenter des zones plus claires liées à de la dégénérescence d'organites, il est physiologique de retrouver de l'anisocytose et de la polychromasie, soit une différence de taille et de couleur des érythrocytes présents, lors d'un frottis sanguin de salmonidé. Chez un salmonidé sain, les réticulocytes représentent moins de 5 % des globules rouges, et les érythrocytes immatures (proérythroblastes, érythroblastes basophiles, érythroblastes polychromatiques) moins de 1 % des globules rouges lors d'une prise de sang (Stern, 2022).

L'érythropoïèse est un processus complexe dans lequel plusieurs acteurs interviennent chez la truite arc-en-ciel, à savoir principalement le pronéphros et la rate. La maturation d'un érythrocyte se fait en de nombreuses étapes qui ne sont pas toujours différenciables morphologiquement. Si ces étapes de maturation peuvent être semblables à celles des érythrocytes de mammifères, les érythrocytes des poissons conservent leur noyau à la fin de leur maturation, à la différence de ceux des mammifères.

## C. Les érythrocytes au sein de l'organisme

### a. La respiration chez les téléostéens

Afin de s'adapter au milieu aquatique, les poissons sont munis d'un système respiratoire différent de celui des mammifères. Sous leurs deux opercules, plaques osseuses situées de part et d'autre de la tête, se trouve un orifice permettant des flux d'eau et quatre arcs branchiaux formant les branchies. Ces arcs branchiaux sont composés d'un squelette osseux et de deux lames branchiales, elles-mêmes composées d'une multitude de lamelles branchiales situées sur des filaments. Les lamelles branchiales peuvent être décrites comme un vaisseau sanguin unique aplati à l'extrême dans lequel le sang n'est séparé de l'eau environnante que par deux couches cellulaires, représentant une épaisseur de 0,5 - 5  $\mu\text{m}$ . Au total, les lamelles permettent d'atteindre une surface de contact de l'épithélium branchial avec l'eau d'environ 2  $\text{cm}^2/\text{g}$  chez la truite, soit 10 - 60 fois la surface totale de la peau du poisson. Ces structures sont analogues aux alvéoles pulmonaires chez les vertébrés terrestres, représentant une surface d'absorption de l'oxygène comparable (De Kinkelin *et al.*, 2018).

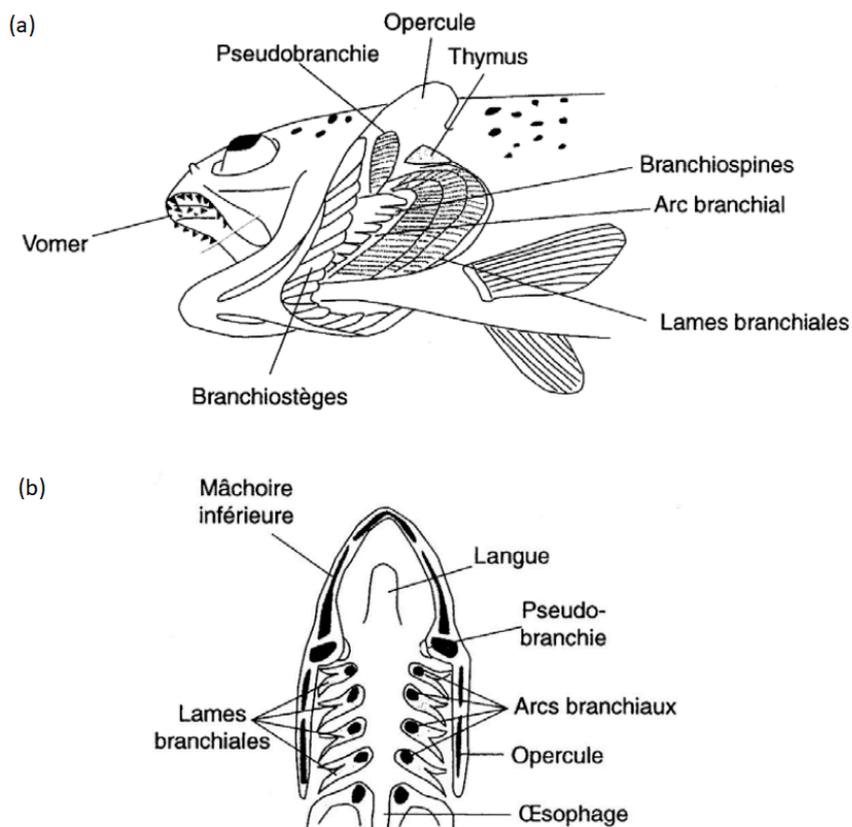


Figure 4 : Dessins schématiques de la cavité branchiale et des branchies d'une truite arc-en-ciel montrant (a) une vue d'ensemble et (b) une coupe frontale passant par le maxillaire inférieur et les arcs branchiaux. (De Kinkelin *et al.*, 2018)

L'eau circule en passant par la cavité buccale, puis ressort par l'orifice sous l'opercule en passant par les branchies. Deux systèmes de pompe au niveau de la cavité buccale, puis de l'opercule permettent par différences de pression d'augmenter la pression du flux d'eau sortant (Hughes et Morgan, 1973).

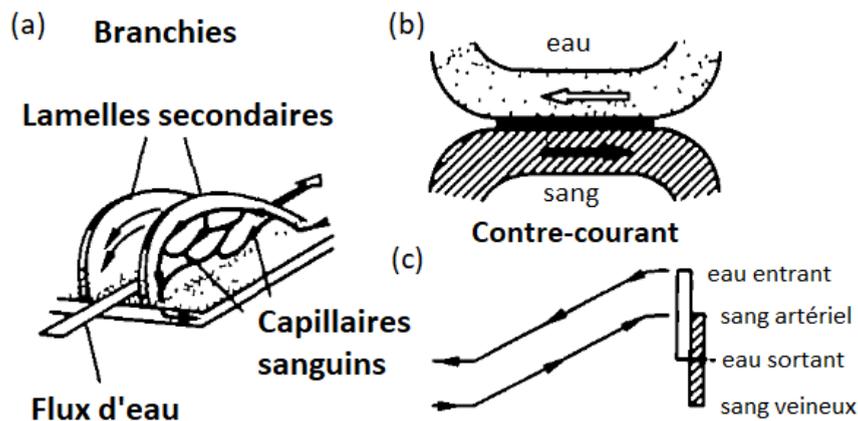


Figure 5 : Dessins schématiques de la respiration branchiale ainsi que ses échanges de gaz : (a) anatomie schématique, (b) modèle des flux et (c) profils de pression partielle de l' $O_2$  dans l'eau (en haut) et dans le sang (en bas) (Piiper, 1982)

Le flux de l'eau est à contre-sens du flux sanguin, ce qui maintient un fort différentiel de concentration en oxygène entre l'eau et le sang, favorable à sa bonne captation par l'animal. Ainsi, l'eau entrant au contact des branchies et la plus riche en dioxygène va être en contact avec les vaisseaux efférents, des vaisseaux qui partent des lamelles branchiales pour rejoindre la circulation générale. Les globules rouges ont déjà commencé à se charger en oxygène depuis leur arrivée par les artères afférentes et, lors de la traversée des branchies, vont pouvoir compléter leur contenu en  $O_2$  à proximité de l'eau plus riche en  $O_2$  au niveau des artères efférentes. Par ce moyen, les érythrocytes récupèrent le maximum d'oxygène avant de repartir dans la circulation systémique du poisson (Hughes et Morgan, 1973).

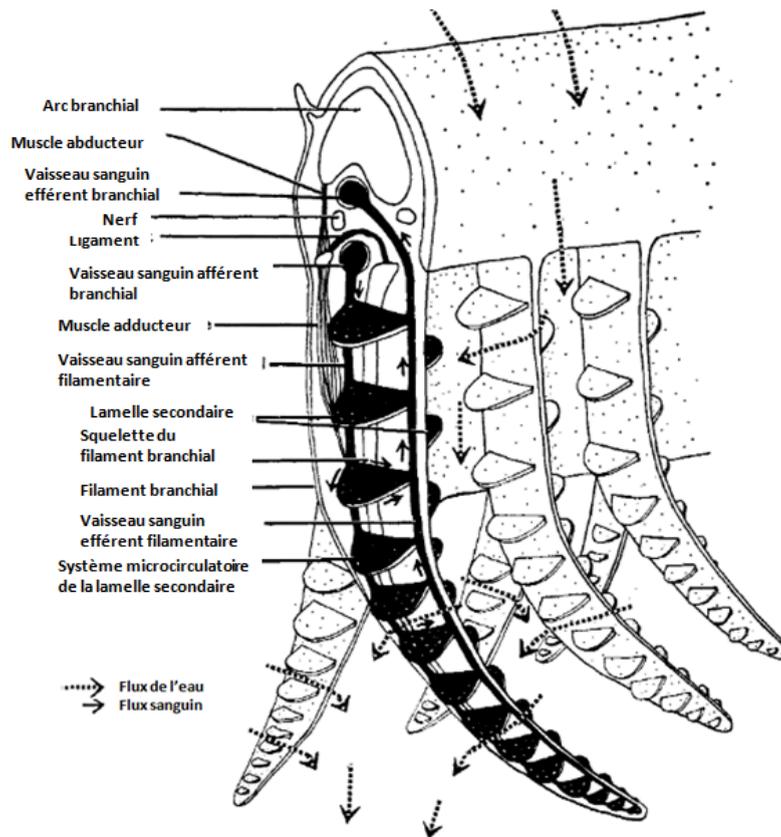


Figure 6 : Dessin schématique d'une portion d'arc branchial chez un téléostéen (Hughes et Morgan, 1973)

#### b. Rôle de l'hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine composée de quatre chaînes polypeptidiques associées chacune à un groupe prosthétique, l'hème. Transportée dans le cytoplasme des érythrocytes, la fonction principale de l'hémoglobine est de transporter le dioxygène ( $O_2$ ) depuis les organes échangeurs de gaz, les branchies, jusqu'aux tissus périphériques. Sa liaison à l' $O_2$  est réversible, afin de pouvoir le relarguer lorsque la pression partielle diminue. L'hémoglobine se lie également au dioxyde de carbone ( $CO_2$ ), au niveau des tissus périphériques, et le transporte jusqu'aux branchies afin de l'éliminer. L'affinité de l'hémoglobine pour l' $O_2$  ou le  $CO_2$  dépend de ses deux conformations possibles, dépendantes des contraintes environnementales dans lesquelles elle se trouve. Dans les branchies, elle va préférentiellement se lier à l' $O_2$  et libérer du  $CO_2$ . Dans le reste de l'organisme, c'est plutôt le schéma inverse qui s'opère (Souza et Bonilla-Rodriguez, 2007).

Chez les poissons, il existe plusieurs hémoglobines isomorphes, c'est-à-dire des hémoglobines ayant la même structure mais de conformation différente. De multiples isomorphes sont présents au sein de la circulation sanguine d'un même poisson et, selon les contraintes du

milieu, les concentrations de ces isomorphes sont modulées afin de permettre une adaptation optimale. En effet, certains isomorphes ont des pH de préférence (Souza et Bonilla-Rodriguez, 2007), ou encore une affinité plus élevée à l'O<sub>2</sub> permettant de compenser un milieu hypoxique par exemple (Murad *et al.*, 1990). L'hémoglobine joue donc un rôle clé pour fournir de l'O<sub>2</sub> aux tissus périphériques tout en s'adaptant aux conditions du milieu.

#### c. Impact de l'anémie et de la polyglobulie

L'anémie est définie comme une concentration d'hémoglobine, le composant principal des érythrocytes, en dessous du seuil de référence pour une population saine donnée (Northrop-Clewes et Thurnham, 2013). Les poissons sont des animaux poïkilothermes, c'est-à-dire dont la température interne dépend de la température de leur milieu ambiant. Pour les poissons, les valeurs hématologiques de référence, dont le taux d'hémoglobine, dépendent des conditions de vie des animaux, notamment la température moyenne de l'eau. L'anémie chez les poissons serait donc caractérisée par une diminution importante du taux d'hémoglobine dans le sang, en comparaison à des valeurs obtenues chez un groupe de référence élevé dans les mêmes conditions environnementales. Les causes de l'anémie peuvent être variées : une érythropoïèse perturbée, une augmentation de l'hémolyse (destruction des érythrocytes), ou encore des pertes sanguines importantes (hémorragie). Une diminution de la concentration sanguine en hémoglobine provoque une baisse des capacités d'apport en O<sub>2</sub>, ce qui impacte le métabolisme du poisson. Afin de limiter cet impact, les poissons peuvent s'adapter par différents moyens : gonflement des globules rouges, synthèse d'hémoglobine par les cellules circulantes elles-mêmes, libération des réserves érythrocytaires par la rate ou le pronéphros, ou encore stimulation de l'érythropoïèse (Witeska, 2015).

La polyglobulie correspond à une augmentation de la quantité d'érythrocytes dans le sang par rapport à une valeur de référence. Lors de polyglobulie, la viscosité du sang augmente. Cette dernière va impacter la circulation sanguine en augmentant la résistance périphérique au niveau des vaisseaux, à l'origine d'hypertension vasculaire. En réponse, l'organisme va dilater les vaisseaux (vasodilatation) pour diminuer la pression sanguine (Sriram *et al.*, 2012). Cette vasodilatation permet de limiter le retour veineux et d'engendrer une diminution du débit cardiaque (Crowell et Smith, 1967; Gallagher *et al.*, 1995).

#### d. Contraction splénique en réponse à un stress

Comme énoncé précédemment, la rate est le deuxième organe érythropoïétique chez la truite arc-en-ciel. Si son rôle apparaît moins prépondérant que le pronéphros en ce qui concerne l'érythropoïèse, celle-ci joue cependant un rôle de régulation majeur de la quantité d'érythrocytes circulants. En effet, sous l'effet de certaines molécules comme l'adrénaline, hormone associée au stress ou à l'épuisement, la rate se contracte et libère des globules rouges matures dans le sang (Fänge et Nilsson, 1985). Pearson et Stevens, en 1991, ont démontré que l'ampleur de la contraction de la rate dépend de l'intensité du stress. La rate contient l'équivalent de 20 % de la

capacité de transport en O<sub>2</sub>, et peut en libérer 90 % en une à trois minutes. Lors d'un stress anémique, cet organe, en synergie avec le pronéphros, va assurer un renouvellement rapide des érythrocytes perdus (Houston *et al.*, 1996b).

#### e. Gonflement des érythrocytes

Un gonflement des érythrocytes peut survenir dans certaines conditions, telles qu'un milieu pauvre en potassium ou riche en sodium, ce qui a été démontré notamment sur des érythrocytes nucléés d'oiseaux et de téléostéens (incluant la truite arc-en-ciel) (Nikinmaa *et al.*, 1984). Ce gonflement engendre une alcalinisation du cytoplasme érythrocytaire, et une acidification du plasma.

La pompe responsable de ces modifications est une pompe H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, une protéine membranaire, qui introduit dans la cellule un ion sodium, tout en faisant sortir un proton (Nikinmaa, 2001). Le cytoplasme enrichi en sodium va se charger en eau par phénomène osmotique, ce qui fait gonfler la cellule (Witeska, 2005). L'augmentation du pH cytoplasmique augmente l'affinité entre l'hémoglobine et l'O<sub>2</sub>, améliorant ainsi la capacité de transport de l'oxygène par les érythrocytes (Witeska, 2015). Ce gonflement des érythrocytes reste un processus qui intervient sous l'influence de différents stress, comme une anémie ou une exposition à des métaux lourds (Witeska, 2005). En cas d'injection d'adrénaline ou de stress à l'origine d'une libération d'adrénaline endogène, le gonflement des érythrocytes peut mener à une augmentation du volume des érythrocytes de presque 16 % chez la truite arc-en ciel (Nikinmaa, 1982).

#### f. Système vasculaire secondaire

Ce qui fut longtemps perçu chez les téléostéens comme un système lymphatique analogue à celui des mammifères a été décrit par la suite comme un système vasculaire secondaire, par opposition au système vasculaire primaire classiquement dénommé la circulation principale. Le système vasculaire secondaire débute par des abouchements entre les artères primaires et les artères secondaires, appelés des anastomoses inter-artérielles. Ces anastomoses ont été trouvées au niveau de l'aorte et de certaines artères du tronc et de la queue (Steffensen *et al.*, 1986). Les artères secondaires, plus petites que les primaires, vont ensuite réaliser des trajets en parallèle aux artères primaires, et aboutir à des lits capillaires secondaires situés au niveau de la peau, des nageoires, de la cavité buccale, du pharynx et du péritoine. L'hématocrite du contenu du système secondaire, correspondant à la proportion d'érythrocytes de ce contenu, serait de 0,5 - 1,7 % (Ishimatsu *et al.*, 1992), reflétant une composition riche en plasma et faible en érythrocytes en comparaison à la circulation primaire (Steffensen et Lomholt, 1992).

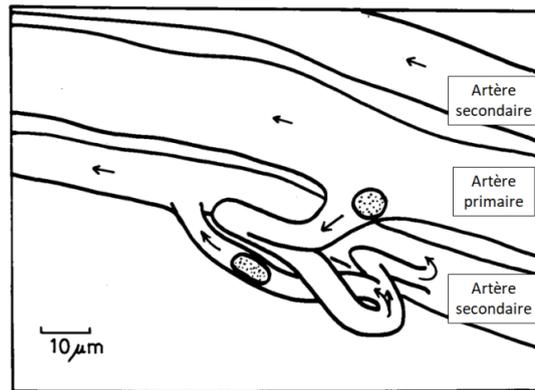


Figure 7 : Dessin schématique d'un trajet d'érythrocyte entre la circulation primaire et secondaire, visualisé préalablement par vidéo (Steffensen et al. 1986)

En cas d'expansion ou de diminution brutale du volume de la circulation primaire, la volémie est rapidement restaurée à des valeurs usuelles (en 60 - 90 minutes). La circulation secondaire agirait comme une circulation permettant de stocker ou de libérer du plasma selon la pression de la circulation primaire par filtration plasmatique entre les deux circulations (Olson et al., 2003).

De plus, cette circulation secondaire pourrait participer dans des échanges ioniques avec la circulation primaire régulant l'équilibre acido-basique des deux circulations. En effet, en cas d'hypercapnie, soit une augmentation de la pression partielle en  $\text{CO}_2$  dans le milieu, le pH auparavant identique entre les deux circulations devient supérieur au sein de la circulation secondaire par rapport à celui de la circulation primaire. Les échanges d'ions entre ces deux circulations, et notamment de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{HCO}_3^-$ , permettent de renforcer l'acidification du plasma de la circulation primaire et l'alcalinisation du cytoplasme des érythrocytes, augmentant ainsi davantage l'affinité entre l'hémoglobine et l' $\text{O}_2$  afin de parer au manque d' $\text{O}_2$  dans le milieu (Ishimatsu et al., 1992).

L'intérêt évolutif principal du système vasculaire secondaire resterait toutefois une optimisation de la respiration des poissons en cas de milieu hypoxique. En effet, en plus de la respiration branchiale, cette seconde circulation située à la surface de la peau et des nageoires permettrait des échanges directs d' $\text{O}_2$  au niveau de ces localisations par redirection d'érythrocytes au sein de cette circulation, maximisant ainsi les apports en  $\text{O}_2$  (Panara et al., 2024).

Le système respiratoire des poissons est optimisé pour exploiter leur environnement aquatique, c'est-à-dire un milieu potentiellement pauvre en  $\text{O}_2$ . De nombreux mécanismes permettent de maximiser la capacité de transport de l' $\text{O}_2$  par les érythrocytes, leur conférant une aptitude d'adaptation à de nombreuses altérations de leur environnement ou de leur organisme.

## D. Méthodes de prélèvement sanguin

Deux types de prélèvement sont possibles chez les poissons, le premier consiste à prélever un volume de sang en une fois, le deuxième consiste à répéter ces prélèvements, par une voie d'accès fixe ou non.

### a. Prélèvement simple

#### 1. Condition du poisson lors de la prise de sang

Si certains prélèvements sanguins sont réalisés sur poissons vigiles, la plupart sont réalisés sur poissons anesthésiés. Chaque manipulation et modification de l'environnement d'un poisson participe au stress ressenti. Afin de limiter ce stress, il est nécessaire de réduire la quantité et la durée des manipulations, mais une composante individuelle impacte toujours et peut compliquer la reproductibilité des prélèvements.

L'anesthésie permet de limiter la contention lors du prélèvement et de réduire le stress associé, mais celle-ci occasionne également une dépression respiratoire limitant la quantité d'oxygène transportée jusqu'aux tissus, provoquant une diminution de la saturation en oxygène du sang et une augmentation de la saturation en dioxyde de carbone. Autrement dit, l'anesthésie peut causer une hypoxie, c'est-à-dire un stress respiratoire. Si ce stress est moindre en comparaison à une manipulation vigile, il reste néanmoins présent (Thomas, 1991). Ce stress anesthésique peut modifier certaines variables hématologiques. Par exemple, Iwama *et al.* en 1989 ont mis en évidence une augmentation de la concentration d'adrénaline dans le sang, accompagnée d'une augmentation de l'hématocrite dans leur étude sur les variations sanguines liées à cinq anesthésiants différents.

Par ailleurs, l'anesthésie augmente le temps de manipulation avec une phase de réveil nécessaire, créant une contrainte supplémentaire lors d'expérimentations animales (Lawrence *et al.*, 2020).

Différentes méthodes d'anesthésie ont été étudiées. La plus courante est l'immersion du poisson dans de l'eau contenant des principes actifs anesthésiants, processus analogue à l'inhalation de gaz anesthésiants chez les animaux terrestres. Neiffer et Stamper (2009) ont recensé et comparé dans une étude l'ensemble des agents anesthésiants chez les poissons, dont les plus courants sont le méthanesulfonate de tricaïne (MS-222), l'huile de clou de girofle et la benzocaïne. D'autres méthodes d'anesthésie existent mais demeurent moins utilisées. C'est le cas de l'électro immobilisation (Reid *et al.*, 2019) ou encore de l'altération de l'environnement physique (chute de température, CO<sub>2</sub> ... (Erikson, 2008; Roth *et al.*, 2009)).

## 2. Localisation du prélèvement

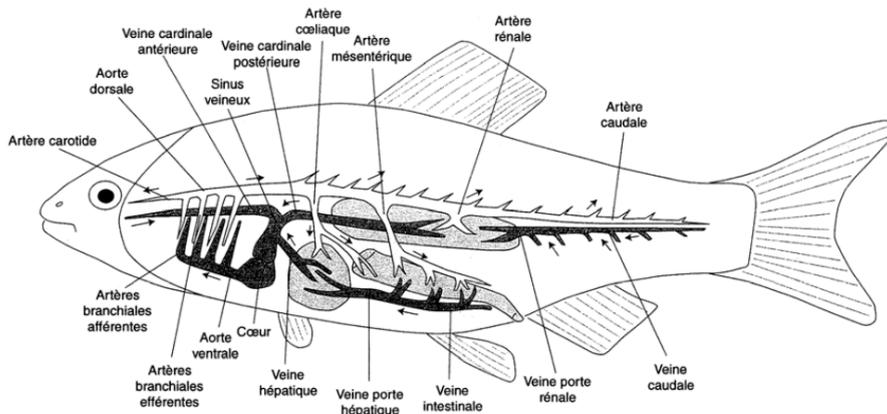


Figure 8 : Dessin schématique de l'appareil circulatoire d'un poisson téléostéen (De Kinkelin et al., 2019)



Figure 9 : Les différents sites de prélèvements sanguins chez le poisson à travers l'exemple de la truite arc-en-ciel, photographie réalisée par A. Rostang, 2023

Différents sites de prélèvement existent chez les poissons. Le sinus veineux caudal, qui est le site de prélèvement le plus courant, permet de limiter le stress du poisson lors de la prise de sang et est réalisable sur la plupart des poissons ayant un poids supérieur à 20 g. Il peut être accessible à différents niveaux : par un abord ventral en arrière de l'anus [N°4 sur la figure 9], par un abord latéral sous la ligne latérale entre l'anus et la nageoire caudale [N°5 sur la figure 9], ou par un abord latéral à l'intersection de la ligne latérale du poisson (1 mm en dessous) et de la ligne virtuelle reliant la base arrière de la nageoire dorsale à l'anus [N°3 sur la figure 9].

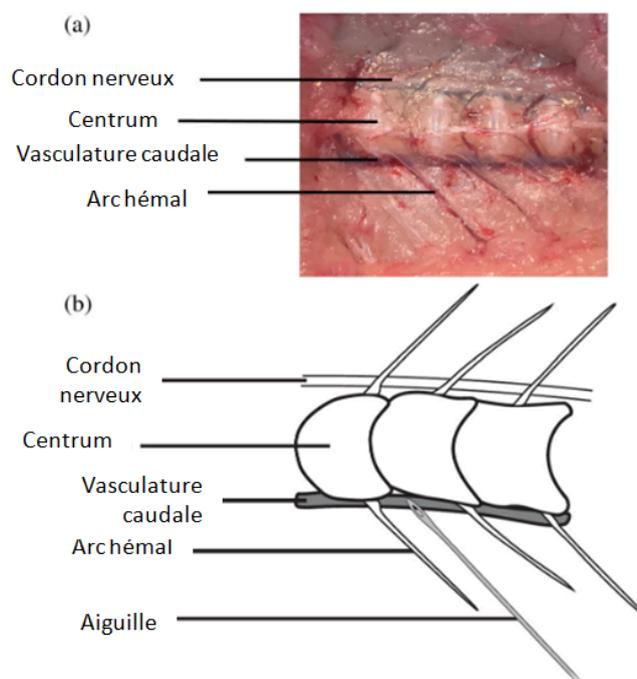


Figure 10 : (a) Anatomie interne de la vasculature caudale et des structures associées chez un achigan à grande bouche (*Micropterus salmoides* ; Lacépède, 1802) et (b) dessin schématisique de la vasculature caudale avec le placement de l'aiguille prélevant du sang, photographie réalisée par Alice Abrams et Paul Parson (Lawrence et al., 2020)

La veine caudale peut également être atteinte par saignement suite à l'ablation de la queue, ce qui est peu réalisé en expérimentation animale pour des raisons éthiques évidentes, mais parfois nécessaire pour des poissons pesant moins de 20 g (Duman et al., 2019).

Le prélèvement cardiaque ventriculaire permet de prélever des volumes de sang plus importants [N°2 sur la figure 9]. Il s'effectue au niveau de la *linea alba*, une indentation qui se situe le long de la ligne médiale ventrale lors de son insertion entre les nageoires pectorales. Ce prélèvement présente un risque élevé car les contractions cardiaques peuvent causer des ponctions supplémentaires, notamment au niveau du bulbe artériel cardiaque. Il n'est pas recommandé sur les poissons de poids supérieur à 400 g.

Un prélèvement de l'aorte dorsale ou de l'aorte ventrale [N°1 sur la figure 9] est également possible bien que moins pratique (CCPA, 2004). En effet, il implique de réaliser le prélèvement par voie buccale, et nécessite donc une contention plus importante pour maintenir le poisson en équilibre sur le dos ou sur le ventre, bouche ouverte. Ces prélèvements causent par ailleurs des taux de mortalité plus élevés car ils créent une ponction dans une zone où le sang est le plus sous pression (Black, 2000 ; Duman et al., 2019).

## b. Prélèvement en série

### 1. Pose d'un cathéter

Afin de pouvoir réaliser plus facilement des prélèvements sériés, en limitant l'impact pour le poisson prélevé, des cathéters peuvent être mis en place. Ils sont placés le plus fréquemment au niveau de l'artère dorsale, mais également au niveau de l'artère ventrale, de la veine caudale ou d'autres vaisseaux isolés comme l'artère mésentérique. Cette procédure se réalise sous anesthésie profonde, sur des poissons de poids supérieur à 200 g, avec la possibilité d'avoir des poissons immobilisés ou mobiles au réveil avec le cathéter en place. La pose d'un cathéter est rapide pouvant être réalisée en 5 minutes, et peut permettre des prélèvements répétés pendant plusieurs semaines (Black, 2000).

Si cette méthode permet de faciliter les prélèvements et de limiter les lésions liées à des ponctions répétées, elle présente toutefois un risque non négligeable d'anémie par suite de pertes sanguines lors de la procédure de mise en place, ou lors de fuites au niveau du lieu d'insertion du cathéter. Par ailleurs, laisser un cathéter en place laisse une voie d'entrée pour divers agents pathogènes produisant un risque infectieux non négligeable (Perry et Tufts, 1998). L'inflammation locale issue de la mise en place du cathéter peut prendre jusqu'à 28 jours pour cicatriser, et il y a nécessité de maintenir les poissons en cuves individuellement afin de limiter tout déplacement ou décrochage du cathéter, notamment à cause des interactions entre les poissons (McLean et Ash, 1989).

À la suite de la pose d'un cathéter, les poissons peuvent être mobiles isolés dans un bac, ou restraints dans des réceptacles dédiés avec un flux d'eau suffisant (Soivio et Nynolm, 1975). La présence d'une eau circulante au niveau du réceptacle est nécessaire à un apport en oxygène suffisant (Heath, 1971).

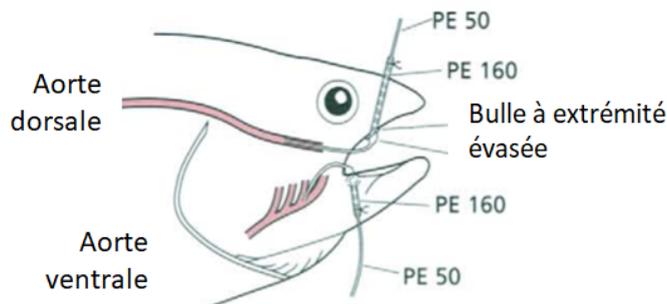


Figure 11 : Dessin schématique montrant la position des cathéters insérés dans l'aorte dorsale et dans l'aorte ventrale (Black, 2000)

## 2. Prélèvements sanguins en série sous anesthésie au niveau de la veine caudale

Il est également possible de réaliser des prélèvements en série, sans recourir à une procédure invasive comme la pose d'un cathéter. Le sinus veineux caudal est privilégié pour les ponctions répétées. En effet, ce site de prélèvement présente moins de risques de complications que le prélèvement cardiaque ou aortique. Un prélèvement sanguin peut toujours causer des lésions plus ou moins importantes au niveau du site de prélèvement (lésions de la peau, arrachage d'écailles, lésions musculaires, lésions vasculaires, hématomes, etc...). Répéter les prélèvements augmente donc le risque de lésions tout en freinant les processus de cicatrisation à chaque ponction. Ceci peut également favoriser une atteinte bactérienne ou fongique de la zone et avoir un impact sur l'état général des poissons. Si des prélèvements en série sont possibles, et représentent certains avantages, il faut cependant faire attention aux lésions locales répétées que cela engendre, très peu mentionnées dans les différentes études.

## 3. Remplacement du volume prélevé

La volémie est le volume total de sang circulant dans l'organisme. Afin de parer au risque d'hypovolémie, il est possible de remplacer le volume prélevé par un autre substrat. Ainsi, Casillas et Smith, en 1977, ont utilisé du sérum physiologique dans leur étude pour combler les volumes de sang prélevés, limitant le choc hypovolémique mais favorisant l'hémodilution. En 1995, Gallagher *et al.* ont créé des états d'anémie ou de polyglobulie chez des truites arc-en-ciel en réalisant des transfusions de plasma ou de sang à partir de poissons donneurs. Ces méthodes permettent de s'affranchir du risque d'un choc hypovolémique mais restent peu utilisées dans les études.

## II. Grandeurs utilisées en hématologie pour la lignée rouge, valeurs de référence et facteurs de variation

### A. Variables hématologiques d'intérêt

#### a. La numération globulaire (GR)

La numération globulaire, ou numération des hématies ou érythrocytaire, correspondant à la concentration d'érythrocytes dans le sang, est la première donnée d'une numération sanguine. Chez la truite arc-en-ciel, la numération globulaire varie selon la qualité de l'eau dans laquelle vit le poisson (température, pH, pression en O<sub>2</sub> notamment), mais également selon l'âge, le poids ou le sexe des animaux, les concentrations en érythrocytes étant légèrement plus faibles chez les femelles (Řehulka *et al.*, 2004 ; Nabi *et al.*, 2022).

*Tableau I : Intervalles ou valeurs moyennes de la numération globulaire chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales*

Référence	Poids (moyenne ± écart-type)	Sexe (F/M)	pH	Température	Photopériode (Lumière / Obscurité)	GR
Morgan <i>et al.</i> , 2008	125 g 240 g	F F		13 - 14 °C 2 °C	LD 16 : 8 LD 8 : 16	1,4.10 <sup>6</sup> /μL 0,8.10 <sup>6</sup> /μL
McCarthy <i>et al.</i> , 1973	227 - 255 g	M et F	7,8 - 8,3	6 °C	-	0,71 - 1,73.10 <sup>6</sup> /μL
Řehulka <i>et al.</i> , 2004	330 ± 131 g	F (immatures) M	6,4 - 7,4	0,2 - 16 °C	LD 9 - 13 : 11 - 15	0,77 - 1,42.10 <sup>6</sup> /μL 0,98 - 1,55.10 <sup>6</sup> /μL
Nabi <i>et al.</i> , 2022	131 ± 27 g 385 ± 37 g 385 ± 37 g	M et F M F	7,22 - 7,86	8,2 - 14,2 °C	-	1,16 ± 0,08.10 <sup>6</sup> /μL 1,92 ± 0,16.10 <sup>6</sup> /μL 1,73 ± 0,20.10 <sup>6</sup> /μL
Mise Yonar, 2019	33,7 ± 2,4 g	M et F	7,4 - 7,8	15 ± 1 °C	-	1,56 ± 0,07.10 <sup>6</sup> /μL
Yonar <i>et al.</i> , 2019	31,3 ± 1,2g	M et F	7,4 - 7,8	16 ± 1 °C	-	1,60 ± 0,03.10 <sup>6</sup> /μL
Lone <i>et al.</i> , 2012	33 g 64 g 166 g	M et F	7,5 7,3 7,6	18 °C 18 °C 20 °C	-	3,33.10 <sup>6</sup> /μL 4,05.10 <sup>6</sup> /μL 3,68.10 <sup>6</sup> /μL

La numération globulaire de truites non sexées pesant plus de 200 g à une température de 14 - 16 °C serait ainsi entre  $0,77 \cdot 10^6/\mu\text{L}$  et  $1,92 \pm 0,16 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ . Une étude préliminaire a été conduite à la station aquacole d'Oniris afin d'évaluer les variables hématologiques de neuf truites arc-en-ciel triploïdes d'environ 300 g à une température d'environ 16 °C. La numération globulaire oscillait entre  $0,66$  et  $0,81 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ , soit un intervalle de valeurs inférieur à ceux enregistrés dans de nombreuses études.

#### b. L'hématocrite (Ht)

L'hématocrite correspond à la proportion d'érythrocytes au sein d'un volume sanguin et est exprimé par un pourcentage (Grant, 2015). La méthode de référence pour mesurer l'hématocrite correspond à la réalisation de la mesure manuellement sur capillaire à micro-hématocrite centrifugé. S'il demeure possible de réaliser cette mesure avec un automate, la valeur est généralement 1-3 % inférieure à celle obtenue à la suite d'une centrifugation en raison du plasma coincé entre les érythrocytes. L'analyse par des automates utilise des méthodes indirectes pour calculer l'hématocrite, ne nécessitant pas de séparation physique des composants sanguins (Gebretsadkan, 2015). L'hématocrite est variable d'une espèce à l'autre. Chez les êtres humains par exemple, l'hématocrite variera généralement entre 35-49 % à l'état physiologique (Gebretsadkan, 2015).

*Tableau II : Intervalles ou valeurs moyennes de l'hématocrite chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales*

Référence	Poids (moyenne $\pm$ écart-type)	Sexe (F/M)	pH	Température	Photopériode (Lumière / Obscurité)	Ht
McCarthy <i>et al.</i> , 1973	227 - 255 g	M et F	7,8 - 8,3	6 °C	-	30 - 49 %
Řehulka <i>et al.</i> , 2004	330 $\pm$ 131 g	F (immatures) M	6,4 - 7,4	0,2 - 16 °C	LD 9 - 13 : 11 - 15	30 - 50 % 34 - 54 %
Nabi <i>et al.</i> , 2022	131 $\pm$ 27 g 385 $\pm$ 37 g 385 $\pm$ 37 g	M et F M F	7,22 - 7,86	8,2 - 14,2 °C	-	31,4 $\pm$ 1,5 % 37,7 $\pm$ 1,4 % 35,1 $\pm$ 2,3 %
Mise Yonar, 2019	33,7 $\pm$ 2,4 g	M et F	7,4 - 7,8	15 $\pm$ 1 °C	-	32,6 $\pm$ 2,3 %
Yonar <i>et al.</i> , 2019	31,3 $\pm$ 1,2 g	M et F	7,4 - 7,8	16 $\pm$ 1 °C	-	34,3 $\pm$ 2,1 %

Lone <i>et al.</i> , 2012	33 g	-	7,5	18 °C	-	26 %
	64 g		7,3	18 °C		35 %
	166 g		7,6	20 °C		32 %
Gallaugher <i>et al.</i> , 1995	500 ± 9 g	-	-	12 - 14 °C	-	26,3 %
	500 ± 9 g			4 - 6 °C		32,5 %

Étant sujet à de nombreux facteurs de variabilité, l'hématocrite habituel chez les téléostéens varie entre 20 % et 45 % (Grant, 2015). Chaque espèce a un intervalle de référence. Ainsi, l'hématocrite de la truite arc-en-ciel pesant plus de 200 g à une température de 14 - 16 °C oscillerait entre 31 et 54 %. Cet intervalle est obtenu avec des prélèvements sanguins accompagnés d'une anesthésie, tandis que l'intervalle de l'hématocrite obtenu par prélèvement à un cathéter est de 23-33 %, nettement inférieur du fait d'une réaction au stress diminuée (Gallaugher *et al.*, 1995). La contraction splénique à la suite d'un stress peut augmenter l'hématocrite d'un poisson jusqu'à 20% (Stern, 2022).

L'hématocrite obtenu au cours de notre étude préliminaire oscillait entre 33 et 46 %, à une température de 14 °C.

#### c. Le taux d'hémoglobine (Hb)

Le taux d'hémoglobine correspond à la concentration d'hémoglobine dans le sang, dans les érythrocytes. Son étude nous indique la capacité de transport en O<sub>2</sub> du sang. Classiquement, ses variations sont étroitement liées à la numération globulaire et à l'hématocrite. Dans certaines conditions toutefois, comme lors d'un mauvais fonctionnement de l'hémoglobine, ces trois variables peuvent évoluer différemment (Doig et Zhang, 2017).

*Tableau III : Intervalles ou valeurs moyennes du taux d'hémoglobine chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales*

Référence	Poids (moyenne ± écart-type)	Sexe (F/M)	pH	Température	Photopériode (Lumière / Obscurité)	Hb
McCarthy <i>et al.</i> , 1973	227 - 255 g	M et F	7,8 - 8,3	6 °C	-	52 - 129 g/L
Řehulka <i>et al.</i> , 2004	330 ± 131 g	F (immatures) M	6,4 - 7,4	0,2 - 16 °C	LD 9 - 13 : 11 - 15	54 - 92,6 g/L 58,9 - 97,2 g/L
Nabi <i>et al.</i> , 2022	131 ± 27 g 385 ± 37 g	M et F M	7,22 - 7,86	8,2 - 14,2 °C	-	93 ± 5 g/L 113 ± 6 g/L

	385 ± 37 g	F				111 ± 8 g/L
Mise Yonar, 2019	33,7 ± 2,4 g	M et F	7,4 - 7,8	15 ± 1 °C	-	69,8 ± 0,4 g/L
Yonar <i>et al.</i> , 2019	31,3 ± 1,2 g	M et F	7,4 - 7,8	16 ± 1 °C	-	70,4 ± 5,5 g/L
Lone <i>et al.</i> , 2012	33 g 64 g 166 g	M et F	7,5 7,3 7,6	18 °C 18 °C 20 °C	-	non déterminé 87 g/L 79 g/L

La compilation de ces études nous indique que l'hémoglobine pourrait être comprise entre 54 g/L et 129 g/L chez des truites arc-en-ciel pesant plus de 200 g à une température de 14 - 16 °C. Dans notre étude préliminaire, nous avons obtenu un intervalle entre 56 et 71 g/L.

d. Le volume globulaire moyen (VGM)

Le volume globulaire moyen correspond à la moyenne du volume des hématies, rapporté en femtolitres (10<sup>-15</sup> L). Il se calcule à partir de l'hématocrite et du taux d'érythrocytes par la formule suivante :

VGM = volume globulaire moyen (fL)

$$VGM = \frac{Ht \times 10}{GR}$$

Ht = hématocrite (%)

GR=concentration de globules rouges dans le sang (10<sup>6</sup>/μL)

Lorsque le VGM est égal à la valeur de référence, on parle de normocytose ; quand il est inférieur à la valeur de référence, on parle de microcytose ; et lorsqu'il est supérieur à la valeur de référence, on parle de macrocytose. Ainsi, en cas d'anémie, le VGM permet de discriminer entre les causes biologiques possibles : par exemple, une microcytose est associée à une synthèse d'hémoglobine défectueuse, tandis qu'une macrocytose indique plutôt des troubles de développement cellulaire (Doig et Zhang, 2017).

Tableau IV: Intervalles ou valeurs moyennes du VGM chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales

Référence	Poids (moyenne ± écart-type)	Sexe (F/M)	pH	Température	Photopériode (Lumière / Obscurité)	VGM
McCarthy <i>et al.</i> , 1973	227 - 255 g	M et F	7,8 - 8,3	6 °C	-	246 - 595 fL
Řehulka <i>et al.</i> , 2004	330 ± 131 g	F (immatures) M	6,4 - 7,4	0,2 - 16 °C	LD 9 - 13 : 11 - 15	282 - 469 fL 279 - 434 fL
Nabi <i>et al.</i> , 2022	131 ± 27 g 385 ± 37 g 385 ± 37 g	M et F M F	7,22 - 7,86	8,2 - 14,2 °C	-	270,1 ± 9,7 fL 197,3 ± 16,1 fL 204,9 ± 15,5 fL
Mise Yonar, 2019	33,7 ± 2,4 g	M et F	7,4 - 7,8	15 ± 1 °C	-	209,6 ± 12,4 fL
Yonar <i>et al.</i> , 2019	31,3 ± 1,2 g	M et F	7,4 - 7,8	16 ± 1 °C	-	216,5 ± 15,3 fL
Lone <i>et al.</i> , 2012	33 g 64 g 166 g	M et F	7,5 7,3 7,6	18 °C 18 °C 20 °C	-	78 fL 86 fL 88 fL

Un intervalle de 150 à 350 fL a été proposé pour l'ensemble des poissons téléostéens (Grant 2015). Le VGM chez la truite arc-en-ciel pesant plus de 200 g à une température de 14 - 16 °C oscillerait entre 197,3 et 469 fL. Dans notre étude préliminaire, le VGM se situe entre 365 et 396 fL.

e. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine correspond à la concentration moyenne en hémoglobine dans les globules rouges. Elle est exprimée en pourcentage et se calcule à partir du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite par la formule suivante :

$$CCMH = \frac{Hb \times 10}{Ht}$$

CCMH = concentration corpusculaire en hémoglobine (g/dL)  
Hb = taux d'hémoglobine (g/L)  
Ht = hématocrite (%)

Hyperchrome, hypochrome et normochrome désignent respectivement une augmentation, une diminution ou une valeur incluse dans l'intervalle de référence, bien que le

terme « hyperchrome » ne soit que peu utilisé car une cellule ne peut avoir trop d'hémoglobine (Doig et Zhang, 2017).

*Tableau V : Intervalles ou valeurs moyennes de la CCMH chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales*

Référence	Poids (moyenne ± écart-type)	Sexe (F/M)	pH	Température	Photopériode (Lumière / Obscurité)	CCMH
McCarthy <i>et al.</i> , 1973	227 - 255 g	M et F	7,8 - 8,3	6 °C	-	12 - 28 %
Řehulka <i>et al.</i> , 2004	330 ± 131 g	F (immatures) M	6,4 - 7,4	0,2 - 16 °C	LD 9 - 13 : 11 - 15	15 - 22 % 15 - 20 %
Nabi <i>et al.</i> , 2022	131 ± 27 g 385 ± 37 g 385 ± 37 g	M et F M F	7,22 - 7,86	8,2 - 14,2 °C	-	29,6 ± 0,6 % 30,1 ± 0,8 % 31,7 ± 0,5 %
Mise Yonar, 2019	33,7 ± 2,4 g	M et F	7,4 - 7,8	15 ± 1 °C	-	22,2 ± 1,9 %
Yonar <i>et al.</i> , 2019	31,3 ± 1,2 g	M et F	7,4 - 7,8	16 ± 1 °C	-	30,0 ± 2,4 %
Lone <i>et al.</i> , 2012	33 g 64 g 166 g	M et F	7,5 7,3 7,6	18 °C 18 °C 20 °C	-	non déterminé 25 % 25 %

Grant en 2015 décrit un intervalle de valeurs de référence chez les téléostéens de 18-30 %, tandis que diverses études menées indiquent un intervalle de 15 - 52,2 % pour des truites arc-en-ciel pesant plus de 200 g et à 14 - 16 °C. Dans notre étude préliminaire, l'intervalle observé est plutôt de 15-17 %.

f. La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine correspond à la masse moyenne d'hémoglobine contenue dans un seul érythrocyte. C'est une donnée exprimée en picogramme ( $10^{-12}$  g) qui est calculée à partir du taux d'hémoglobine total et de la concentration d'érythrocytes dans le sang par la formule suivante :

TCMH = teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg)

$$TCMH = \frac{Hb}{GR}$$

Hb = taux d'hémoglobine (g/L)

GR=concentration de globules rouges dans le sang (10<sup>6</sup>/μL)

Cette variable est à moduler selon le VGM, car une cellule microcytaire ne peut contenir autant d'hémoglobine qu'une cellule macrocytaire (Doig et Zhang, 2017).

Tableau VI : Intervalles ou valeurs moyennes de la TCMH chez la truite arc-en-ciel dans plusieurs études sous différentes conditions environnementales

Référence	Poids (moyenne ± écart-type)	Sexe (F/M)	pH	Température	Photopériode (Lumière / Obscurité)	TCMH
McCarthy <i>et al.</i> , 1973	227 - 255 g	M et F	7,8 - 8,3	6 °C	-	54 - 98 pg
Řehulka <i>et al.</i> , 2004	330 ± 131 g	F (immatures) M	6,4 - 7,4	0,2 - 16 °C	LD 9 - 13 : 11 - 15	51 - 86 pg 47 - 78 pg
Nabi <i>et al.</i> , 2022	131 ± 27 g 385 ± 37 g 385 ± 37 g	M et F M F	7,22 - 7,86	8,2 - 14,2 °C	-	80,0 ± 1,7 pg 59,2 ± 3,5 pg 64,9 ± 4,3 pg
Mise Yonar, 2019	33,7 ± 2,4 g	M et F	7,4 - 7,8	15 ± 1 °C	-	43,7 ± 2,5 pg
Yonar <i>et al.</i> , 2019	31,3 ± 1,2 g	M et F	7,4 - 7,8	16 ± 1 °C	-	42,1 ± 3,2 pg
Lone <i>et al.</i> , 2012	33 g 64 g 166 g	M et F	7,5 7,3 7,6	18 °C 18 °C 20 °C	-	non déterminé 21,4 pg 21,7 pg

Chez les téléostéens, Grant en 2015 note un intervalle de 30 - 100 pg. Ces valeurs sont en accord avec l'intervalle de 47 - 82 pg relevé par diverses études pour des truites arc-en-ciel pesant plus de 200 g à 14 - 16 °C, ou encore un intervalle de 75 - 90 pg observé dans notre étude préliminaire.

#### g. Le taux de réticulocytes

Le taux de réticulocytes correspond à la concentration en réticulocytes, c'est-à-dire en érythrocytes immatures. Il permet de définir comment l'organisme réagit à l'anémie. Si le taux de réticulocytes est élevé, un renouvellement d'érythrocytes est en cours et l'anémie est dite régénérative. Au contraire, si le taux de réticulocytes est faible, voire nul, l'anémie est dite arégénérative (Doig et Zhang, 2017). Cependant, comme ces cellules ne sont que très difficilement différenciables par rapport aux érythrocytes chez les poissons, cette variable est très peu utilisée, que ce soit à l'analyse par automate ou par un comptage sur frottis au microscope (Soldatov, 2003).

#### h. La volémie chez les poissons

La volémie correspond au volume de sang total circulant au sein de l'organisme. Si la volémie est une donnée connue chez la plupart des mammifères utilisés en expérimentation animale, elle reste difficile à estimer dans le cas des poissons. Plusieurs études ont été conduites afin de la déterminer chez la truite arc-en-ciel.

La première étude a été conduite en 1963 par Conte *et al.*, en combinant trois méthodes différentes :

- injection de colorant T-1824 (bleu d'Evans) puis prélèvement sanguin et mesure par colorimétrie
- injection d'albumine humaine iodée (HSA-I<sup>131</sup>) puis prélèvement sanguin afin de mesurer la concentration finale dans le sang
- injection d'érythrocytes marqués par du <sup>51</sup>Cr puis prélèvement sanguin afin de mesurer la dilution isotopique

Ces trois méthodes ont permis de mesurer des volémies respectives de  $3,4 \pm 1$  %, de  $3,3 \pm 0,7$  % ou encore de  $2,8 \pm 1$  % du poids vif du poisson. Ces valeurs correspondent au même ordre de grandeur des valeurs ensuite trouvées par Duff *et al.* (1987), Gingerich *et al.* (1987), Gingerich et Pityer (1989) et Gingerich *et al.* (1990). En moyenne, le volume sanguin des poissons se situerait entre 3 et 5 %. Ce volume est inférieur à celui des mammifères, estimé à environ 6 % du poids vif de l'animal et pouvant parfois aller jusqu'à 8 - 9 % selon l'espèce (Evans, 1994 ; McGuill et Rowan, 1989).

Tableau VII : Tableau regroupant les méthodes utilisées et les volémies obtenues (en pourcentage du poids vif) dans diverses études

Etude	Méthode utilisée	Volémie
Conte <i>et al.</i> , 1963	colorant bleu (T-1824)	3,4 ± 1 %
Conte <i>et al.</i> , 1963	albumine humaine iodée (HSA-I <sup>131</sup> )	3,3 ± 0,7 %
Conte <i>et al.</i> , 1963	érythrocytes marqués ( <sup>51</sup> Cr)	2,8 ± 1 %
Duff <i>et al.</i> , 1987	érythrocytes marqués ( <sup>51</sup> Cr)	3,35 ± 0,3 %
Gingerich <i>et al.</i> , 1987	érythrocytes marqués ( <sup>51</sup> Cr)	4,09 ± 0,55 %
Gingerich et Pityer 1989	érythrocytes marqués ( <sup>51</sup> Cr)	3,52 ± 0,78 %
Gingerich et Pityer 1989	albumine bovine iodée (BSA-I <sup>125</sup> )	5,06 ± 0,86 %
Gingerich <i>et al.</i> , 1990	érythrocytes marqués ( <sup>51</sup> Cr) et albumine bovine iodée (BSA-I <sup>125</sup> )	5,27 ± 0,30 % (souche Wytheville) 4,63 ± 0,31 % (souche Kamloops)

Notre étude considérera que le volume sanguin total chez la truite arc-en-ciel correspond à 3 % du poids vif du poisson.

Aucun intervalle de référence précis n'est admis chez la truite arc-en-ciel pour l'ensemble de ses variables hématologiques. En effet, les différents intervalles proposés par de nombreuses études ne font que souligner la variabilité au sein de cette espèce, qui réagit rapidement aux altérations de son environnement. Nous ne pouvons donc uniquement nous fier à des intervalles larges qui prennent en compte les capacités d'adaptations des poissons.

#### B. Facteurs de variation des variables hématologiques

Au sein d'une même espèce, l'ensemble des variables hématologiques de la lignée rouge varie, pour chaque individu, à l'intérieur d'un intervalle de valeurs de référence. Lorsque ces intervalles de valeurs sont larges, comme chez la truite arc-en-ciel, cela témoigne d'une grande variabilité interindividuelle. Plusieurs éléments peuvent expliquer cette forte variabilité, notamment la forte influence du milieu sur le métabolisme du poisson (Witeska, 2015).

## a. Facteurs individuels

### 1. Âge

L'âge représente également un facteur de variation de l'hématocrite. Ainsi, la quantité d'érythrocytes est plus importante sur des truites âgées de 18 mois par rapport à des animaux de 6 mois (Charoo *et al.*, 2015). Cette différence est également observée pour l'hématocrite et la concentration en hémoglobine. Ainsi, dans cette étude, l'hématocrite est à 32 % chez les juvéniles les plus âgés contre 28 % pour les plus jeunes. L'étude de Nabi *et al.*, en 2022, mesure un hématocrite de 31,4 % chez une population de juvénile, et un hématocrite augmenté de 5 % chez l'adulte. Ainsi, l'hématocrite des truites arc-en-ciel est plus faible chez les juvéniles par rapport aux adultes.

### 2. Sexe

L'influence du sexe sur les variables hématologiques ne semble pas significative (Nabi *et al.*, 2022).

### 3. Souche

La volémie et l'hématocrite des souches WS (Wytheville) et KAMS (Kamloops) de truites arc-en-ciel ont été comparées. Ces deux souches sont notées comme les souches qui divergent le plus parmi les truites produites aux Etats Unis, avec une souche très domestiquée (WS) tandis que l'autre est plus sauvage (KAMS). Bien que l'hématocrite et la volémie soient plus élevés chez la souche WS par rapport à la souche KAMS, ces variations ne sont pas significatives (Gingerich *et al.*, 1990). Ainsi, il est très probable que le choix de la souche n'impacte pas significativement les variables hématologiques étudiées. A noter toutefois que ce travail n'a pas été conduit entre des souches diploïdes et des souches triploïdes.

## b. Facteurs environnementaux

Certains facteurs chroniques vont jouer un rôle sur l'activité érythropoïétique des poissons, à l'origine de modifications des variables hématologiques.

### 1. Température

Une étude analysant la numération globulaire, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine dans le sang de truites arc-en-ciel selon différentes températures d'acclimatation, a permis de mettre en relation les variables hématologiques et la température du milieu (DeWilde et Houston, 1967). Pour ce qui est de la numération globulaire, une nette différence est visible entre des températures très basses (1 - 7 °C), avec des quantités d'hématies faibles entre  $1,09 \pm 0,02 \cdot 10^6/\mu\text{L}$  et  $1,09 \pm 0,02 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ , et des températures plus hautes présentant des poissons avec une quantité

d'hématies plus élevée. Les numérations globulaires montent au maximum à  $1,51 \pm 0,09 \cdot 10^6 / \mu\text{L}$  pour une température de 21 °C. Pareillement, l'hématocrite avait aussi une tendance à être plus faible chez les truites placées à des températures plus basses que chez celles placées à 21 °C.

À basse température, il y a une inhibition des gènes participant à l'érythropoïèse provoquant une diminution de la synthèse d'érythropoïétine, une inhibition de synthèse des sous-unités alpha et beta de l'hémoglobine et une modification histologique de la moelle rénale (moins de cellules érythropoïétiques et plus d'amas d'érythrocytes). Tous ces éléments participent à une diminution de l'érythropoïèse (Kulkeaw et Sugiyama, 2012).

Lorsque la température augmente, le taux d'oxygène dissous à saturation diminue, tandis que les besoins en oxygène chez la truite augmentent. Cette diminution d'oxygène disponible engendrerait une érythropoïèse plus intense. Ainsi, la dissolution en oxygène optimale chez la truite arc-en-ciel semblerait être autour de 7 mg/L à moins de 15 °C, mais supérieure à 9 mg/L à plus de 15 °C. Pour des températures élevées (>20 °C), cela représente des valeurs proches de la saturation (Raleigh *et al.*, 1984).

## 2. Teneur en oxygène de l'eau

### i. Milieu hypoxique

L'hypoxie du milieu correspond à une diminution importante de la pression partielle en  $\text{O}_2$  dans l'eau par rapport au taux à saturation. En dessous de 3 mg/L, le milieu n'est pas viable pour la truite arc-en-ciel (Raleigh *et al.*, 1984). L'hypoxémie est la diminution de la quantité d'oxygène transportée par le sang. Elle peut conduire à une hypoxie qui est une inadéquation entre les besoins tissulaires en oxygène et les apports.

En cas d'hypoxie survenue de manière aiguë, plusieurs mécanismes de compensation peuvent avoir lieu afin de moduler l'affinité entre l'hémoglobine et l'oxygène ou d'améliorer la capacité de transport d'oxygène du sang. Il est possible que l'organisme renouvelle ses érythrocytes circulants afin d'obtenir des érythrocytes avec de l'hémoglobine d'un autre isomorphe ayant une meilleure affinité avec l'oxygène, permettant une capture plus efficace, ou alors une affinité moindre favorisant la libération de l'oxygène dans l'organisme. Une autre manière d'augmenter la capacité de transport d'oxygène dans le sang est d'augmenter la quantité d'érythrocytes circulants, que ce soit en libérant des réserves de cellules, en accélérant la maturation des érythrocytes ou encore en favorisant la prolifération d'érythrocytes (Murad *et al.*, 1990).

Chez la truite arc-en-ciel, une situation d'hypoxie cause une légère diminution de l'hématocrite avec cependant une modification de la population des cellules de la lignée rouge. En effet, la population de cellules érythrocytaires immatures augmente de manière importante dans

les 24h suivant un passage en milieu hypoxique, nous indiquant une possible libération de cellules de réserve ou une érythropoïèse accentuée (Murad *et al.*, 1990). Ces variations sont par ailleurs réduites lorsqu'un phénomène d'hypoxie est répété, avec un processus d'habituation et d'adaptation à ce changement d'environnement. De plus, toute variation causée par de l'hypoxie est réversible, avec des valeurs de variables hématologiques revenues à des valeurs de référence au bout de 24h (Ruiz *et al.*, 2024).

En cas d'hypoxie chronique, peu de variations au niveau de l'hématocrite et de la numération d'hématies sont décrites (Houston *et al.*, 1996a; Lamarche, 2010). On observe plutôt une modification de la population d'érythrocytes, avec des hématies plus jeunes, qui présentent une affinité plus importante pour l'O<sub>2</sub>. De plus, pour les mêmes raisons que lors d'une hypoxie aiguë, la proportion des différents isomorphes d'hémoglobine est modifiée.

On observe également une adaptation cardiovasculaire et respiratoire lors d'hypoxie, avec une augmentation de la résistance vasculaire au flux sanguin (vasoconstriction), permettant une augmentation de la pression sanguine pour une meilleure capture d'oxygène tout en étant en bradycardie (Holeton et Randall, 1967).

## ii. Milieu hyperoxique

L'hyperoxie correspond à une augmentation de la pression partielle en O<sub>2</sub> dans l'eau excédant la pression atmosphérique normale. Un poisson peut expérimenter ces conditions lorsque l'eau est peu profonde, ou lorsqu'il y a une supplémentation en O<sub>2</sub>, ce qui est souvent le cas dans un cadre d'expérimentation animale. En cas de saturation en O<sub>2</sub> du milieu aquatique, les truites n'ont pas besoin d'adapter leur érythropoïèse ou la taille de leurs érythrocytes pour améliorer la capacité de transport en O<sub>2</sub>. Ainsi, l'hématocrite, le taux d'hémoglobine et la quantité d'hématies diminuent (McArley *et al.*, 2021 ; Caldwell et Hinshaw, 1994 ; Jewett *et al.*, 1991).

## 3. Teneur en dioxyde de carbone de l'eau

L'hypercapnie correspond à une pression partielle de CO<sub>2</sub> dans le sang artériel supérieure à la normale, créant un stress respiratoire pour le poisson. Lorsque des salmonidés ont été prélevés après une exposition temporaire (de 30 min à quelques heures) à un milieu très riche en CO<sub>2</sub>, on observe une augmentation de l'hématocrite, de la numération globulaire et du VGM (Börjeson, 1977; Ishimatsu *et al.*, 1992). Toutefois, Perry et Gilmour en 1996 n'observent pas de différence significative des variables hématologiques entre des résultats avant le passage dans un environnement hypercapnique et des résultats de prélèvement sanguin juste après que l'eau atteigne le seuil d'hypercapnie visé.

Lorsque la durée d'exposition à un milieu induisant une hypercapnie est prolongée (24h par exemple), les variables hématologiques semblent, au contraire, diminuées. Ainsi, chez *Salmo salar*, une autre espèce de salmonidés, l'hématocrite diminue de 10 % par rapport aux poissons

placés dans un environnement normal, et la numération globulaire passe de 1,29 à 1,07 10<sup>6</sup>/μL (Börjeson, 1977). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude plus récente (Kaya *et al.*, 2013)

#### 4. Lumière

Actrice à part entière sur l'environnement des poissons, la lumière joue un rôle essentiel à leur bien-être, que ce soit par son intensité, son spectre ou par la photopériode. Si la lumière joue un rôle zootechnique avec un impact sur l'alimentation et la croissance, elle a aussi un rôle biologique, pouvant causer des variations hématologiques de manière directe ou indirecte.

##### i. Intensité de la lumière

L'intensité de la lumière agit sur la croissance, l'assimilation des nutriments, et le stress, mais ne semble pas produire d'impact direct sur les variables hématologiques (Boeuf et Le Bail, 1999).

##### ii. Spectre de lumière

Le spectre de lumière ne semble pas non plus avoir d'impact direct sur les variables hématologiques, bien qu'il puisse générer du stress chez les truites arc-en-ciel (Karakatsoli *et al.*, 2011).

##### iii. Photopériode

La photopériode présente un facteur de variation de l'hématocrite. Après un passage à un régime lumineux de LD 24 : 0 (24h de lumière, 0h d'obscurité), la truite arc-en-ciel présente une augmentation de l'hématocrite, une augmentation du nombre d'érythrocytes et une diminution du TCMH (Valenzuela *et al.*, 2006a). Cependant, une photopériode très importante (> 14h) s'accompagne également d'une augmentation du nombre d'érythrocytes immatures et d'une diminution de l'intensité de la polychromatophilie, soit un défaut d'accumulation d'hémoglobine au sein des globules rouges (Valenzuela *et al.*, 2006b ; Valenzuela *et al.*, 2007).

#### 5. Exposition à des pH extrêmes

Le pH influence la capacité de transport en O<sub>2</sub> des truites arc-en-ciel. En effet, lorsqu'une truite est placée en milieu acide pendant 3 jours, on observe une pression de l'aorte dorsale augmentée et une augmentation de la fréquence cardiaque. Quant aux variables hématologiques, une augmentation de l'hématocrite et de l'hémoglobine sont rapportées. La CCMH est diminuée de 21 % suggérant soit un gonflement érythrocytaire, soit une mobilisation d'érythrocytes pauvres en hémoglobine, possiblement par la rate (Milligan et Wood, 1982 ; Witters *et al.*, 1990).

Une alcalinisation du pH, soit un pH plus élevé, modifie également certaines variables hématologiques. Une exposition à un pH de 9,5 pendant plus d'un jour cause une augmentation significative de l'hématocrite allant jusqu'à 6,5 % contrairement au groupe resté à pH = 7,9 qui ne perçoit aucune variation significative de son hématocrite. Aucune modification de la CCMH n'a été objectivée au cours de cette étude. L'hypothèse principale de cette augmentation serait une augmentation des besoins en O<sub>2</sub> lorsque le milieu est trop alcalin, causant une contraction splénique (Wilkie *et al.*, 1996).

## 6. Exposition à des substances toxiques

Certaines situations peuvent engendrer une modification des variables hématologiques. Ainsi, on observe une anémie lors de la présence d'agents toxiques comme le cuivre (Orun *et al.*, 2004), lors d'infections par certaines bactéries comme *Aeromonas spp.* (Rehulka, 2002), ou encore lors de carences alimentaires (Witeska, 2015). Une exposition au plomb se traduit par un gonflement érythrocytaire et un renouvellement accéléré de la population de globules rouges (Witeska, 2005), alors qu'une exposition au cobalt diminue la taille des érythrocytes (Atamanalp *et al.*, 2009).

### c. Autres facteurs

#### 1. Alimentation

L'absence d'alimentation sur une période plus ou moins longue a un effet sur les variables hématologiques des truites. Ainsi, il a été montré qu'une mise à jeun de 30 jours cause une diminution de l'hématocrite de 8 % en comparaison à un hématocrite de truites alimentées (Lane *et al.*, 1981). Par ailleurs, une diminution du taux d'hémoglobine et de la quantité d'hématies a également été rapportée dans ce cas, sans modification significative du VGM, de la TCMH et de la CCMH. Dans une autre étude, la diminution de l'hématocrite, du taux d'hémoglobine et de la quantité d'hématies, 7 jours après un prélèvement de 15 % du volume sanguin (0,45 % du poids vif), n'est apparue significative que chez les truites non alimentées. Une augmentation du VGM et une diminution de la CCMH étaient notées. (Lane et Tharp, 1980)

L'absence durable d'alimentation impacterait donc les capacités érythropoïétiques, se traduisant par un hématocrite diminué et une modification de la population érythrocytaire, avec une diminution du nombre de réticulocytes et d'érythrocytes riches en polyribosomes (Lane et Tharp, 1980).

#### 2. Pertes sanguines

Suite à un prélèvement sanguin ou une hémorragie, la volémie est réduite, mais également la quantité de globules rouges. Olson *et al.*, en 2003, suivent l'hématocrite au moment d'une simulation d'hémorragie de 35 % du volume sanguin. Initialement à 32 %, la diminution de l'hématocrite se fait en deux phases : une première phase de diminution rapide correspondant à la

perte de sang, puis une phase de diminution plus lente correspondant à la dilution du sang par un apport plasmatique compensatoire dès 24 minutes après la perte de sang initiale. Ainsi, en cas de pertes sanguines, la volémie se maintient par des processus compensatoires tandis que l'hématocrite diminue.

### 3. Effort physique

Une nage intense peut avoir des répercussions sur les variables hématologiques. Ainsi, sur des truites non splénectomisées à qui l'on impose un effort physique intense pendant 10 minutes, on observe une augmentation de l'hématocrite et du nombre de globules rouges d'environ 8 %. *A contrario*, placées dans les mêmes conditions, des truites splénectomisées ne montrent aucune variation de ces variables, ayant perdu leurs capacités de contraction splénique (Gallaughier *et al.*, 1992).

Par ailleurs, cette étude montre, pour les deux groupes, une augmentation du VGM associée à une diminution de la CCMH. Afin d'améliorer les capacités de transport en O<sub>2</sub>, les érythrocytes gonflent, diluant l'hémoglobine au sein des érythrocytes.

Une autre étude conduite en 2004 n'a toutefois pas permis de confirmer ces résultats (Jones et Moffitt, 2004).

Les variables hématologiques des poissons sont sujettes à leur environnement, à des facteurs externes relevant de la zootechnie, ainsi qu'à des facteurs individuels. Afin de poursuivre une étude expérimentale avec des truites arc-en-ciel, il faut donc limiter tout changement pouvant engendrer un processus d'adaptation.

### III. Stress et expérimentation animale

#### A. Définition

Un stress correspond à tout ce qui fait sortir l'organisme de l'état d'homéostasie, sa capacité à maintenir les constantes physiologiques autour de valeurs proches de la normale. Un facteur de stress peut provenir de l'environnement avec, par exemple, une mauvaise qualité de l'eau, il peut être un facteur physiologique, comme une mauvaise alimentation ou la présence d'un agent pathogène, ou il peut être lié à des facteurs psychologiques tels que des relations de dominance au sein d'un groupe. La charge allostatique est un concept théorique qui fait référence à l'usure de l'organisme découlant de différents systèmes physiologiques qui réagissent aux contraintes de l'environnement : plus l'organisme s'adapte à des sources de stress, plus il va dépenser d'énergie augmentant sa charge allostatique. Un individu ayant une charge allostatique élevée va être plus sensible et sera ainsi prédisposé à une mauvaise santé (Thomson *et al.*, 2019).

En expérimentation animale, l'environnement imposé est obligatoirement très différent de celui de l'élevage d'origine, que ce soit par la taille des cuves, leur matière, la quantité de poissons, la qualité de l'eau etc. Une charge allostatique est ainsi inévitablement présente dès l'acclimatation des poissons, et il faut la limiter au mieux afin de ne pas impacter les phases expérimentales. En effet, une charge allostatique élevée dès le début d'une expérimentation animale va limiter les capacités de l'individu à s'adapter face aux divers tests et épreuves, faussant tout résultat obtenu par la suite.

#### B. Réponse biologique au stress chez la truite arc-en-ciel

Le stress engendre une réponse neuro-endocrinienne correspondant à la libération de catécholamines, des molécules de stress, ainsi que de cortisol dans la circulation sanguine. Les catécholamines (adrénaline, noradrénaline) sont libérées par les cellules chromaffines du pronéphros, correspondant à l'équivalent de la médullosurrénale des mammifères, tandis que le cortisol est libéré par les tissus inter-rénaux du pronéphros. La libération de cortisol se fait en parallèle, à travers l'action de diverses hormones, notamment l'hormone adrénocorticotrope (ACTH).

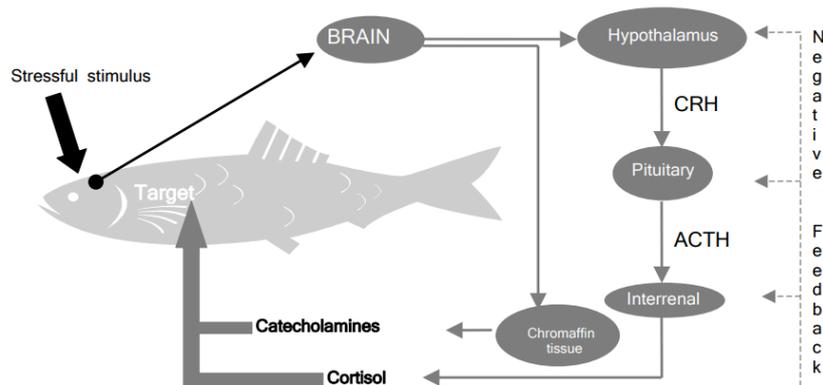


Figure 12 : Schéma illustrant la réponse hormonale à la suite d'un stress chez le poisson (FSBI, 2002)

Ces hormones entraînent des modifications biochimiques et physiologiques . Par exemple, la libération de glucose par le foie est un marqueur indirect souvent quantifié chez les poissons (Iwama, 2007). Classiquement, en réponse aux hormones de stress, on observe sur le poisson une augmentation de la fréquence cardiaque, du volume d'éjection systolique, du flux sanguin branchial, de l'affinité entre l'hémoglobine et l'oxygène, ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle (Pankhurst, 2011). Un stress chronique a pour conséquences la mise de côté de certaines activités biologiques, comme la reproduction (Schreck, 2010) ou la croissance (Pottinger et Pickering, 1992) et peut causer une dépression de l'immunité (Angelidis *et al.*, 1987).

### C. Sources de stress en expérimentation animale

#### a. Allotement

La truite arc-en-ciel est une espèce grégaire, avec une probable organisation hiérarchique au sein du groupe. Alloter des truites en station expérimentale signifie remodeler arbitrairement ces interactions sociales, le plus souvent en réduisant les effectifs du groupe tout en restreignant son espace disponible (et donc les possibilités de fuite pour les animaux dominés).

Ainsi, lorsque des truites issues d'un milieu densément peuplé sont placées dans des groupes de faible densité, elles sont impactées négativement, ce qui se traduit par une prise de décision plus lente (Anderson, 2021). De même, une diminution du nombre de poissons au sein d'un même espace cause une augmentation du taux de cortisol, un indicateur physiologique de stress, dans le sang. Pour les poissons isolés individuellement, le taux de cortisol n'est revenu à son niveau basal qu'au bout de 2 semaines, et la reprise alimentaire a nécessité 1 à 2 semaines d'adaptation (un gain de poids n'a toutefois été constaté qu'après 4 à 6 semaines). Pour les poissons isolés par paire, si le plus souvent l'un des deux évolue de manière similaire à ce qui a été observé pour les poissons isolés, le second, probablement soumis à un poisson plus dominant, ne s'acclimata jamais, et conserve des valeurs de cortisol élevées et une mortalité par cause

infectieuse accrue. Dans les groupes de taille supérieure (5 poissons), une partie des poissons, avec une cortisolémie normale, prend du poids, alors qu'une autre partie des poissons ne prend pas de poids et souffre de taux de cortisol élevés. À partir de 10 poissons, ces effets ne sont plus observés et l'ensemble du groupe présente une croissance correcte. Les couleurs des truites peuvent présenter un indicateur de ces relations de dominance ou de soumission avec des truites plus claires souvent plus dominantes et des truites plus foncées souvent plus soumises (Pottinger et Pickering, 1992). De plus, par fatigue et faiblesse, les poissons soumis présentent un risque infectieux plus élevé augmentant ainsi la probabilité de mortalité anticipée (Peters *et al.*, 1988).

Prévoir des lots de taille suffisante et un temps d'acclimatation assez long est indispensable pour garantir la qualité des résultats en expérimentation animale.

## b. Lumière

En expérimentation animale, la lumière est souvent artificielle et nécessite d'être ajustée au mieux afin de minimiser le stress lié à l'environnement.

### 1. Intensité de la lumière

Quelques heures après une exposition à une lumière bleue de forte intensité, une augmentation de la concentration de cortisol et de glucose plasmatique est visible chez des saumons Atlantiques (*Salmo salar*). Cette hausse n'est pas présente lors de l'exposition à une lumière bleue de faible intensité (Migaud *et al.*, 2007). Cependant, l'intensité de la lumière ne semble pas influencer directement la croissance des poissons. En effet, aucune différence significative n'est observée sur la croissance de truites arc-en-ciel sous différentes intensités de lumières, à savoir à 2,92 lx, 17,32 lx ou 196,22 lx (Savić et Mikavica, 2021).

Après observation des comportements de salmonidés exposés à des cycles d'obscurité et de lumière, ce seraient plutôt les transitions qui créent du stress que l'intensité elle-même (Mork et Gulbrandsen, 1994). En effet, chez les truites arc-en-ciel de cette étude, un changement d'activité rapide interprété comme une réponse au stress a lieu majoritairement lors du passage du régime lumineux au régime d'obscurité. Ceci coïnciderait avec les observations de Migaud *et al.* (2007), qui retrouvent des concentrations de cortisol et de glucose habituelles 24h après l'augmentation de l'intensité de la lumière.

### 2. Spectre de la lumière

Les truites arc-en-ciel ont des préférences de spectre de lumière pour leur environnement. Certains spectres moins tolérés peuvent générer une réponse au stress avec une production de cortisol.

Lors d'une étude évaluant la préférence de couleur ambiante chez les truites arc-en-ciel entre une ambiance rouge, jaune, verte et bleue, ce sont les ambiances vertes et bleues qui sont préférées par les truites. Si l'ambiance verte est généralement le premier choix des truites, une

période d'acclimatation à une lumière bleue favorise une préférence pour cette lumière par la suite, ce qui n'est pas le cas pour les ambiances jaune et rouge. Par ailleurs, la température influence le choix de l'ambiance. En effet, les truites à une température de 1 °C préfèrent être dans une ambiance bleue (puis verte en second choix), tandis que celles présentes à une température de 12 °C préfèrent une ambiance verte (Luchiari et Pirhonen, 2008). Cette variation de préférence selon la température serait liée à une modification de la composition des pigments rétinien des salmonidés, à savoir de la rhodopsine et de la porphyropsine, dépendant de la température (Tsin et Beatty, 1977).

Si les truites semblent préférer des lumières avec des longueurs d'ondes plus faibles, vertes et bleues, une étude d'aspect davantage zootechnique indique de meilleurs résultats sous une lumière plutôt jaune. En effet, Heydarnejad et Pilevarian en 2011 mettent en évidence une meilleure croissance chez des truites exposées à une lumière jaune, par opposition à une lumière blanche, rouge ou bleue. La deuxième meilleure croissance a lieu sous la lumière bleue. Par ailleurs, les truites ayant été sous lumière jaune présentent une augmentation plus faible des taux de cortisol que celles sous les autres couleurs. D'autres ont observé des résultats différents, c'est le cas de Karakatsouli *et al.* qui, en 2011, ont observé une croissance optimale lors de l'élevage pendant 111 jours sous lumière rouge plutôt que sous lumière bleue ou blanche, avec des augmentations de cortisol induites par un stress moins importantes pour les truites élevées sous lumière bleue.

Bien que les avis divergent selon les études, la lumière bleue semble être satisfaisante pour limiter le stress tout en permettant une bonne croissance.

### c. Manipulation des poissons

De nombreuses expérimentations animales nécessitent une manipulation des poissons, avec possiblement une sortie de l'eau afin de réaliser des prélèvements. Ainsi, après 3 manipulations en une demi-heure sur des dorades, des modifications hématologiques ont été mises en évidence, notamment une augmentation de l'hématocrite, du nombre de globules rouges et du taux d'hémoglobine, en comparaison à un groupe non manipulé. Ces variations hématologiques sont très certainement la conséquence d'une contraction splénique (Fazio *et al.*, 2015).

L'anesthésie est utilisée fréquemment en expérimentation animale afin de prévenir le stress dû à la manipulation, bien qu'elle puisse représenter en elle-même une source de stress. En effet, la plupart des produits anesthésiques testés sur des poissons zèbres ont engendré un comportement d'aversion (Readman *et al.*, 2013). Ainsi, les poissons ont passé significativement plus de temps dans les espaces ne contenant pas ces produits anesthésiques. Cette étude a notamment mis en évidence un effet marqué pour la tricaine (MS222), la molécule la plus utilisée dans notre station expérimentale à Oniris, et ce même à demi-dose. Toutefois, une autre étude a conclu que la tricaine produit certes une forte agitation des poissons lors de l'induction mais ne

cause pas de réelles conséquences hématologiques (Witeska *et al.*, 2017). De plus, l'anesthésie permet de limiter le temps de manipulation, les besoins de contention et donc le stress. Le niveau de stress des poissons manipulés non anesthésiés est considérablement plus élevé que chez des poissons anesthésiés (Wagner *et al.*, 2003).

Par ailleurs, le plus souvent, les poissons sont sortis de leur milieu aquatique pour les manipulations, causant un stress respiratoire supplémentaire, probablement proportionnel à la durée de cette sortie. Les branchies sont alors exposées à l'air ambiant, ce qui cause un stress respiratoire par hypoxie (Lawrence *et al.*, 2020). Une durée maximale de 3 minutes entre la capture et la remise en eau est proposée pour limiter le stress lié à la manipulation des animaux. Cette durée n'est toutefois pas toujours compatible avec les besoins expérimentaux (Lawrence *et al.*, 2020).

#### d. Prélèvements sanguins

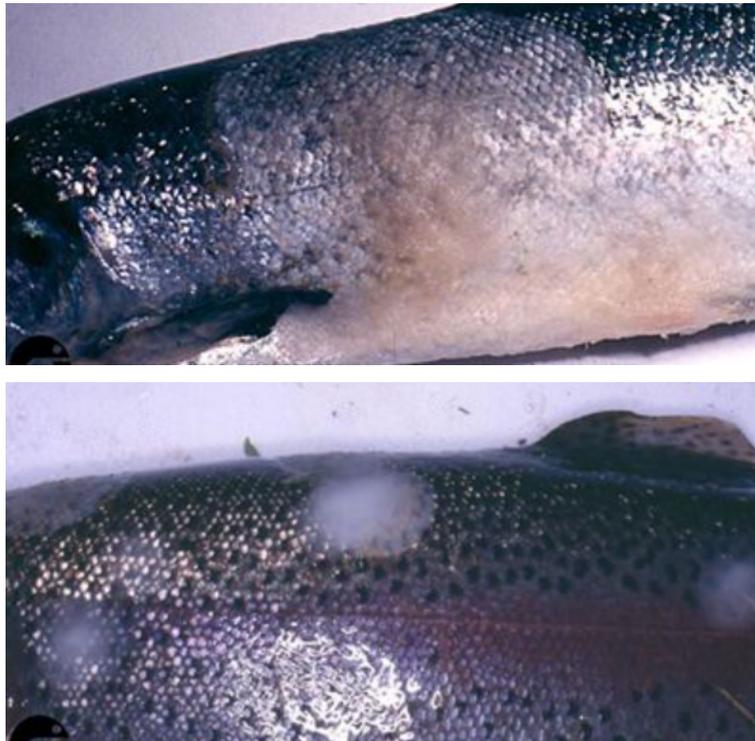
Un prélèvement sanguin, en fonction du volume prélevé, peut entraîner des conséquences physiologiques plus ou moins importantes, et peut causer une baisse significative de la volémie ou une hémodilution importante (Olson *et al.*, 2003). Cela impose alors des dépenses énergétiques significatives au poisson pour maintenir son homéostasie, et peut l'affaiblir considérablement. Il importe donc de ne pas prélever de quantités trop importantes de sang.

#### D. Biais expérimentaux

L'influence du stress sur les variables hématologiques a déjà été présentée précédemment (contraction splénique, gonflement des érythrocytes, etc...). D'autres effets peuvent également avoir une influence sur les résultats expérimentaux, notamment le stress chronique. Ainsi, un gain de poids quasiment nul a été enregistré chez des poissons exposés à un stress continu (Pottinger et Pickering, 1992), et une activité d'alimentation plus réduite a été observée chez des poissons exposés à un risque de prédation plus élevé (Johnson, 2003). L'alimentation pouvant avoir une influence significative notamment sur l'érythropoïèse, un stress chronique au sein d'un même lot, surtout s'il se traduit par des réactions différentes entre les animaux dominés et dominants, peut engendrer un biais sur les résultats expérimentaux.

Par ailleurs, lors de stress chronique, le système immunitaire affaibli rend les truites plus sensibles aux infections (Angelidis *et al.*, 1987 ; Peters *et al.*, 1988). *Saprolegnia spp.* est un oomycète omniprésent dans les écosystèmes d'eau douce qui se nourrit de matières organiques présentes dans l'eau. La truite est habituellement peu sensible à ce champignon. Toutefois, en cas de processus infectieux préexistant, de lésions tégumentaires significatives (comme une perte de mucus) ou de baisse d'immunité (comme lors de stress chronique important), le champignon peut se développer sur la peau ou dans les branchies des truites et causer une forte mortalité. La saprolegniose clinique se traduit par l'apparition d'amas fongiques d'apparence cotonneuse sous

l'eau, et s'apparentant plutôt à du mucus lorsque le poisson est à l'air libre. L'infection commence en général à la tête au niveau des branchies ou au niveau des nageoires du poisson, puis les lésions s'étendent à l'ensemble du corps (Barde, 2022). Les lésions de saprolégniose sont initialement circulaires ou en forme de croissant, avec une croissance rapide produisant une destruction de l'épiderme. De fins filaments blancs ou gris se développent au niveau des lésions et, lors des infections avancées, il est possible d'observer de la léthargie et de la perte d'équilibre (Marine directorate, 2023). La traduction la plus directe d'une flambée de saprolégniose en expérimentation animale est la forte mortalité associée.



*Figure 13 : Photographies illustrant des lésions de saprolégniose sur une truite arc-en-ciel (Marine directorate, 2023)*

Le maintien d'un animal dans un cadre expérimental produit inévitablement une source de stress. Chez les poissons, ce stress est amplifié par rapport aux autres espèces par la nécessité de devoir les sortir de leur milieu afin de réaliser des manipulations, comme des prélèvements sanguins par exemple. Étudier des variables hématologiques dans ce contexte est ainsi complexe, et nécessite une répétabilité entre les individus afin d'homogénéiser au mieux d'éventuelles variations hématologiques.

## **Partie 2 - Etude expérimentale**

**Impact de différentes procédures de  
prélèvements sanguins sur la truite arc-en-ciel  
et durée de régénération sanguine**

## I. Objectifs

### A. Evaluation de l'influence du prélèvement sanguin sur les variables hématologiques

Aujourd'hui, la seule ligne directrice concernant le volume sanguin maximal prélevable chez le poisson est proposée par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (2005), qui préconise un maximum de 1 mL/kg, soit 0,1 % du poids vif, bien que « les poissons [puissent] supporter qu'on prélève un pourcentage plus élevé de leur volume sanguin ».

La plupart des analyses nécessitent un minimum de 100 µL de plasma, soit un prélèvement d'au moins 0,2 mL. Lorsque l'on travaille avec des animaux de petite taille, cette recommandation limite grandement le nombre de variables mesurables sans euthanasie des animaux, et interdit tout suivi longitudinal, pourtant mieux à même de caractériser la variabilité interindividuelle tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. En effet, chez une truite de 200 g, 0,1 % du poids vif correspond à 0,2 mL de sang.

Différentes études ont déjà démontré la possibilité de prélever de plus grandes quantités de sang chez la truite, quoique sans jamais évaluer l'influence de ce type de prélèvement sur la physiologie de l'animal (Viel *et al.*, 2021 ; Viel *et al.*, 2024 ; Lawrence *et al.*, 2020 ; Corum *et al.*, 2023). Cette étude a pour objectif de déterminer la quantité maximale de sang prélevable sur une truite, que ce soit en prélèvement unique ou en prélèvements répétés, et de mieux caractériser l'impact biologique de ces prélèvements sur l'animal.

### B. Evaluation d'un temps de régénération sanguine selon le volume prélevé

Il n'existe aucune ligne directrice concernant la durée de récupération après la réalisation d'un prélèvement sanguin chez le poisson. Chez la souris, ces seuils ont été établis de longue date : un prélèvement unique de 10-15 % du volume sanguin nécessite 12 jours de récupération, un prélèvement unique de 20 % nécessite 20 jours, tandis qu'un prélèvement de moins de 5 % ne présenterait aucun impact biologique. Une étude chez les poissons zèbres corrobore ces résultats avec une récupération de 1 semaine nécessaire après un prélèvement de 7,5 %, et de 2 semaines après un prélèvement de 10-15 % (Zang *et al.*, 2013).

Ce temps de récupération plutôt rapide est cependant nuancé par une étude sur les bonnes pratiques de prélèvements en expérimentation animale, présentant les délais de récupération nécessaires à la suite d'un prélèvement unique ou de prélèvements répétés sur 24h chez des rongeurs. Un prélèvement unique nécessiterait plus de temps de récupération avec 2 semaines et 4 semaines nécessaires à la suite d'un prélèvement de respectivement 10 % et 15 %,

comparé à plusieurs prélèvements opérés sur 24h, qui nécessiteraient 2 semaines et 3 semaines à la suite de prélèvements cumulant à respectivement 10 - 15 % et 20 % (Diehl *et al.* 2001).

Cette étude permet d'étudier l'évolution des variables hématologiques au cours du temps à la suite de différentes procédures de prélèvements, afin de déterminer l'influence du prélèvement sur la vitesse et la qualité de la récupération sanguine.

## II. Matériels et méthodes

### A. Animaux

Nous avons décidé de travailler avec la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), celle-ci étant l'espèce de poisson la plus fréquente en élevages piscicoles en France. Ainsi, le rapport des chiffres clés des filières pêche et aquaculture en France en 2023 décrit que, sur plus de 39 500 tonnes de salmonidés produites en 2022, la truite arc-en-ciel en représente près de 96 % de la production nationale de poissons d'eau douce (Pisciculteurs de France, 2023). Cette espèce peut être rencontrée dans les laboratoires d'expérimentation animale, c'est l'espèce modèle de l'équipe APPIFish basée à Oniris.

Les truites arc-en-ciel utilisées sont diploïdes, mâles et femelles mélangées car la distinction entre les deux sexes n'est pas possible chez des truites entre 200 et 300 g. Le sexe ne devrait toutefois pas avoir d'impact significatif sur l'évolution des variables hématologiques au cours des procédures expérimentales. De plus, la mise en place d'un suivi longitudinal permet de s'assurer que chaque poisson est son propre témoin.

Les truites ont d'abord été élevées à la pisciculture de Lussais avant d'être transférées à la station expérimentale aquacole d'Oniris. Cette opération s'est effectuée en janvier 2023, permettant une phase d'acclimatation de 6 semaines avant le début du protocole expérimental. Une période d'acclimatation de 3 mois avait initialement été prévue, mais a été compromise par une panne d'électricité générale avec dysfonctionnement du système d'alarme en décembre provoquant la mort du premier lot.

Après un passage rapide de 10 jours dans une cuve de 1 m<sup>3</sup>, 120 poissons ont été répartis par groupes de 10 dans 12 bacs de 200 L à une température de 14 °C pour une période d'acclimatation de 7 semaines commençant le 29/01/2024. Ces poissons pesant en moyenne 300 g, la densité dans les cuves est d'environ 15 kg/m<sup>3</sup>. Le 29/02/2024, 9 poissons de chaque bac sont identifiés par puce électronique et conservés, les restants sont placés dans un bac supplémentaire afin de pouvoir anticiper toute mortalité imprévue. De ce fait, chaque poisson est attribué à un nom pour l'identifier, relié au bac dans lequel il se trouve. Ainsi, dans le bac 13, nous aurons les poissons B13P1 à B13P9.

## B. Environnement



Figure 14 : Photographie de la salle de travail de cette étude, Salle 3 de la station aquacole d'Oniris, cuves de 200 L

La température de travail a été choisie à 14 °C car elle se rapproche de la température optimale pour les truites arc-en-ciel, à savoir 15 °C. La saturation en O<sub>2</sub> de l'eau, mesurée quotidiennement, est maintenue entre 8 et 10 ng/L. L'eau est à un pH de 7 - 7,5 et à une dureté de 250 ppm. Les truites sont nourries une fois par jour avec des granulés extrudés Le Gouessant de la gamme NEO CDC. Le plan d'alimentation est mis à jour toutes les deux semaines selon la croissance des poissons.

En guise d'enrichissement, un tube de PVC est placé dans chaque bac afin d'améliorer le bien-être des truites. En effet, ce type d'enrichissement structurel apporte de la complexité à l'environnement et permet aux truites d'exprimer un comportement naturel tel que la mise à l'abri. Il permet de répondre à deux des cinq libertés nécessaires pour respecter le bien-être animal en élevage, à savoir assurer aux animaux un environnement adapté et confortable, et veiller à ce que les animaux puissent exprimer des comportements habituels pour l'espèce (Webster, 2001).

À cause d'une flambée de saprolégniose (*Saprolegnia spp.*) à la station aquacole, l'intensité lumineuse a été réduite d'environ 350 lx à 150 lx le 13/03/2024 afin de réduire le stress et d'améliorer les conditions de vie des poissons. La photopériode est fixée à un régime de LD 12 : 12 (12h de lumière, 12h d'obscurité) tout au long de l'étude.

C. Protocole 1 : suivi de paramètres biologiques et zootechniques toutes les deux semaines suite à 6 modalités de prélèvement différentes

a. Descriptif des différents types de protocoles de prélèvement

Deux modalités sont évaluées au cours de notre étude, un prélèvement unique ou trois prélèvements répétés sur 6h. En l'absence de référentiel disponible chez le poisson, les valeurs de référence utilisées en rongeurs ont été retenues pour notre étude, à savoir un prélèvement de 10, de 15 ou de 20 % du volume sanguin circulant. Chez les rongeurs, des temps de récupération sont déterminés selon le volume de sang prélevé (Diehl *et al.*, 2001). Ces temps de récupération sont supérieurs à ceux suggérés par Nahas *et al.* (2000) en fin d'étude qui proposaient 12 jours pour un prélèvement unique de moins de 20 % du volume de sang total, et 19 jours pour un prélèvement de 20 % ou plus.

Tableau VIII : Estimation du temps de récupération nécessaire selon le volume de sang prélevé selon les deux modalités de prélèvement chez des rongeurs (Diehl *et al.*, 2001)

Prélèvement simple		Prélèvements répétés sur 24h	
Volume prélevé	Temps de récupération	Volume prélevé total	Temps de récupération
7,5 %	1 semaine	7,5 %	1 semaine
10 %	2 semaines	10-15 %	2 semaines
15 %	4 semaines	20 %	3 semaines

Pour le prélèvement unique, trois modalités ont été évaluées:

- Un prélèvement de 0,1 % du poids vif, correspondant à la préconisation du CCPA, soit environ 3,3 % du volume de sang total (groupe A)
- Un prélèvement de 0,3 % du poids vif, correspondant à 10 % du volume de sang total (groupe B)
- Un prélèvement de 0,45 % du poids vif, correspondant à 15 % du volume de sang total (groupe C)

Pour les prélèvements multiples, il a été décidé de réaliser trois prélèvements à T0h, T2h puis T6h, pour un volume total prélevé de :

- 0,3 % du poids vif, correspondant à 10 % du volume de sang total (groupe D)
- 0,45 % du poids vif, correspondant à 15 % du volume de sang total (groupe E)
- 0,6 % du poids vif, correspondant à 20 % du volume de sang total (groupe F)

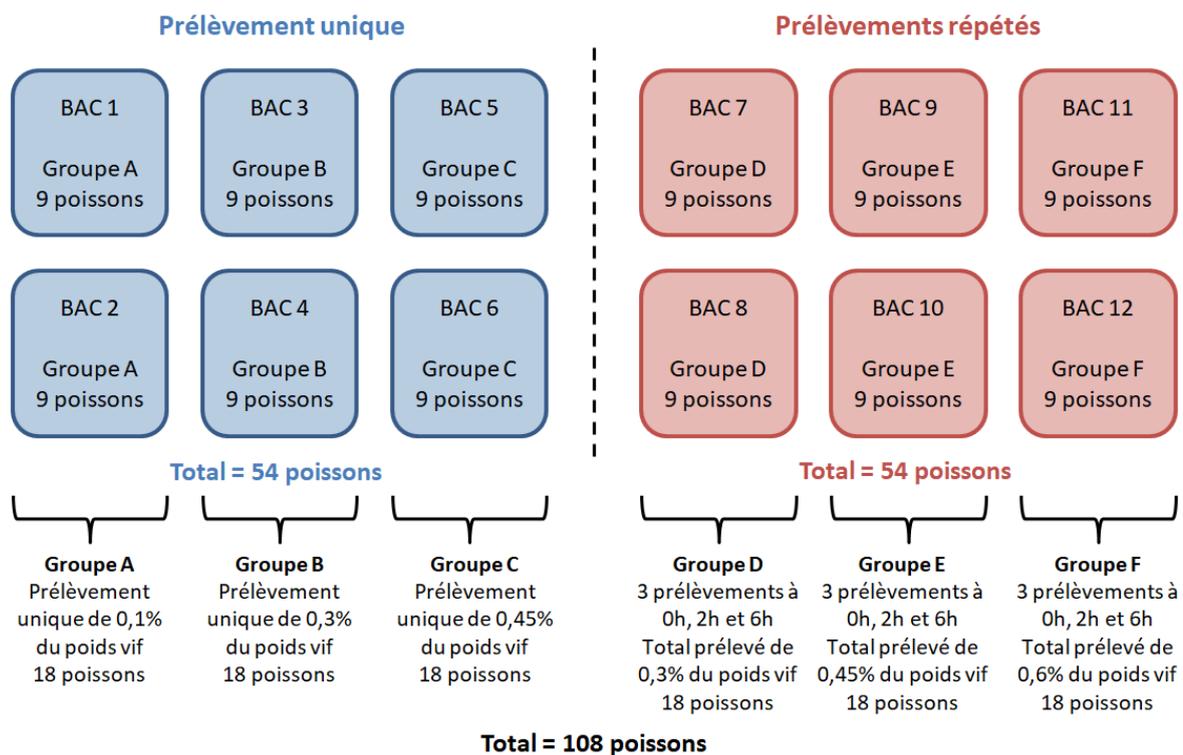


Figure 15 : Principe de la répartition des 108 poissons en 6 groupes subissant des modalités de prélèvement différentes, dans 12 bacs

Afin de ne pas générer de biais de localisation dans la salle d'expérimentation, chaque bac allant du bac 13 au bac 24 a été aléatoirement attribué à un groupe (Annexe 2).

#### b. Déroulé des différents temps de prélèvement

Les prélèvements initiaux pour les deux modalités sont réalisés le 18/03/2024. Une numération sanguine et un hémocrite sont réalisés pour chaque prélèvement afin d'obtenir des valeurs basales. Le lendemain, puis toutes les deux semaines pendant 3 mois, des prélèvements de contrôle de 0,2 mL sont réalisés sur tous les poissons afin de suivre les variables hématologiques. Un prélèvement de 0,2 mL correspond, en début d'étude, à un prélèvement en moyenne de 0,05 %

du poids vif des poissons, et au maximum de 0,06 % du poids vif des poissons (calculé sur le poisson le plus léger). En fin d'étude, à J84, ce prélèvement correspond en moyenne à 0,03 % du poids vif, avec un maximum de 0,05 % du poids vif chez le poisson le plus léger. Le planning du protocole 1 est présenté en Annexe 1.

*Tableau IX : Les différents volumes prélevés au cours de la manipulation selon le groupe auquel appartient chaque poisson. Une valeur en pourcentage correspond au pourcentage du poids vif de l'individu prélevé, tous les poissons sont prélevés du même volume à partir de J1.*

Groupe	J0 T0h	J0 T2h	J0 T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,1 % (0,4 - 0,5 mL)			0,2 mL						
B	0,3 % (1,0 - 1,4 mL)			0,2 mL						
C	0,45 % (1,5 - 2,2 mL)			0,2 mL						
D	0,1 % (0,4 - 0,5 mL)	0,1 % (0,4 - 0,5 mL)	0,1 % (0,4 - 0,5 mL)	0,2 mL						
E	0,15 % (0,5 - 0,7 mL)	0,15 % (0,5 - 0,7 mL)	0,15 % (0,5 - 0,7 mL)	0,2 mL						
F	0,2 % (0,7 - 0,9 mL)	0,2 % (0,7 - 0,9 mL)	0,2 % (0,7 - 0,9 mL)	0,2 mL						

### c. Etude du saignement à la suite des prélèvements

Suite aux prélèvements, des saignements peuvent survenir et résulter en une perte sanguine plus significative que celle anticipée, engendrant un risque de biais au sein de nos résultats. Afin de quantifier les pertes sanguines en immédiat post-prélèvement, les poissons ont été placés individuellement dans des bacs de réveil blancs contenant tous 5 L d'eau. Après réveil complet des animaux et arrêt du saignement, la couleur de l'eau est évaluée, et le saignement est classé en trois catégories différentes : absence de saignement, saignement léger, et saignement important, soit un score respectivement de 0, 1 ou 2.



Figure 16 : Scoring des saignements évalué selon la couleur des bacs. Photographie prise à la station aquacole d'Oniris. Score allant de 0 (à gauche) à 2 (à droite).

Ces scorings correspondent aux pertes de sang suivantes :

- 0 : pas de perte de sang, ou perte très inférieure à 0,25 mL
- 1 : perte de 0,25 à 0,5 mL de sang
- 2 : perte supérieure à 0,75 mL de sang



Figure 17 : Lien entre le volume de sang présent dans 5 L d'eau et le scoring de saignement. Photographie prise à la station aquacole d'Oniris.

#### d. Observation des truites arc-en-ciel suite aux prélèvements

Suite aux prélèvements initiaux, un suivi rapproché des poissons est réalisé afin d'enregistrer tout impact clinique des prélèvements sanguins sur les poissons. Les principaux indicateurs observés sont la mortalité, les modifications du comportement, le refus alimentaire, les lésions ou les anomalies tégumentaires pouvant refléter des infections par des agents pathogènes opportunistes ou tout autre signe de faiblesse ou d'absence de récupération. Les prélèvements de contrôle, toutes les deux semaines, permettent de faire un suivi du poids des animaux tout en surveillant de près l'apparition d'éventuelles lésions.

Un scoring des points limites est établi afin d'avoir une grille de critères concrets pouvant indiquer la nécessité d'euthanasier un poisson pour atteinte au bien-être animal. Ces critères incluent une nage erratique, une absence de réaction de fuite face à un stimulus, une lésion tégumentaire trop importante, ou encore une exophtalmie sévère (Annexe 3).

Le protocole a été validé par le comité d'éthique et par le ministère (APAFIS #46275-2023121214095311 v5).

#### D. Protocole 2 : suppression d'un prélèvement de contrôle à J15

56 jours après le début de l'étude, 12 nouveaux poissons sont répartis dans les bacs 11 et 12. Ces poissons proviennent du même lot livré à la station en janvier 2024 et étaient logés dans des cuves de 1000L alimentées par la même eau que les bacs utilisés pour le premier protocole. Dès leur arrivée en salle 3, en bacs de 200L, les poissons sont identifiés et prélevés d'un volume sanguin correspondant à 0,3 % de leur poids vif, suivi d'un prélèvement de contrôle de 0,2 mL le lendemain, soit la modalité B présentée dans le premier protocole. Ces poissons sont ensuite prélevés une unique et dernière fois 28 jours plus tard, afin d'évaluer l'évolution de leurs variables hématologiques. L'objectif de ce deuxième protocole est d'évaluer l'impact du prélèvement intermédiaire à J15 sur la régénération sanguine mesurée à J28. Ce groupe de poissons sera nommé le groupe B' par la suite. Le planning du protocole 2 est présenté en Annexe 1.

#### E. Justification du nombre de poissons utilisés dans les expériences

Deux modalités de prélèvement sont étudiées ici, à savoir un prélèvement unique, ou trois prélèvements répétés sur six heures d'intervalle. Pour chaque modalité, 3 pourcentages de volumes sanguins différents vont être étudiés : le volume actuellement préconisé, un volume considéré comme maximal (sa détermination s'appuie sur les normes disponibles chez les mammifères), et un volume intermédiaire se rapprochant des besoins en expérimentation animale. Cela représente 6 groupes différents. Afin de limiter l'effet bac au maximum, c'est-à-dire la possibilité qu'un bac puisse affecter les individus contenus sans que ce soit directement lié aux

manipulations, et de vérifier la répétabilité de notre protocole, nous avons décidé de travailler en duplicats (2 bacs par groupe).

Le test statistique utilisé pour définir le nombre minimal de poissons nécessaires pour une procédure donnée est un test de comparaison de moyenne pour données appariées (essai de non-infériorité), en s'appuyant sur des résultats préliminaires qui donnent un hémocrite moyen de 40 % pour un écart-type de 4,53 à partir d'un essai réalisé sur 9 truites arc-en-ciel prélevées en immédiat post-mortem dans le cadre d'une formation à la chirurgie expérimentale. Ainsi, avec 15 poissons par groupe, nous pourrions conclure à une non infériorité (0.9) pour une puissance de 0.8, un risque alpha de 0,05. 3 poissons supplémentaires sont prévus en cas de mortalité ou de distribution des données différentes des valeurs préliminaires mesurées, soit 18 poissons par groupe et un total de 108 poissons.

#### F. Standardisation des prélèvements sanguins

Les variables hématologiques présentant une variabilité élevée chez la truite arc-en-ciel, et pouvant être accentuée par un stress, il est important d'assurer une reproductibilité des différentes interventions.

Nous avons ainsi organisé nos prélèvements initiaux de manière à ce que chaque poisson soit manipulé pendant la même durée et de la manière la plus uniforme possible. De plus, un même opérateur est désigné pour réaliser l'ensemble des prélèvements de l'étude. L'influence du stress sur les paramètres hématologiques sera ainsi la plus homogène possible, bien qu'il existe une variabilité inter-individuelle potentiellement forte de la réponse de chaque animal au stress.

#### G. Analyse des prélèvements sanguins

Un essai préliminaire sur 9 truites arc-en-ciel a permis de mettre en évidence la possibilité d'utiliser un automate pour réaliser des numérations sanguines. En effet, bien que les valeurs de numération globulaire et de taux d'hémoglobine soient inférieures aux valeurs obtenues manuellement, elles sont uniformes et cohérentes, ainsi jugées satisfaisantes pour cette étude. Cependant, l'hématocrite étant un marqueur important de la régénération sanguine dans notre étude, il sera réalisé manuellement car jugé plus fiable. Ces modes d'analyse ont été validés par N. Soetart, praticien hospitalier en pathologie clinique à LabOniris (Annexe 4). La numération globulaire, le taux d'hémoglobine et la numération leucocytaire sont mesurées par l'automate XN-1000 V (Sysmex).

Les prélèvements ont été réalisés avec des seringues de 1 à 2,5 mL, selon le groupe d'appartenance du poisson. Chaque seringue est préalablement remplie puis vidée avec de l'héparine (Heparine Choay, 25000 UI / 5 mL héparine sodique) afin de ne pas avoir de caillots qui empêcheraient la réalisation des analyses hématologiques. Pour les premiers prélèvements de

faibles volumes, à J1, J15, J28 et J42, il n'y a pas eu d'attention particulière quant au volume mort d'héparine restant dans les seringues. Avant J56, il a été quantifié à environ 0,04 mL ( $\pm$  0,02 mL), ce qui représente près de 17 % du volume de sang prélevé (entre 8 et 25 %), et peut de ce fait engendrer une dilution artefactuelle. À partir de J56, le volume résiduel d'héparine dans les seringues a été strictement contrôlé, pour ne représenter que moins de 5 % du volume de sang prélevé. Tous les lots ont été gérés de la même façon, rendant le biais identique pour tous les groupes. L'héparine a été privilégiée plutôt que l'EDTA comme anticoagulant car elle permet des résultats plus fiables lors d'analyses de sang de truite arc-en-ciel par l'automate utilisé à LabOniris (Canovas *et al.*, date non renseignée ; Maqbool *et al.*, 2014).

Afin de limiter le biais de la variabilité inter-individuelle non négligeable chez les poissons, chaque variable hématologique est étudiée sous forme d'index représentant le pourcentage de sa valeur initiale. De plus, le groupe A, correspondant à la modalité représentant les recommandations actuelles du CCPA, sera considéré comme le lot témoin afin de réduire la variabilité des résultats liée à tout facteur externe ayant pu impacter l'ensemble des prélèvements (notamment l'effet dilution présenté ci-dessus).

#### H. Analyse statistique

Afin de répondre aux différentes questions biologiques, différentes approches statistiques sont mises en place.

La comparaison de l'ensemble des variables à celles du groupe A, notre lot témoin, permet de souligner l'impact de chaque modalité de prélèvement par rapport à ce référentiel. Les échantillons sont considérés comme indépendants et, au vu du faible nombre d'individus dans chaque lot, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis avec un risque d'erreur de première espèce fixé à 0,05 est utilisé afin de comparer les paramètres biologiques et zootechniques de chaque groupe à ceux du groupe A, à chaque temps de prélèvement. Cela sera réalisé à partir du rapport des index des différents groupes avec ceux du groupe A.

La récupération à la suite du prélèvement initial est évaluée en comparant, pour chaque poisson, les valeurs obtenues au temps T aux valeurs mesurées à T0h. Ainsi, chaque poisson est son propre témoin, ce qui permet de s'affranchir de la variabilité inter-individuelle. Deux modèles statistiques distincts ont été utilisés. Tout d'abord, un modèle mixte linéaire a été utilisé. Il avait pour objectif d'évaluer l'effet du temps, du groupe et de leur interaction sur les différentes variables mesurées. Deux effets aléatoires ont été utilisés, un effet aléatoire bac et un effet aléatoire poisson. Des tests post-hoc ont ensuite été utilisés pour évaluer si les valeurs d'une variable à un temps donné étaient significativement différentes de celles à J0 dans les différents groupes.

La seconde approche est une analyse de survie correspondant au délai de survenue d'un événement, soit dans notre étude la récupération de 85 % de la valeur initiale de la variable

étudiée à J0. Si Nahas *et al.* (2000) ont utilisé un seuil de 90 % dans leur étude, nous avons opté pour un seuil de 85 % afin de compenser la très forte variabilité intra-individuelle présente chez les poissons au cours du temps. Une estimation de Kaplan-Meier ainsi qu'un modèle de Cox avec un terme de fragilité bac, sont utilisés pour cette analyse, permettant d'estimer respectivement la proportion d'individus qui récupèrent au bout d'un certain temps et la probabilité pour la totalité des individus d'un groupe de récupérer des variables hématologiques à 85 % de leurs valeurs initiales. Les résultats des modèles de Cox sont présentés sous forme de Hazard Ratio (HR). Un HR supérieur à 1 signifie que la modalité du facteur augmente la probabilité d'occurrence de l'évènement (ici la récupération de 85 % de la valeur initiale) par rapport à la modalité de référence du facteur, et inversement si le HR est inférieur à 1. Si l'intervalle de confiance du HR ne contient pas la valeur 1, ce dernier est statistiquement significatif.

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé sous le logiciel R (version 2024.04.0).

### III. Résultats

#### A. Protocole 1 : Suivi de paramètres biologiques et zootechniques toutes les deux semaines suite à 6 modalités de prélèvement différentes

##### a. Croissance des poissons au cours de l'étude

##### 1. Poids réel

Dans l'ensemble des groupes, les poissons présentent une croissance satisfaisante, avec un poids moyen d'environ 400 g en début d'étude allant jusqu'à parfois 700 g en fin d'étude. La croissance dans l'ensemble des bacs reste homogène pendant la totalité de la durée de l'étude.

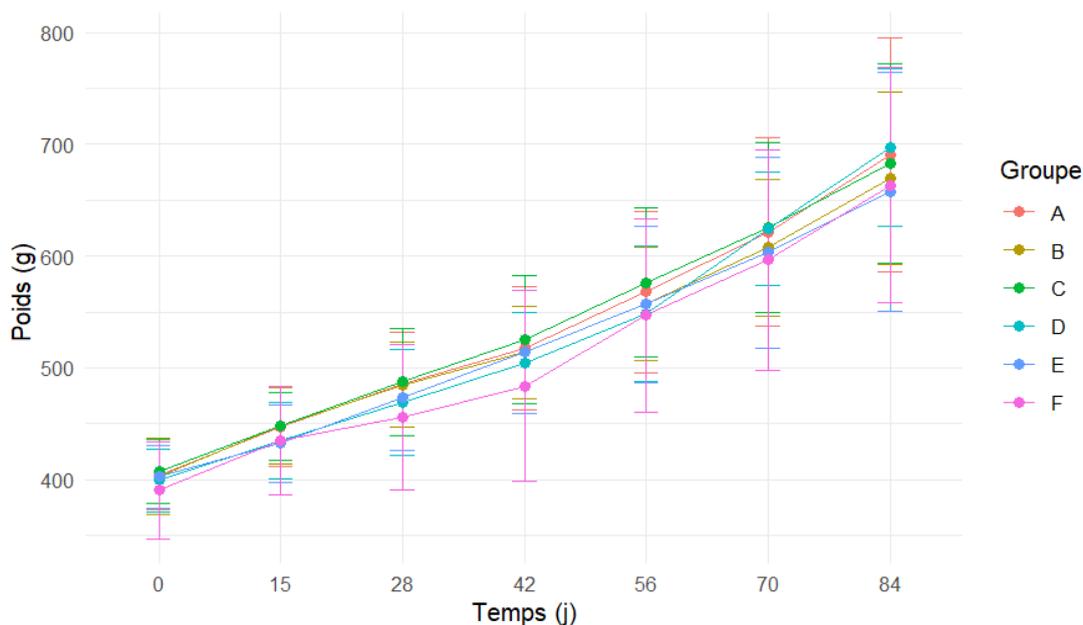


Figure 18 : Evolution du poids moyen des poissons par groupe à chaque temps de prélèvement

Malgré l'homogénéité du poids moyen selon les groupes, on observe quelques divergences au sein des groupes dans la Figure 19, avec certains poissons dont le poids augmente rapidement, et d'autres dont le poids augmente très peu, voire diminue entre deux prélèvements de contrôle. Ces variations sont présentes de manière plus ou moins importante dans l'ensemble des groupes, mais pas dans l'ensemble des bacs (Figure 20). Ainsi, seulement dans certains bacs, comme les bacs 13 et 16 par exemple, on observe un individu qui présente une croissance moindre, et un autre qui présente une croissance plus importante que le reste du bac. Des rapports de dominance et de soumission ont pu être visualisés au cours de l'étude, les bacs les plus touchés étant les bacs 13, 16 et 21.

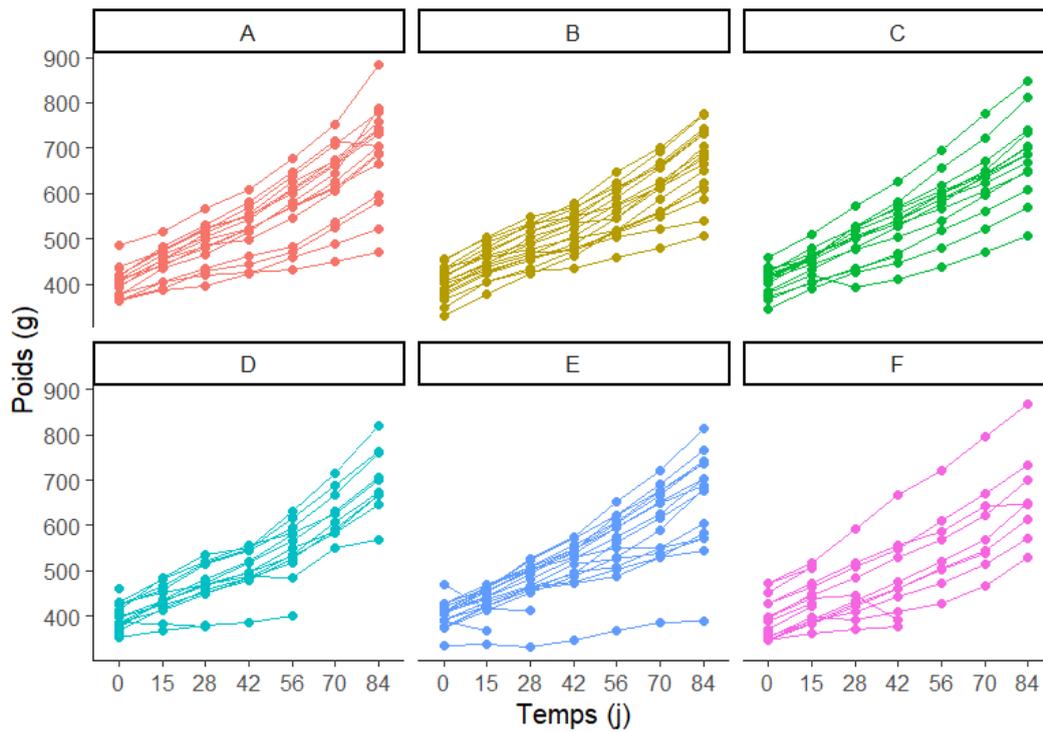


Figure 19 : Evolution du poids des poissons par groupes à chaque temps de prélèvement

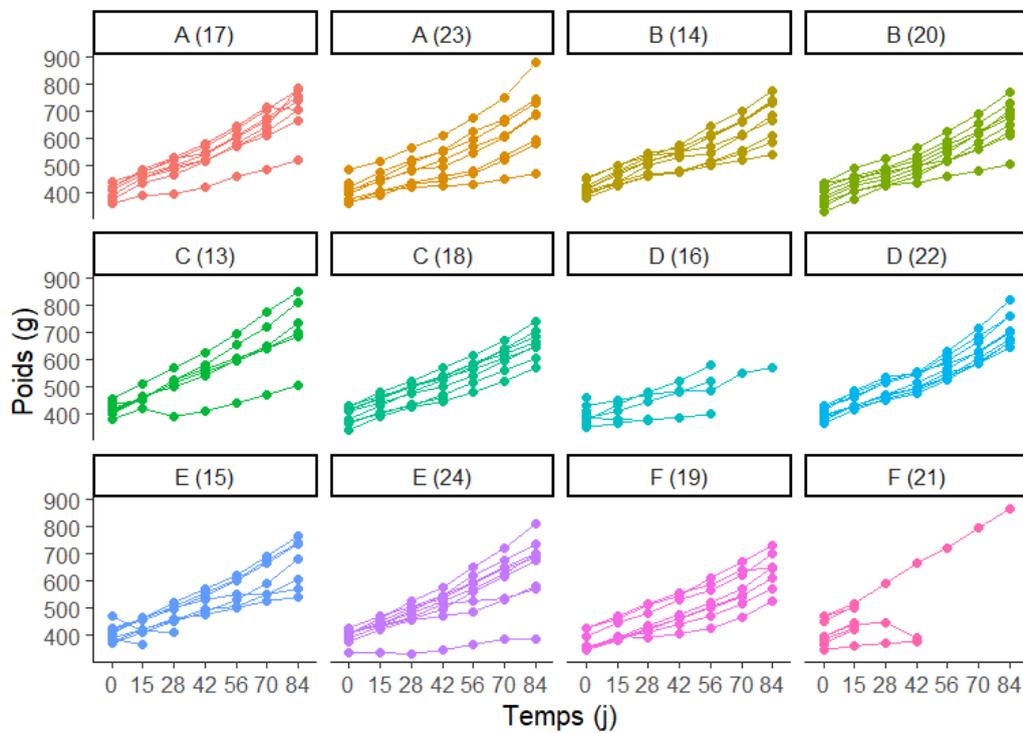


Figure 20 : Evolution du poids des poissons par bac à chaque temps de prélèvement

## 2. Gain de poids

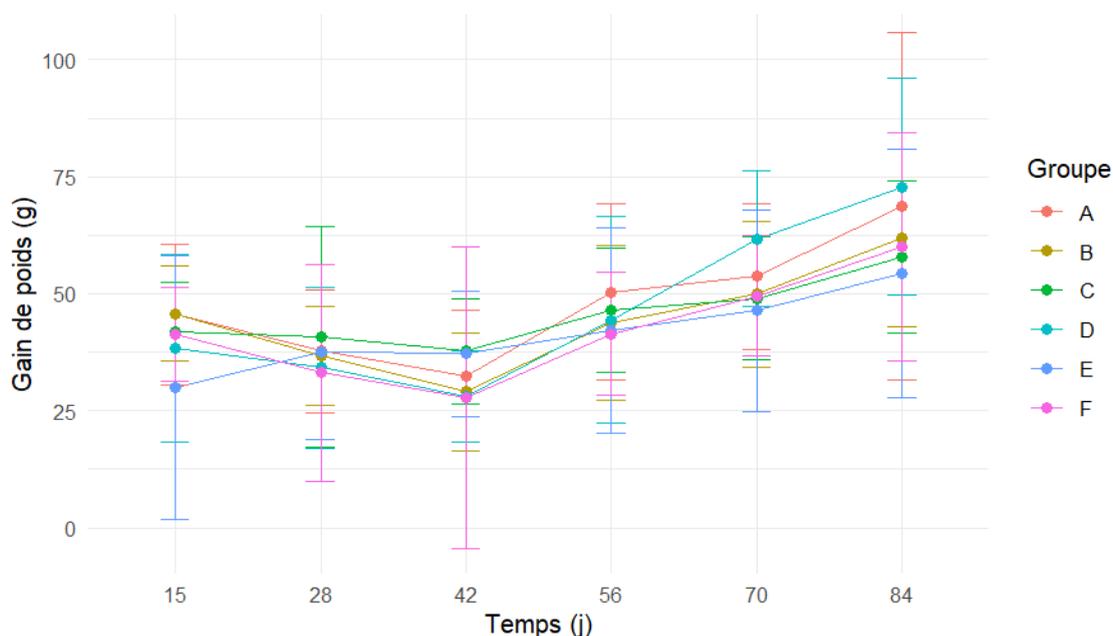


Figure 21 : Evolution du gain de poids moyen des poissons par groupe à chaque temps de prélèvement

Le gain de poids correspond à l'augmentation du poids entre deux prélèvements de contrôle chez un même poisson. Ainsi, le gain de poids au 15<sup>ème</sup> jour de l'étude (J15) correspond à la différence entre le poids à J15 et le poids à J0, et le gain de poids à J28 à la différence entre le poids à J28 et à J15.

Aucune variation significative du gain de poids n'est visible entre les groupes. Cependant, on observe une stagnation du gain de poids moyen pour l'ensemble des groupes entre J15 et J42 (Figure 21).

### b. Mortalité

L'ensemble des poissons euthanasiés au cours de l'étude l'étaient pour atteinte du point limite "lésions manifestées par une absence visible d'épiderme sur une surface supérieure à 1 cm<sup>2</sup>" (Annexe 3). Ce point limite avait été défini historiquement à cause de précédentes infections à *Saprolegnia* dans la station aquacole. Bien que certains animaux aient été euthanasiés avant l'apparition des lésions spécifiques de cette maladie opportuniste, des lésions pathognomoniques de la saprolégniose ont été observées au cours de cette étude sur plusieurs poissons pour lesquels l'évolution de la maladie a été très rapide. De fait, les poissons qui ont été euthanasiés pendant cette étude peuvent être considérés comme souffrant de saprolégniose, même si leur euthanasie a parfois précédé la survenue des signes cliniques habituels. Seul un poisson a été retrouvé mort

dans son bac 51 jours après le début des manipulations, et ne présentait pas le même type de lésions (B18P9).

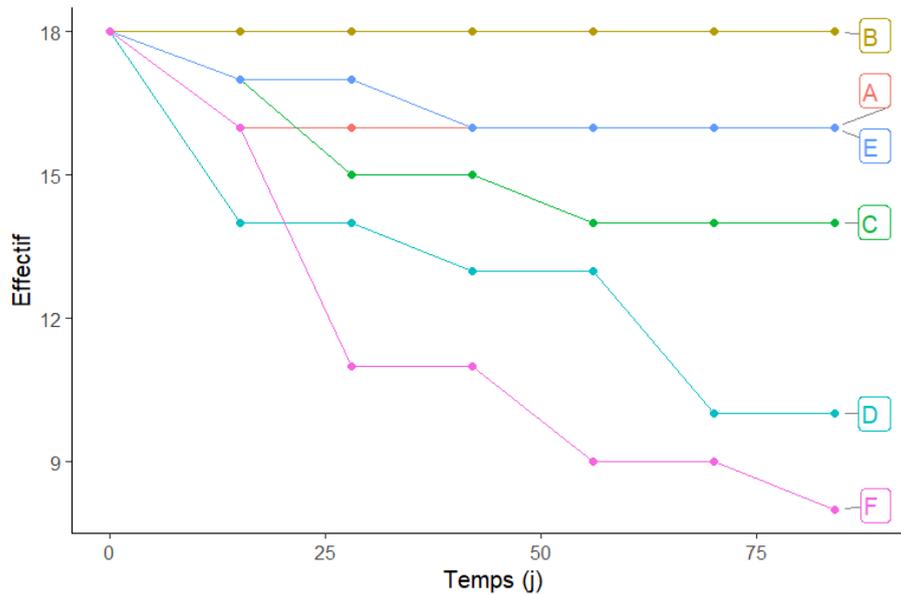


Figure 22 : Evolution de l'effectif des poissons par groupes au cours du temps

Le groupe D est le groupe avec le moins d'effectifs avant J15, avec 4 poissons euthanasiés avant J12. Le groupe F compte une quantité importante de poissons euthanasiés entre J15 et J28. Ceci a des répercussions non négligeables sur les effectifs de l'ensemble de l'étude puisqu'à partir de J56, le groupe F n'est constitué que de 9 poissons, soit la moitié de l'effectif initial (Figure 22 et 23).

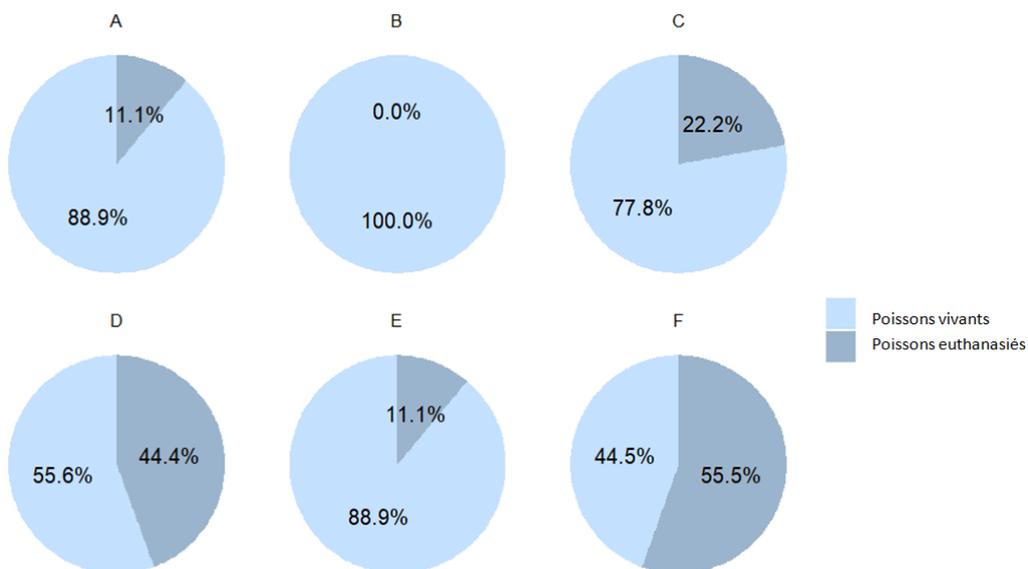


Figure 23 : Pourcentage de poissons ayant été euthanasiés pour atteinte de point limite par groupe

Les effectifs par bac dans la Figure 24 permettent de souligner la perte d'effectifs aiguë dans les bacs 16 et 21, qui terminent l'étude avec chacun seulement un poisson. Les autres bacs maintiennent des courbes d'effectifs correctes dans l'ensemble.

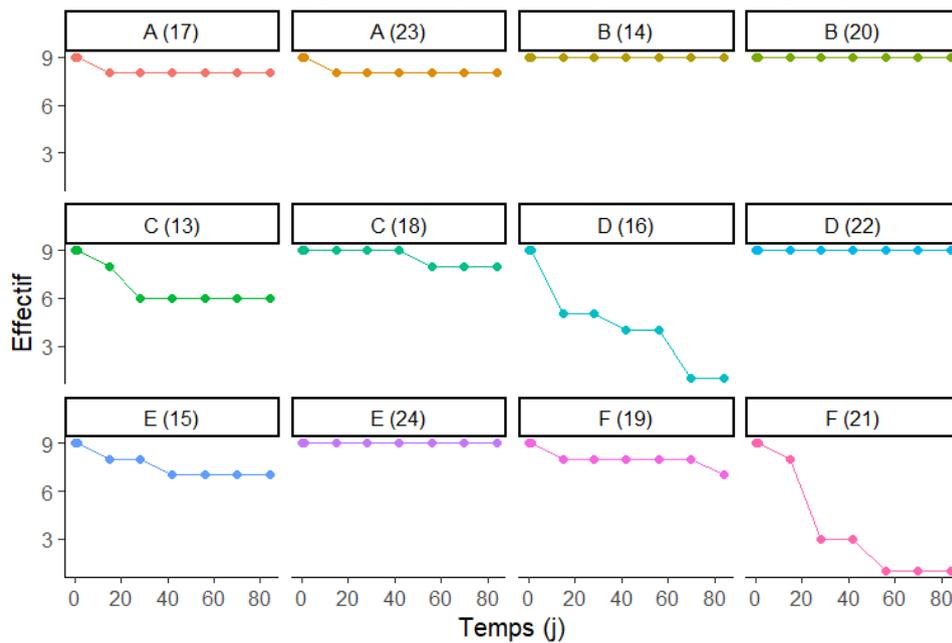


Figure 24 : Evolution de l'effectif des poissons par bac au cours du temps

c. Evolution des variables hématologiques au cours des prélèvements répétés à J0 (groupes D, E et F)

Pour trois modalités (D, E et F), le volume de sang total est prélevé en trois fois à 2h puis 4h d'intervalle (T0h, T2h, T6h). Le suivi des variables hématologiques à chacun de ces prélèvements permet de contrôler l'impact local et direct des prélèvements sans laisser le temps à certains mécanismes d'adaptation de la volémie et de la lignée rouge de prendre place. Les résultats sont présentés dans la Figure 25.

La Figure 26 met en évidence un lien entre le volume prélevé et la diminution des paramètres hématologiques. Quand le groupe D ne présente pas de diminution significative de sa numération globulaire et de son taux d'hémoglobine au cours des différents prélèvements des 24h premières heures d'expérimentation, le groupe E présente un écart significatif à la suite de son 4<sup>ème</sup> prélèvement (T24h), tandis que le groupe F en présente dès son 3<sup>ème</sup> prélèvement (T6h). L'hématocrite, quant à lui, présente une chute plus rapide avec un écart significatif à la valeur de T0h dès le 2<sup>ème</sup> prélèvement (T2h) pour les groupes E et F, et au 3<sup>ème</sup> prélèvement (T6h) pour le groupe D.

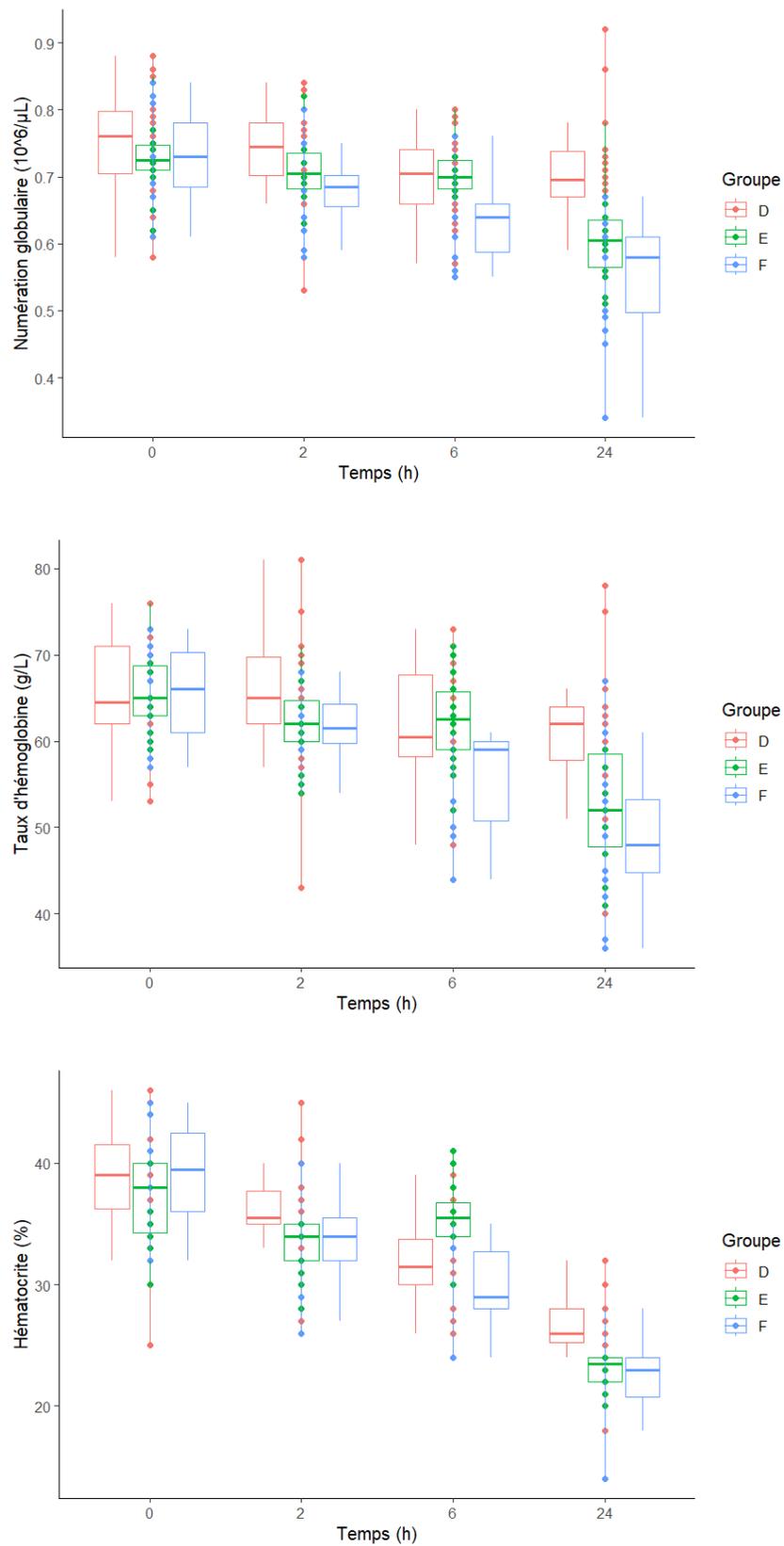


Figure 25 : Evolution de la numération globulaire (haut), du taux d'hémoglobine (milieu) et de l'hématocrite (bas) entre J0 et J1

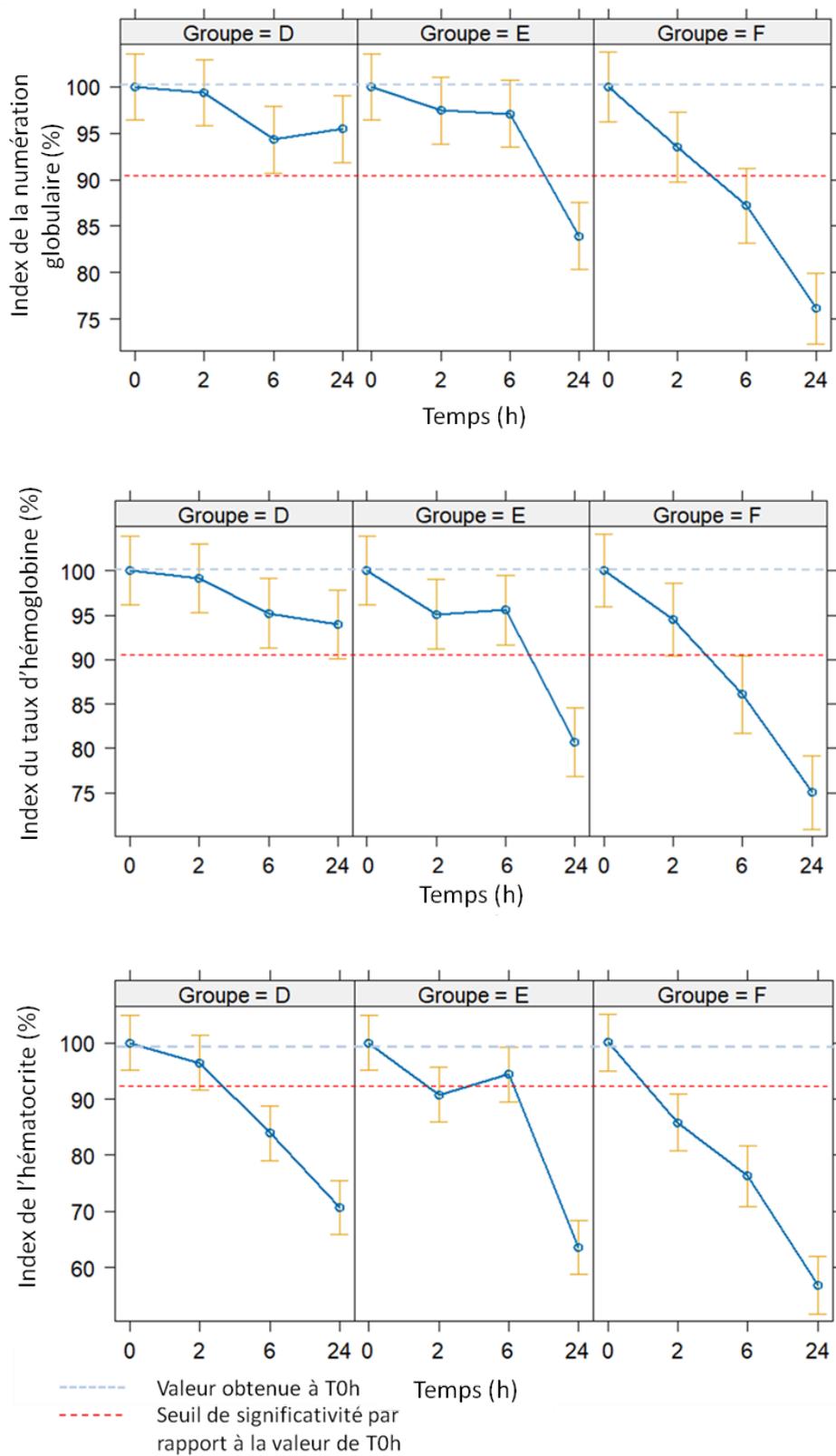


Figure 26: Evolution de l'index de la numération globulaire (haut), du taux d'hémoglobine (milieu) et de l'hématocrite (bas) entre J0 et J1

d. Variables hématologiques de la lignée rouge

1. Description de l'évolution de la lignée rouge

i. Numération globulaire

Comme le montre la Figure 27, l'ensemble des groupes étudiés présentent une courbe similaire avec une numération globulaire non significativement différente des valeurs initiales à partir de J56, correspondant au moment à partir duquel la dilution des prélèvements par l'héparine a été limitée.

Les groupes les moins prélevés, à savoir les groupes A et D, ont une numération globulaire qui chute plus lentement, présentant des écarts significatifs par rapport à leur valeur basale uniquement à partir de J15, contrairement aux autres groupes. Pour rappel, le volume total prélevé est le même entre les groupes B et D, et C et E, mais ce volume total est prélevé en trois fois pour D et E. Le groupe D a été prélevé 3 fois le volume du groupe A, et le groupe F 6 fois le volume du groupe A.

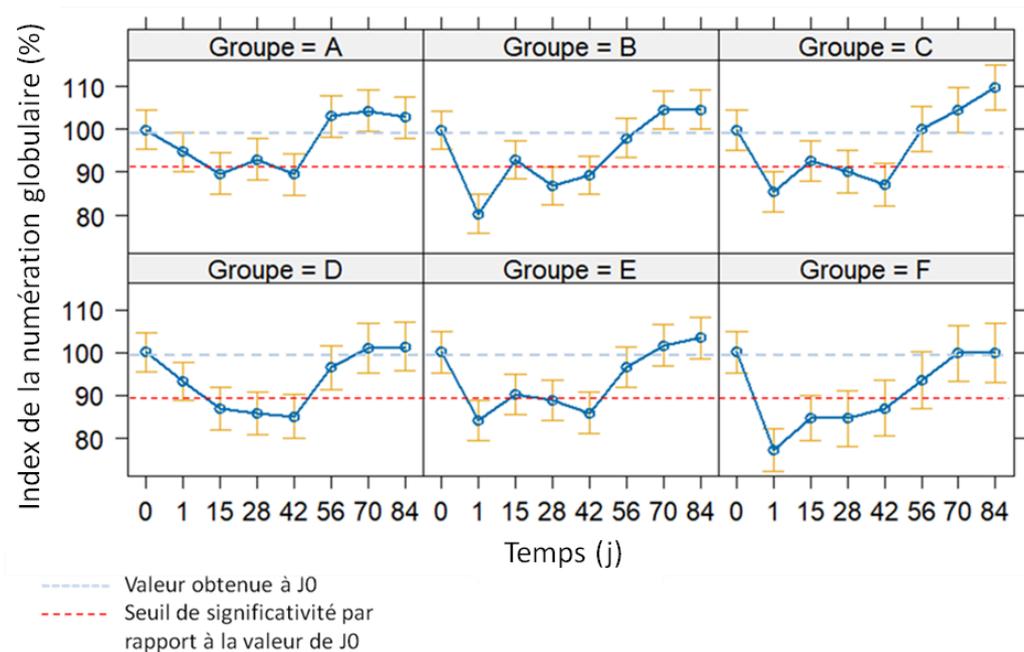


Figure 27 : Evolution de l'index de la numération globulaire par groupe à chaque temps de prélèvement

ii. Taux d'hémoglobine

De la même manière que la numération globulaire, dans la Figure 28, le taux d'hémoglobine des groupes B, C, E et F chute dès J1 à des valeurs significativement différentes, tandis que celui des groupes A et D ne chute qu'à J15. Si les groupes prélevés initialement en une

seule fois (A, B, C) présentent un retour à des valeurs proches de leurs valeurs basales dès J56, c'est plus tardif pour les groupes prélevés en trois fois avec des valeurs revenues à des valeurs proches de la situation initiale à J70 voire J84.

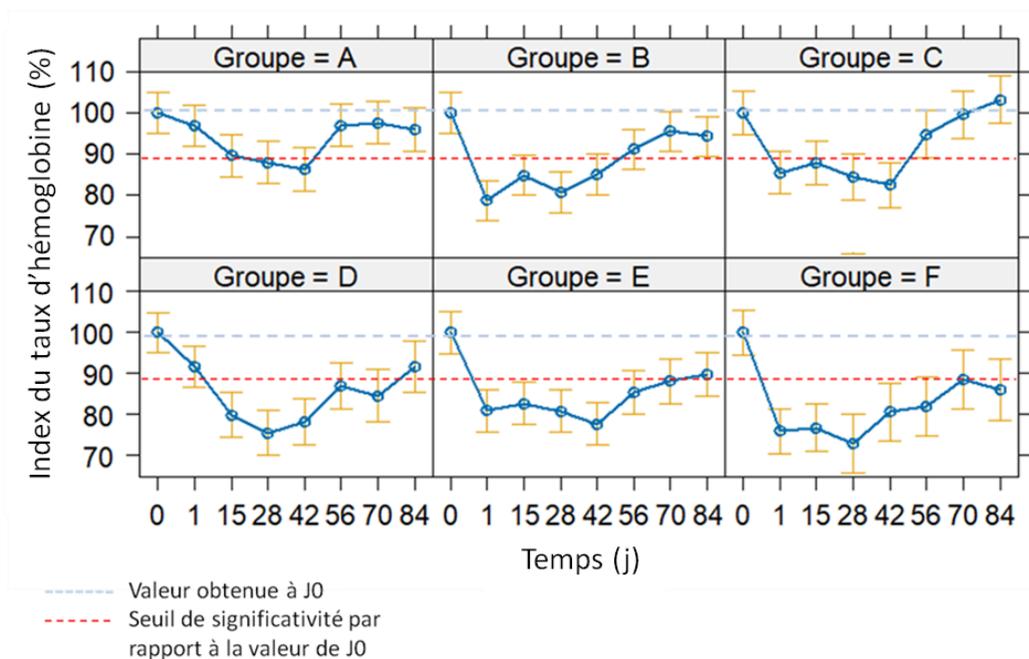


Figure 28 : Evolution de l'index du taux d'hémoglobine par groupe à chaque temps de prélèvement

### iii. L'hématocrite

L'hématocrite diminue fortement pour l'ensemble des groupes à J1, puis augmente progressivement (Figure 29). Seuls les groupes A, B et C récupèrent un hématocrite non significativement différent de celui à J0, respectivement à J56 pour le groupe A, et à J84 pour les groupes B et C. Les groupes D, E et F ne retrouvent pas un hématocrite proche de leur hématocrite initial.

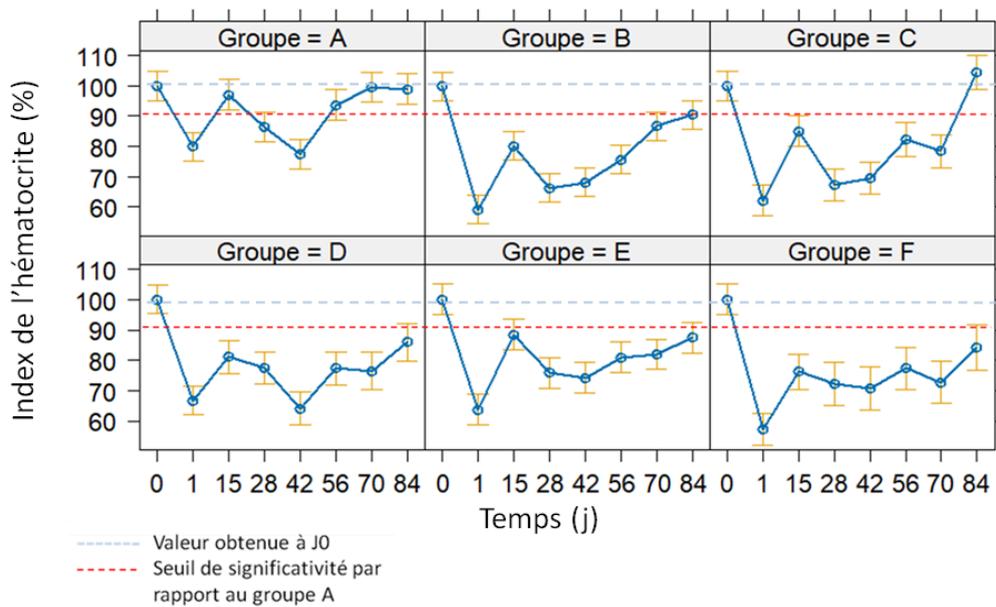


Figure 29 : Evolution de l'index de l'hématocrite par groupe à chaque temps de prélèvement

#### iv. Le VGM

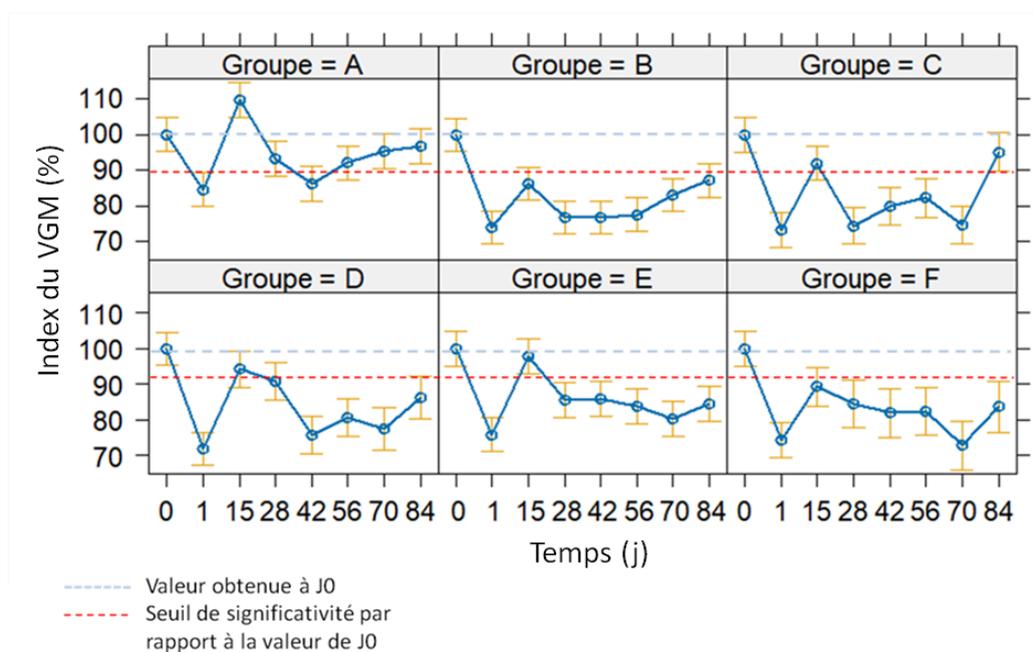


Figure 30 : Evolution de l'index du VGM par groupe à chaque temps de prélèvement

Pour l'ensemble des groupes, le VGM diminue à J1, marque un pic significatif autour de J15, puis augmente de nouveau plus progressivement à partir de J28-J42 (Figure 30).

v. La CCMH

A l'inverse du VGM, on observe dans la Figure 31 que la CCMH présente un pic marqué à J1.

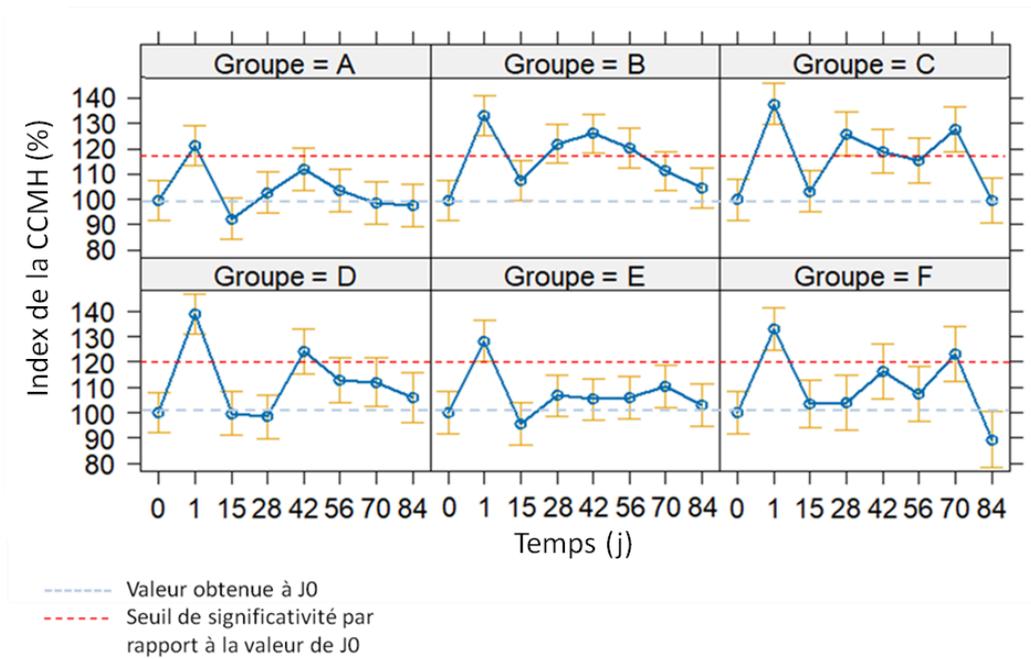


Figure 31 : Evolution de l'index de la CCMH par groupe à chaque temps de prélèvement

vi. La TCMH

Pour l'ensemble des groupes, la TCMH diminue progressivement vers des valeurs de plus en plus éloignées par rapport à J0. Cette diminution est plus rapide pour les groupes D, E et F que pour les groupes A, B et C (Figure 32).

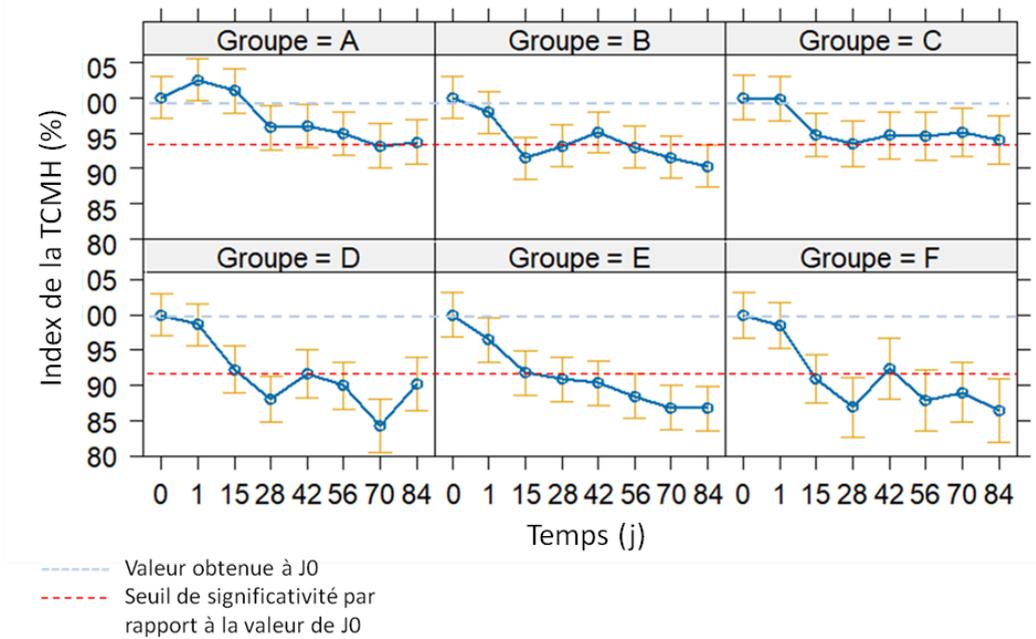


Figure 32 : Evolution de l'index de la TCMH par groupe à chaque temps de prélèvement

## 2. Comparaison au groupe témoin : le groupe A

### i. Comparaison des index

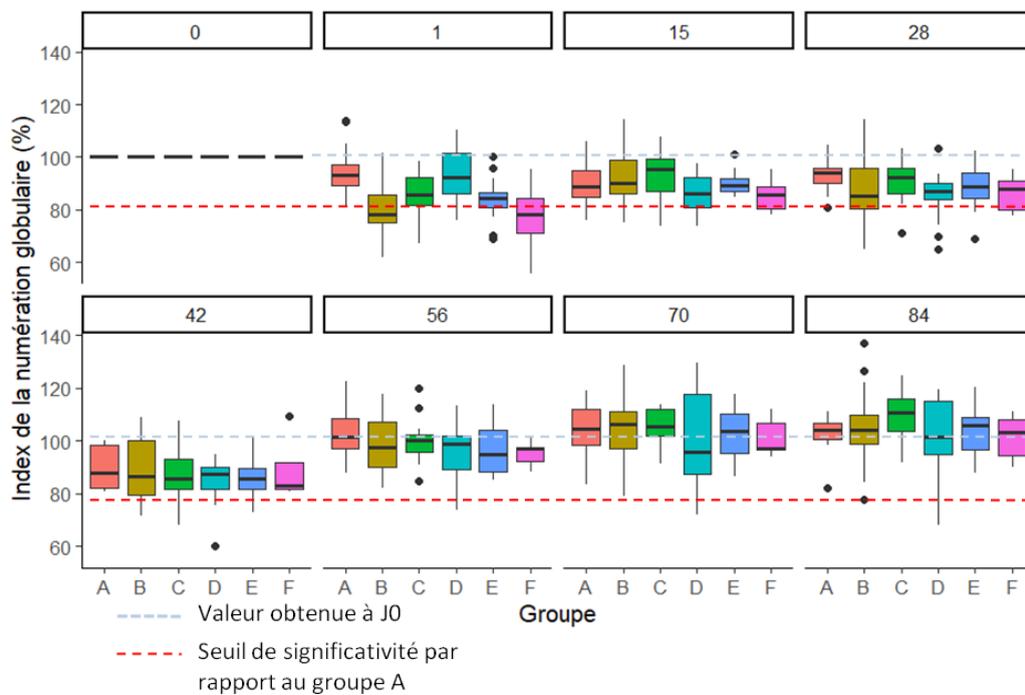


Figure 33 : Evolution de l'index de la numération globulaire à chaque temps de prélèvement selon le groupe

La comparaison des résultats sous forme d'index aux résultats du groupe A à chaque temps de prélèvement est analysée par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Elle révèle une absence de différences significatives par rapport au groupe A pour l'ensemble des groupes à partir de J15 pour la numération globulaire (Figure 33), et à partir de J42 pour le taux d'hémoglobine (Figure 34).

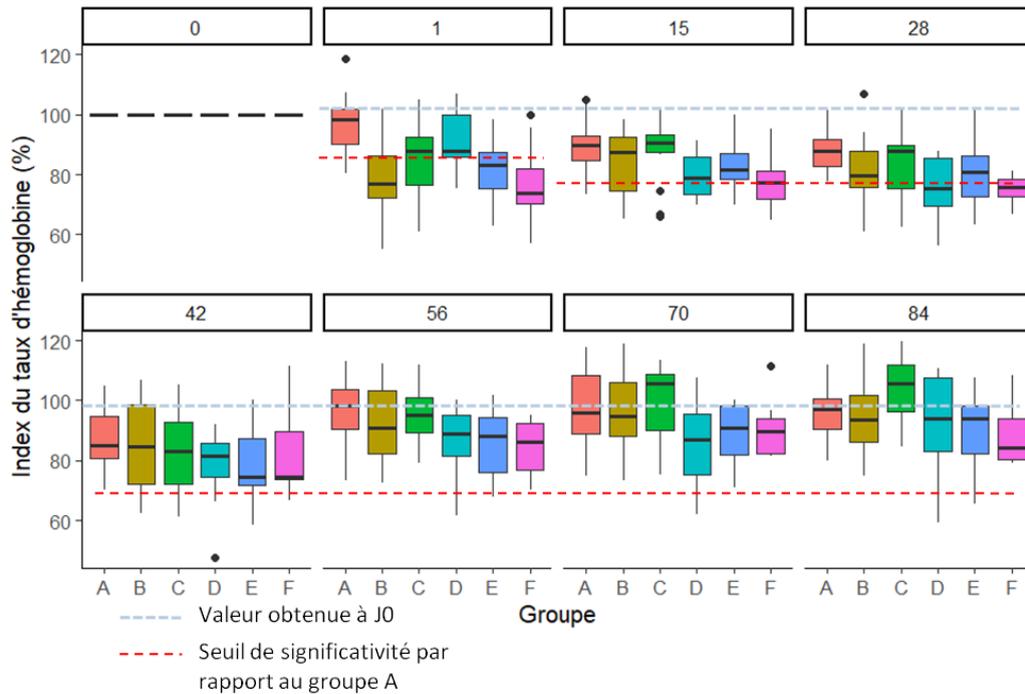


Figure 34 : Evolution de l'index de la numération globulaire à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Quant à l'hématocrite, présenté dans la Figure 35, il oscille tout au long de l'étude avec une absence de différences significatives pour tous les groupes à J42 et à J84 sans se stabiliser. Les groupes C et E présentent le moins de différences significatives de valeurs d'hématocrite par rapport au groupe A pendant la durée de l'étude.

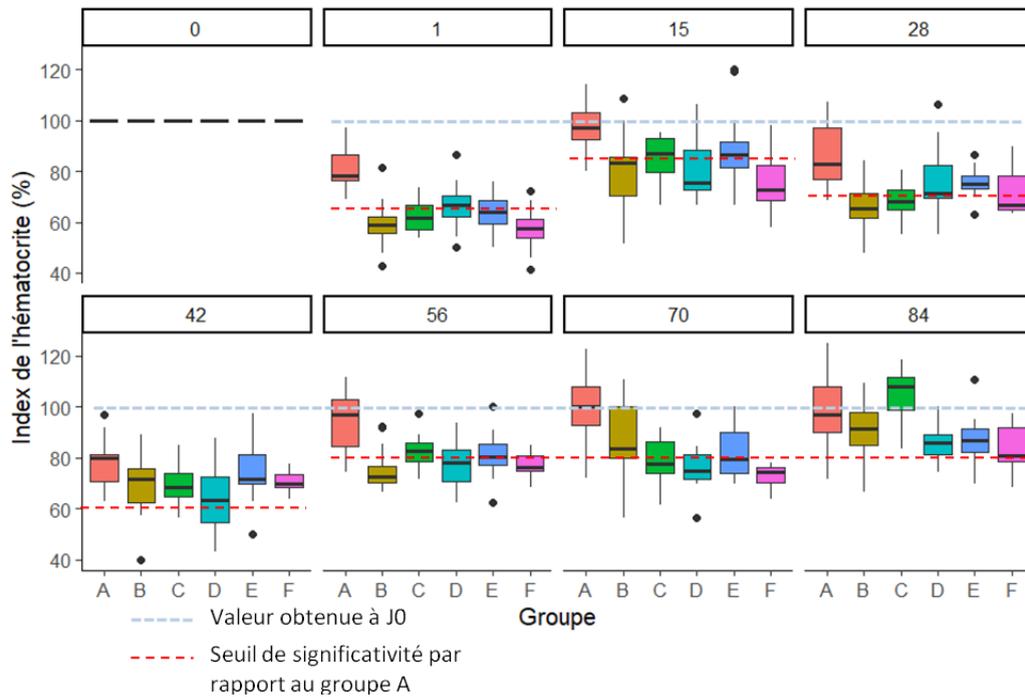


Figure 35 : Evolution de l'index de la numération globulaire à chaque temps de prélèvement selon le groupe

ii. Utilisation d'un rapport avec le groupe témoin

L'analyse des résultats sous forme de rapport avec le groupe A met en évidence une absence de variations significatives de la numération globulaire et du taux d'hémoglobine pour tous les groupes dès J15, présentés respectivement dans les Figures 36 et 37.

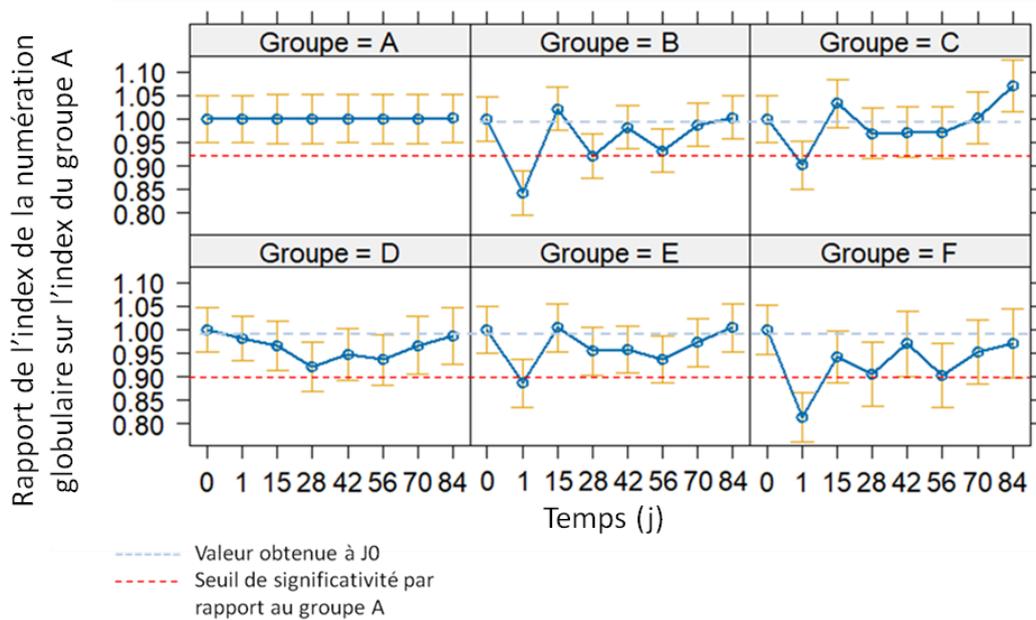


Figure 36 : Evolution du rapport de l'index de la numération globulaire de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

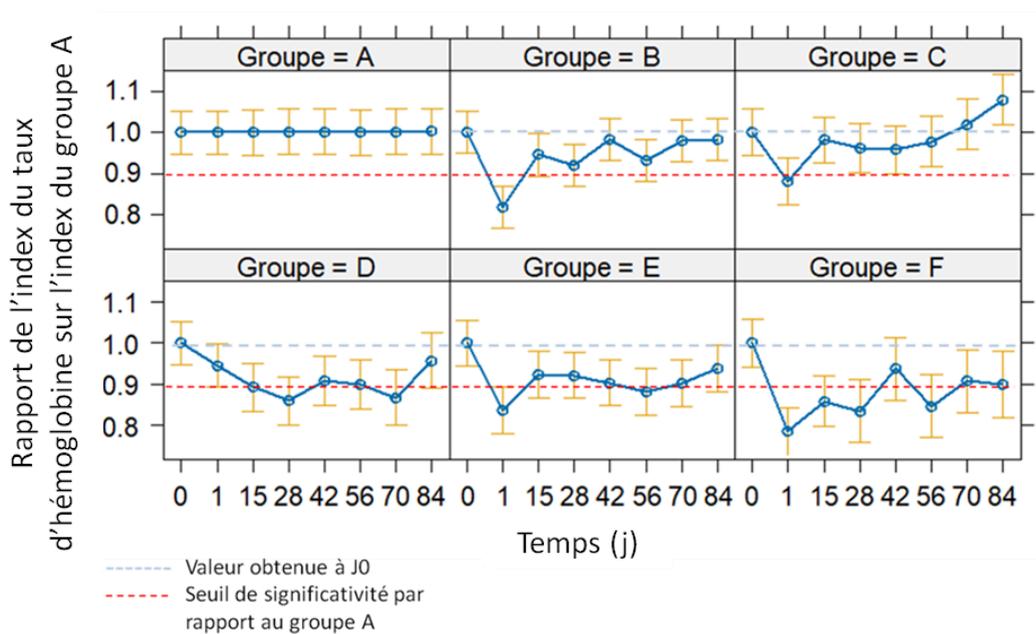


Figure 37 : Evolution du rapport de l'index du taux d'hémoglobine de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Comme le montre la Figure 38, pour tous les groupes, le rapport de l'hématocrite mesuré dans le lot étudié avec celui mesuré pour le groupe A ne présente pas de tendance nette à remonter au-dessus du seuil de significativité au cours des 84 jours d'observation.

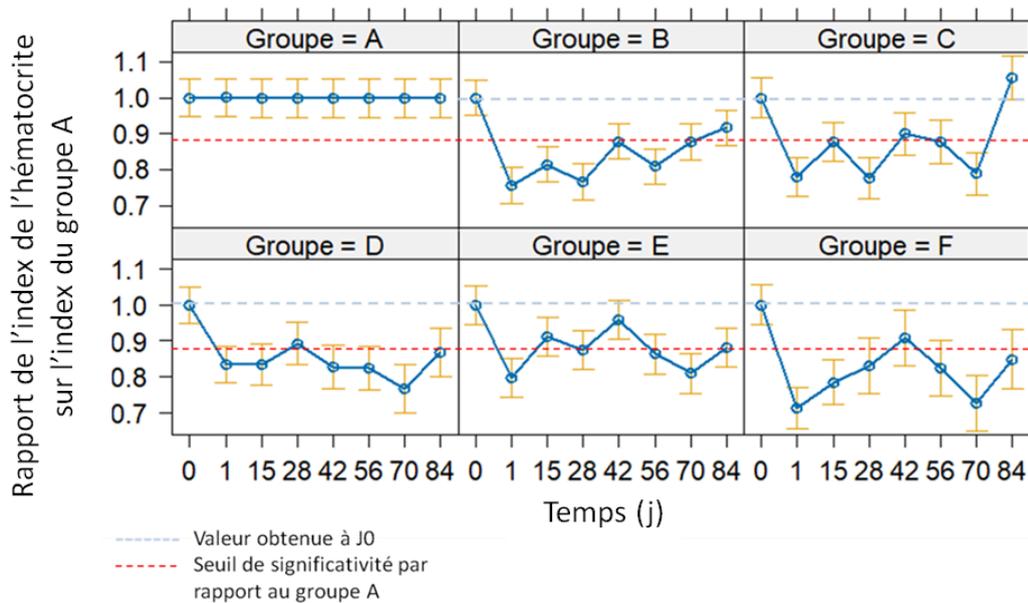


Figure 38 : Evolution du rapport de l'index de l'hématocrite de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

### 3. Récupération des variables initiales

Le modèle de récupération des variables hématologiques, analogue d'un modèle d'analyse de survie, est présenté dans les Figures 39, 40 et 41. Il permet de souligner le pourcentage d'individus ayant récupéré au moins 85 % de leur valeur à J0 pour une variable donnée au cours du temps. La récupération de la numération globulaire ne diverge pas significativement selon les groupes, avec une p-value > 0,05 (Tableau X). Selon les estimations de ce modèle, 50 % des poissons ont récupéré au bout de 56 jours.

Concernant le taux d'hémoglobine, seul le groupe C ne diverge pas significativement du groupe A avec une récupération de 85 % du taux d'hémoglobine initial de plus de 50 % des poissons à J56, tandis que les autres groupes atteignent ce seuil à J70, voire à J84.

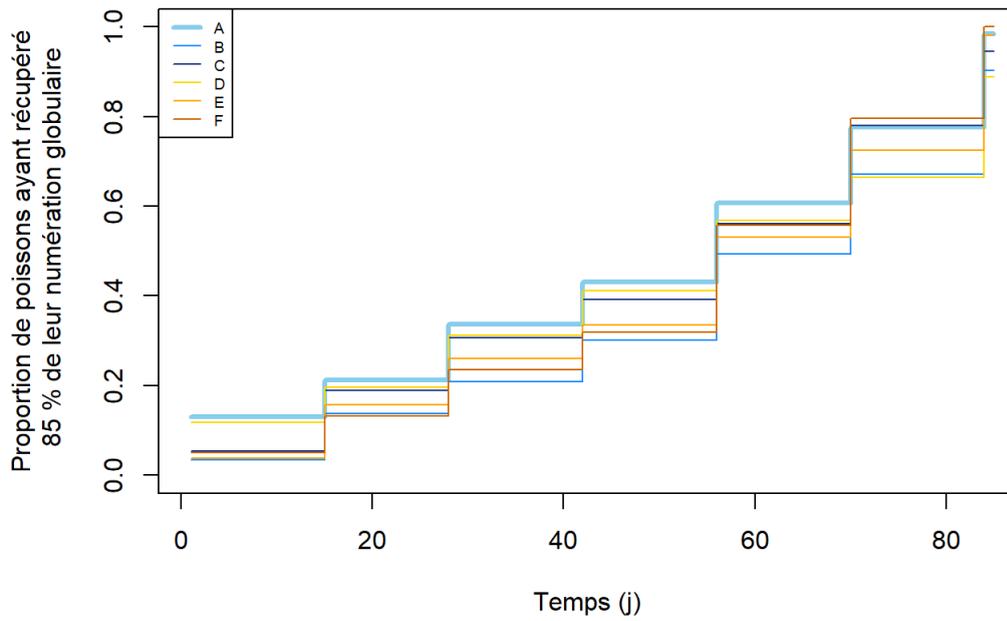


Figure 39 : Modèle de récupération des variables hématologiques, étudiant la récupération de 85 % de la numération globulaire initiale selon les groupes au cours du temps

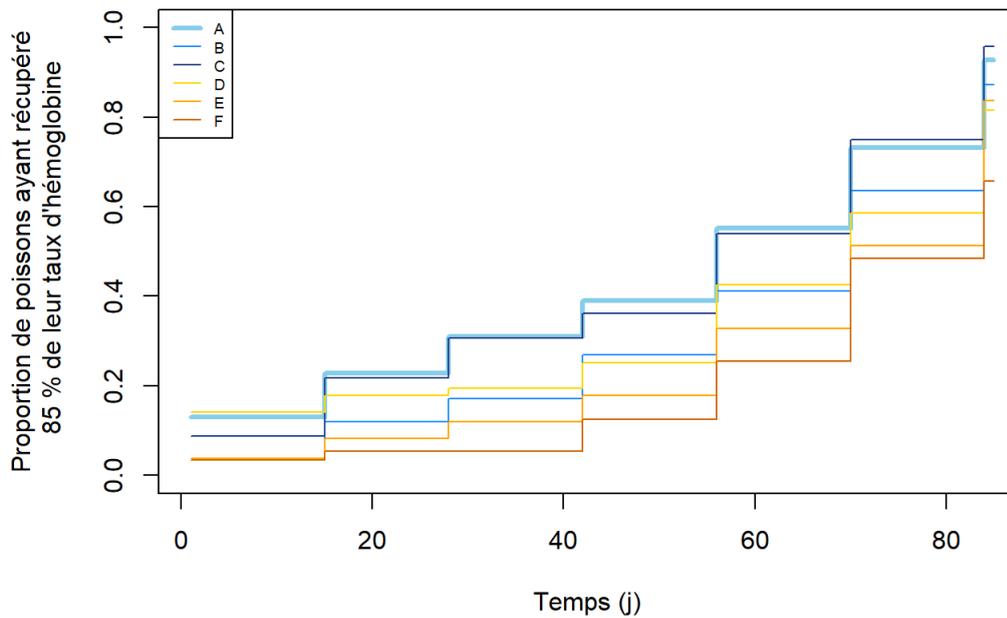


Figure 40 : Modèle de récupération des variables hématologiques, étudiant la récupération de 85 % du taux d'hémoglobine initiale selon les groupes au cours du temps

Enfin, l'ensemble des groupes récupèrent leur hématokrite plus lentement que le groupe A et atteignent moins de 70 % de récupération de l'hématocrite à J84, tandis que le groupe A atteint 50 % d'effectifs ayant récupéré à J70.

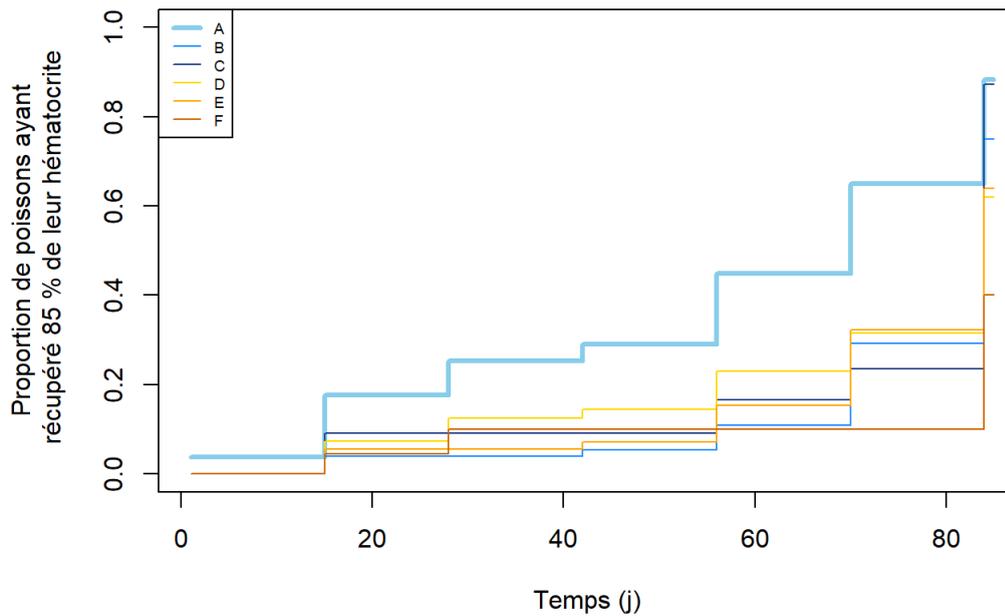


Figure 41 : Modèle de récupération des variables hématologiques, étudiant la récupération de 85 % de l'hématocrite initial selon les groupes au cours du temps

Tableau X : Hazard ratios issus du modèle de Cox permettant de comparer les risques de récupération de 85 % des valeurs initiales des différents groupes avec pour référence le groupe A

Variable	Groupe	Hazard ratio (HR)	Intervalle de confiance (95 %)	p-value
Numération globulaire	B	0,364	0,18 - 0,73	0,004
	C	0,400	0,19 - 0,82	0,012
	D	0,448	0,22 - 0,92	0,028
	<b>E</b>	<b>0,555</b>	<b>0,27 - 1,14</b>	<b>0,110</b>
	F	0,278	0,12 - 0,63	0,002
Taux d'hémoglobine	B	0,275	0,13 - 0,57	$5,3 \times 10^{-4}$
	<b>C</b>	<b>0,592</b>	<b>0,29 - 1,20</b>	<b><math>1,4 \times 10^{-1}</math></b>
	<b>D</b>	<b>0,527</b>	<b>0,25 - 1,09</b>	<b><math>8,6 \times 10^{-2}</math></b>
	E	0,216	0,10 - 0,47	$1,4 \times 10^{-4}$
	F	0,117	0,04 - 0,32	$3,6 \times 10^{-5}$
Hématocrite	B	0,158	0,07 - 0,34	$3,0 \times 10^{-6}$
	C	0,176	0,08 - 0,39	$2,0 \times 10^{-5}$
	D	0,225	0,10 - 0,51	$3,7 \times 10^{-4}$
	E	0,179	0,08 - 0,39	$1,6 \times 10^{-5}$
	F	0,115	0,04 - 0,31	$1,4 \times 10^{-5}$

Par ailleurs, l'ordre décroissant des HR nous indique la probabilité de récupération la plus élevée selon les groupes pour chaque variable par association globale. Les emmeans et leurs contrastes permettent de faire des comparaisons spécifiques entre ces groupes, permettant de nuancer les résultats des HR. Ils indiquent que les groupes B, C, D et E ne présentent pas de variations significatives de récupération de leur numération globulaire par rapport au groupe A, et que les groupes B, C, D, E et F ne présentent pas de variations significatives de récupération de leur hémoglobine. Les groupes C et D, cependant, se démarquent bien des autres groupes en présentant une probabilité que tous leurs effectifs récupèrent leur taux d'hémoglobine supérieure à celle des autres groupes. Le Tableau XI présente un bilan de ces résultats selon l'approche globale ou plus spécifique.

*Tableau XI: Classement des groupes selon les HR et les contrastes des emmeans, soit la probabilité la plus élevée de récupérer 85 % des valeurs initiales selon la variable étudiée*

Variable	Selon les HR	Selon les contrastes des emmeans
Numération globulaire	A = E > D > C > B > F	A = E = D = C = B > F
Taux d'hémoglobine	A = C = D > B > E > F	A = C = D > B = E = F
Hématocrite	A > D > E > C > B > F	A > C = D = B = E = F

#### 4. Comptages cellulaires

##### i. Quantité de cellules immatures basale

Chez 30 truites, les populations d'érythrocytes ont été observées et quantifiées avec du sang prélevé à J0 étalé en frottis sanguin. En moyenne, la population d'érythrocytes immatures représente  $1,61 \pm 0,99$  % de la population érythrocytaire totale.

##### ii. Evolution des populations érythrocytaires

Comme on peut l'observer dans la Figure 42, à la suite du ou des prélèvement(s) à J0, aucune variation significative de la quantité d'érythrocytes immatures n'est présente à J1. Cependant, pour l'ensemble des groupes, quel que soit le volume prélevé, la proportion d'érythrocytes immatures/matures augmente fortement à J15, puis diminue progressivement par la suite, se normalisant vers J56. Le poisson du groupe B (B14P2) présente une amplitude d'augmentation maximale à J15 allant jusqu'à 25,27 % de cellules immatures, tandis que les autres groupes présentent une augmentation allant jusqu'à entre 8,20 % et 17,65 %, correspondant respectivement au poisson du groupe A (B17P4) et à un des poissons du groupe F (B21P5).

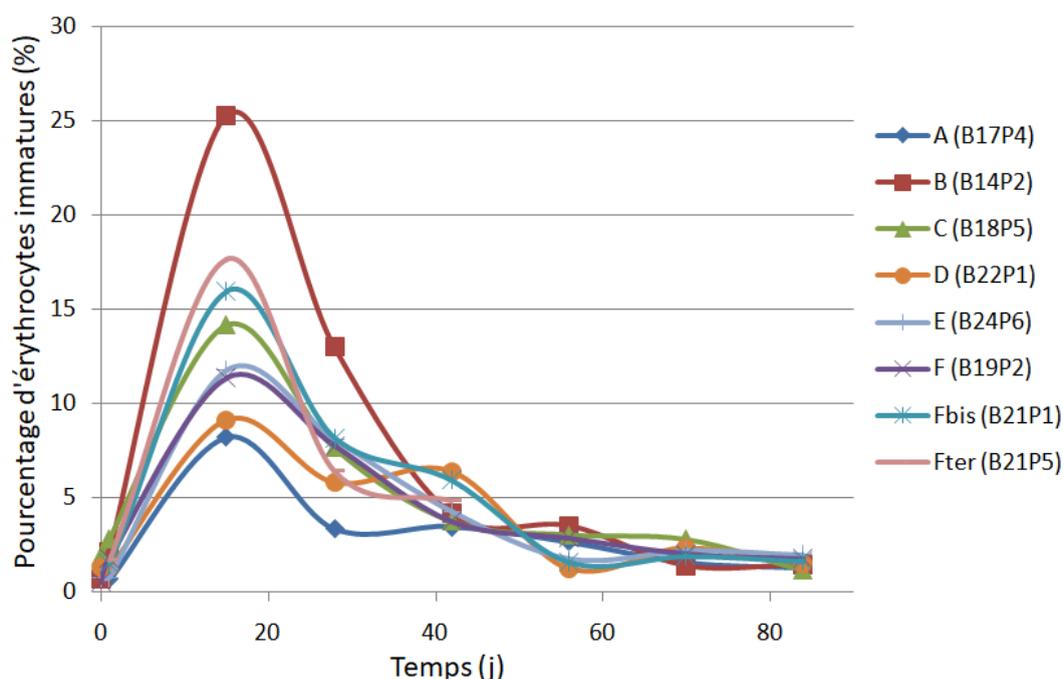


Figure 42 : Pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre d'érythrocytes total en fonction du temps

## 5. Lignée blanche

La numération leucocytaire moyenne reste plutôt homogène entre les groupes, avec des valeurs qui se maintiennent entre 70 et 90 % des valeurs mesurées à J0 pour les groupes A, B, D, E et F, avec une légère tendance à l'augmentation pendant l'étude (Figure 43). Si ces valeurs sont plus basses que les valeurs mesurées à J0, elles ne divergent pas significativement par rapport à celles du groupe A. Seul le groupe C présente une numération leucocytaire significativement différente à J42, atteignant seulement 46,44 % de sa valeur initiale.

Dans chacun des groupes, certains poissons se démarquent de la superposition des courbes des poissons par groupe, visibles au sein de la Figure 44. Dans le groupe A, le poisson B17P4, présentant une prise de poids limitée tout au long de l'étude, présente une leucopénie à J28. Dans les groupes B et C, un poisson présente une leucocytose à respectivement J56 et J70, correspondant à B20P8, le 3<sup>ème</sup> poisson le plus lourd du bac avec une queue mélanique, et à B18P4, le poisson le plus léger du bac présentant également une queue mélanique. Cependant, un lien avec l'observation clinique n'est pas toujours présent. Ainsi, les poissons représentés sur la courbe la plus élevée et la courbe la plus basse du groupe D ne présentent pas de lien clinique évident.

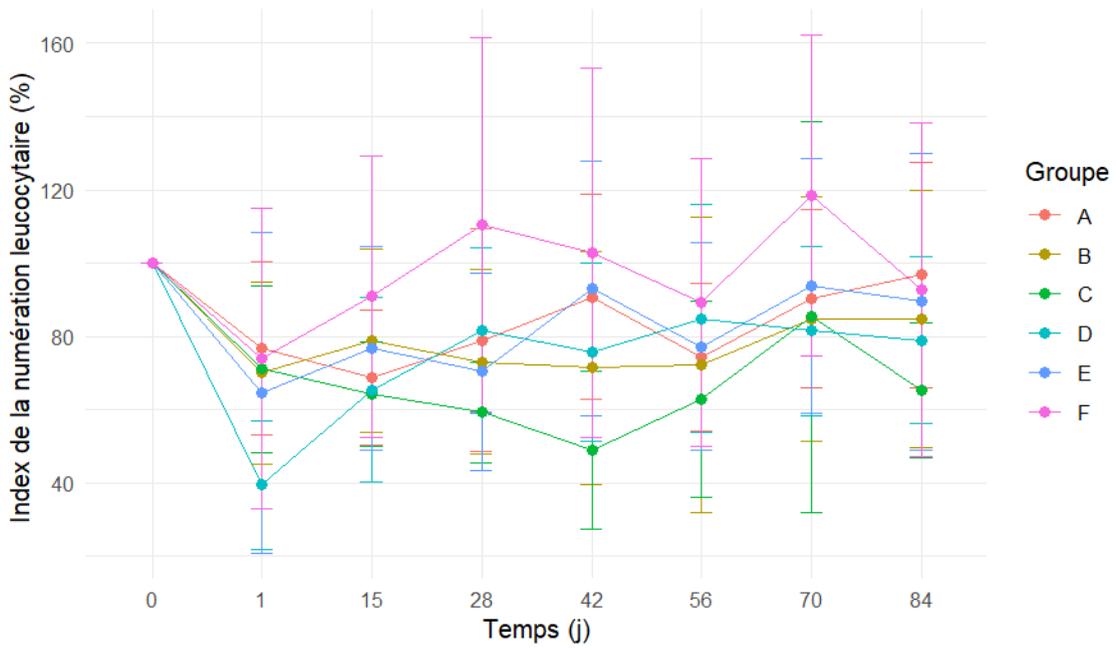


Figure 43 : Evolution de la moyenne de l'index de la numération leucocytaire par groupe à chaque temps de prélèvement

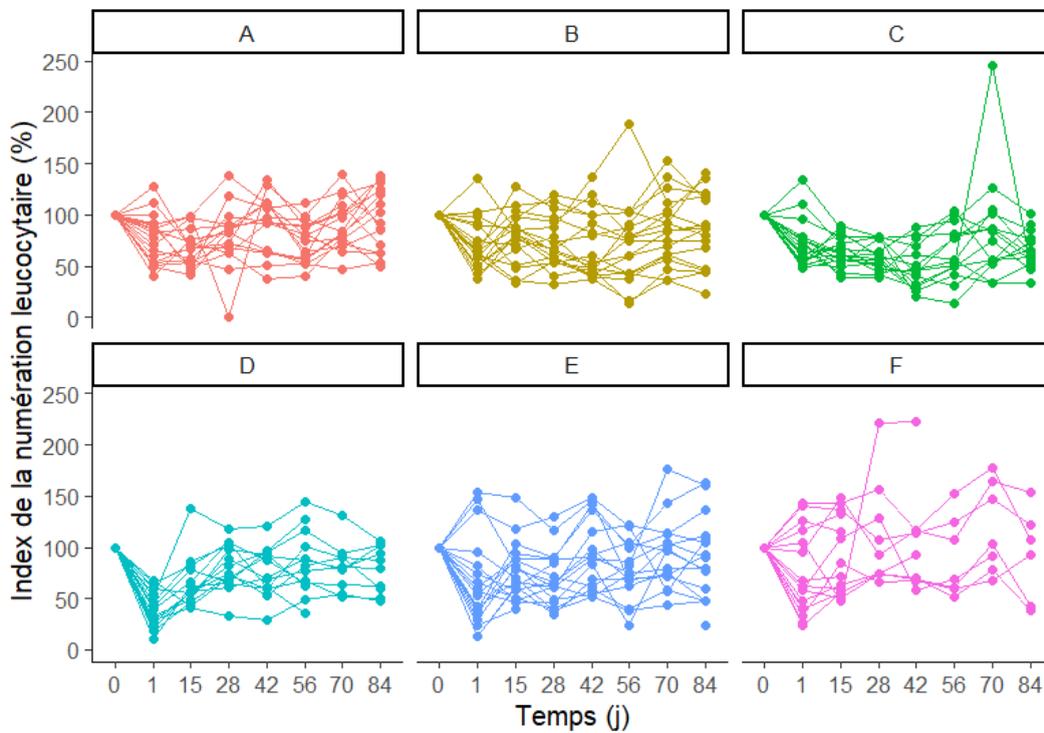


Figure 44 : Evolution de l'index de la numération leucocytaire de chaque truite par groupe à chaque temps de prélèvement

## 6. Saignements

Chaque prélèvement sanguin a été suivi d'un scoring de saignement établi entre 0 et 2. Le pourcentage de poissons ayant présenté au moins un saignement au cours de l'étude est assez homogène, si l'on exclut les saignements de J0, plus nombreux chez les groupes subissant des prélèvements répétés (Figure 45).

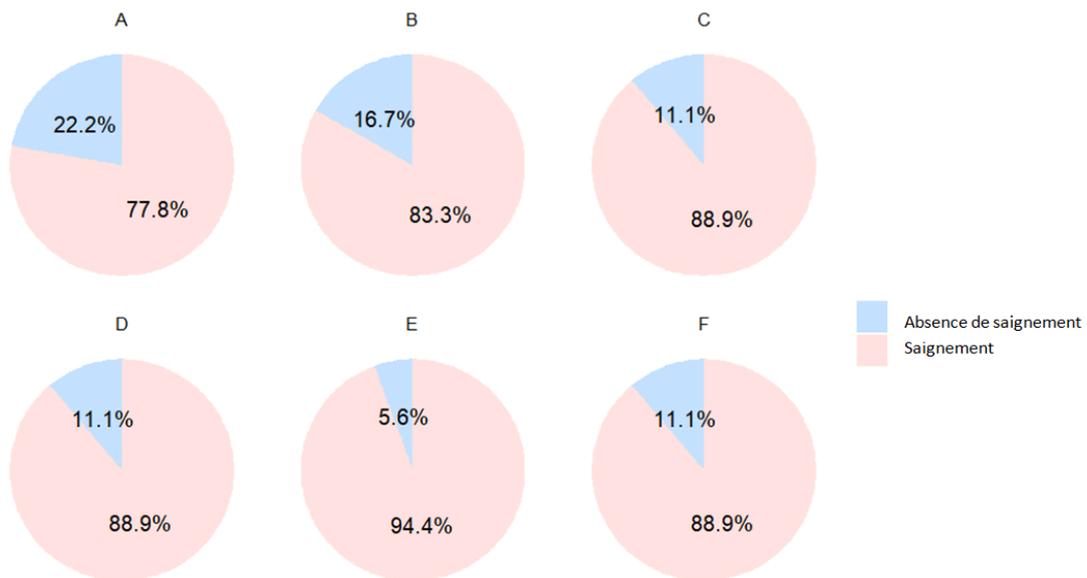


Figure 45 : Pourcentage de poissons ayant présenté au moins un saignement au cours de l'étude par groupe

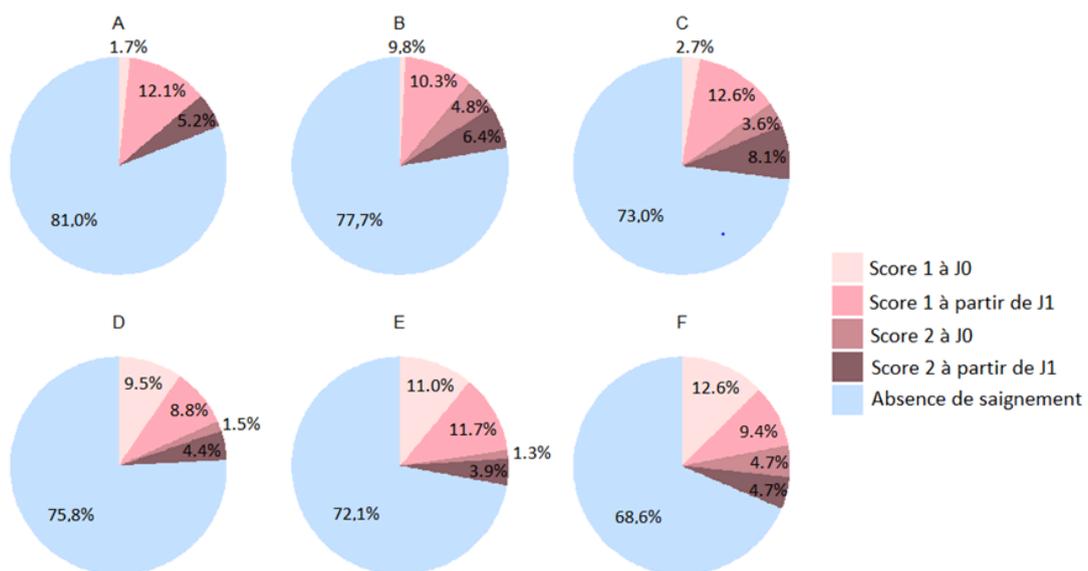


Figure 46 : Pourcentage de prélèvements ayant provoqué un saignement de score 1 ou 2 à J0 et à partir de J1 par groupe

Les poissons des groupes D, E et F ont eu plus de saignements de score 1 (entre 18,4 % et 22,7 %) par rapport aux animaux des groupes A, B et C (entre 10,3 % et 13,9 %) (Figure 46).

## B. Protocole 2 : suppression d'un prélèvement de contrôle à J15

### a. Mortalité

Sur les 12 poissons, 3 poissons du bac 11, correspondant à 50 % des effectifs du bac, ont été euthanasiés au cours de la manipulation du 2ème protocole, également pour atteinte du point limite "lésions manifestées par une absence visible d'épiderme sur une surface supérieure à 1 cm<sup>2</sup>".

### b. Variables hématologiques

#### 1. Récupérations des variables initiales

Comme le montre la Figure 47, la numération globulaire et le taux d'hémoglobine ne varient pas significativement entre J0 et J1. Cependant, à J28, les indexes des valeurs sont plus bas avec des moyennes de 81,88 % et de 78,72 % respectivement. L'hématocrite présente un comportement différent, avec une chute de sa moyenne à J1 atteignant 71,65 % de sa valeur à J0, remontant par la suite à 81,62 % à J28. Ainsi, aucune variable ne dépasse le seuil de 85 % des valeurs initiales à J28.

#### 2. Population érythrocytaire

Un comptage cellulaire est réalisé chez les 9 poissons à J28, permettant d'obtenir une moyenne de  $1,98 \pm 0,53$  % d'érythrocytes immatures. Cette moyenne n'est pas significativement différente de la moyenne basale étudiée sur 29 poissons à J0 de  $1,61 \pm 0,99$  %.

### c. Comparaison au protocole 1

Lorsque l'on compare la numération globulaire, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite du groupe B du protocole 1 avec le protocole 2 (nommé B' dans la Figure 48), on observe des valeurs plus élevées pour le groupe B' pour les trois variables hématologiques à J1.

À J28, aucune différence significative n'est visualisée entre les deux groupes pour le taux d'hémoglobine et la numération globulaire. Cependant, l'hématocrite est plus élevé pour le groupe B', avec une moyenne de 82,80 %, que pour le groupe B présentant une moyenne de 66,31 %. Au niveau des érythrocytes, le VGM et la CCMH sont revenus à leur valeur initiale à J28 pour le groupe B', contrairement au groupe B. Le groupe B' présente également une TCMH moins faible que le groupe B à J28 (Figure 48).

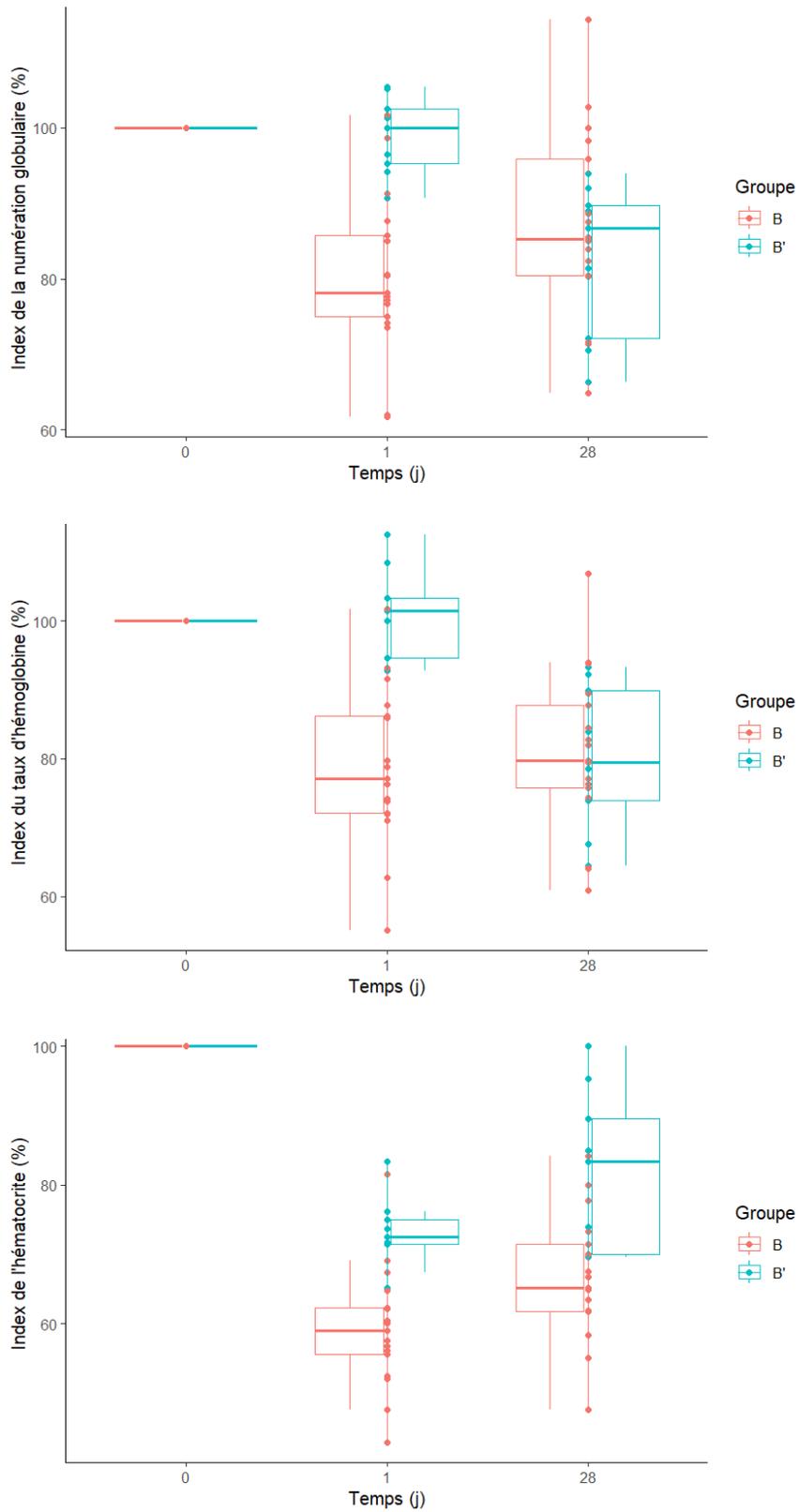


Figure 47 : Comparaison de l'évolution de l'index de la numération globulaire (haut), du taux d'hémoglobine (milieu) et de l'hématocrite (bas) selon le temps de prélèvement entre le protocole 1 (B) et le protocole 2 (B')

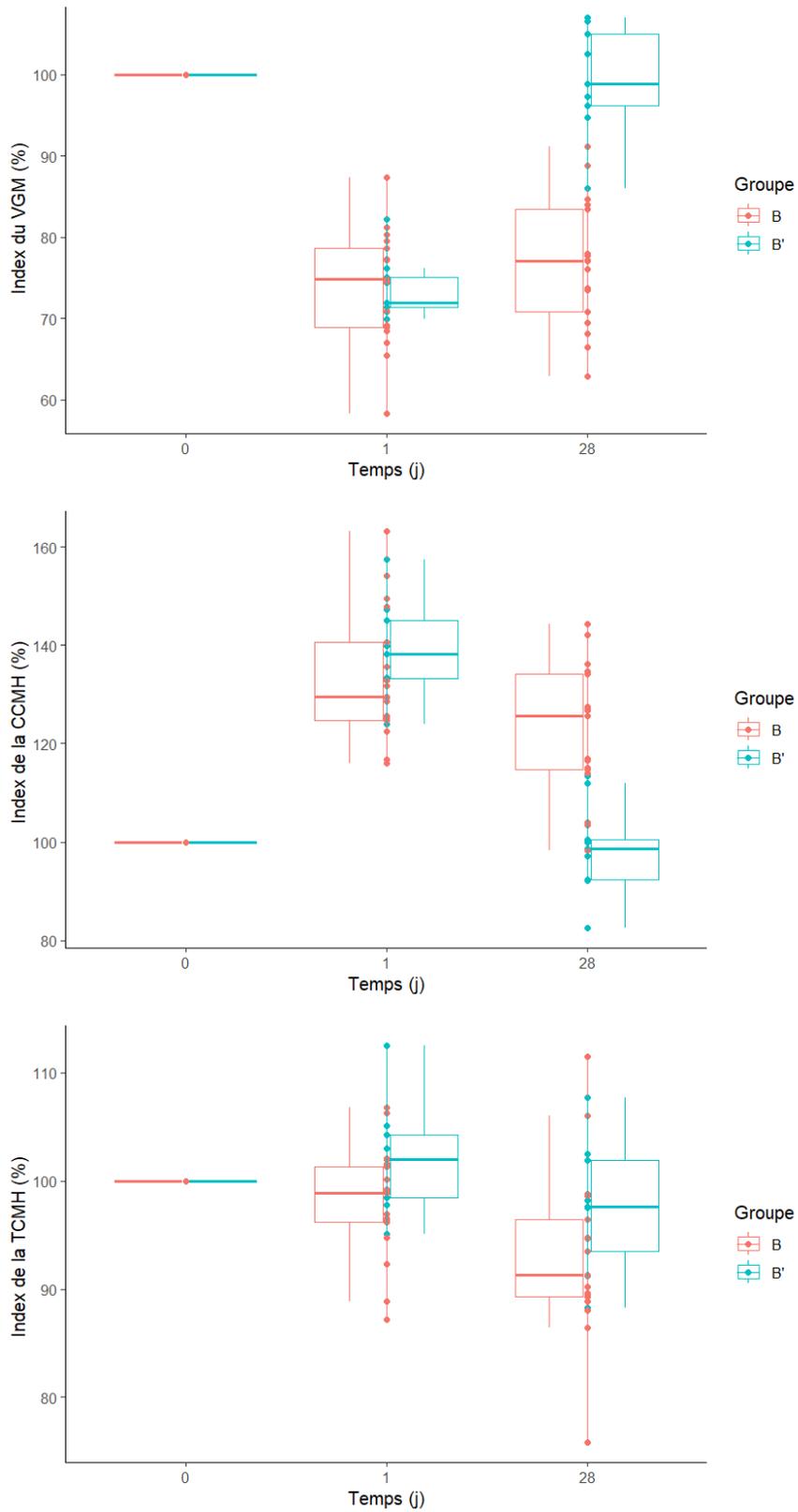


Figure 48 : Comparaison de l'évolution de l'index du VGM (haut), de la CCMH (milieu) et de la TCMH (bas) selon le temps de prélèvement entre le protocole 1 (B) et le protocole 2 (B')

## IV. Discussion

### A. Saprolégniose

On peut considérer que l'essentiel des poissons morts pendant cette expérimentation a été infecté par un champignon opportuniste, *Saprolegnia spp*, qui a imposé leur euthanasie pour atteinte de points limites. Dans la plupart des cas, dans les contraintes particulières d'une station expérimentale aquacole, ces poissons seraient morts après une période de maladie plus ou moins longue. Leur euthanasie précoce correspond à une prise en compte du bien-être animal et à une volonté de limiter le niveau de contamination des bacs par ce champignon, afin de limiter sa propagation aux autres animaux. La survenue de saprolégniose est habituellement liée à un niveau de stress trop important des animaux. A noter qu'un premier épisode de saprolégniose a été observé avant le début de l'expérimentation, pendant la période d'acclimatation, et s'est traduit par l'euthanasie de plusieurs animaux.

#### a. Période d'acclimatation au sein de la station

En raison d'une panne de courant à la station aquacole avec dysfonctionnement du système d'alarme, le groupe de poissons initialement prévu pour le projet n'a pas survécu. Une période d'acclimatation progressive d'au moins 2 mois était prévue, avec des poissons pesant environ 200 g en début d'étude et environ 450 g en fin d'étude.

Avec des échéances définies et non modifiables, l'introduction en janvier d'un nouveau groupe de poissons n'a pas permis de réaliser un temps d'acclimatation aussi long qu'initialement prévu. Le passage en bacs intermédiaires (1 m<sup>3</sup>) fut notamment d'une durée assez limitée.

Si aucune durée minimale n'est réellement mentionnée, le Conseil Canadien de Protection des Animaux considère la reprise d'une bonne alimentation comme la fin de la période d'acclimatation. Cette période varie selon les études, elle peut durer 10 jours (Lane, 1979 ; Mishra, 2021), 2 semaines (Imtiaz *et al.*, 2020 ; Orun *et al.*, 2004) ou encore 4 semaines (Gingerich *et al.*, 1986). La période d'acclimatation de 7 semaines retenue pour cette étude, bien que moins longue que la période initialement prévue, devrait en théorie être suffisante pour que les truites s'habituent à leur nouvel environnement. Les truites ont repris une alimentation habituelle dès le 7<sup>ème</sup> jour après leur arrivée dans la salle d'étude, soit 6 semaines avant le début du protocole expérimental, témoignant d'une acclimatation correcte d'après les critères du CCPA. La survenue des premiers cas de saprolégniose pendant la période d'acclimatation interroge sur le lien avec les manipulations effectuées. La réduction de la durée de l'acclimatation, tout particulièrement le passage très rapide en bacs de taille intermédiaire (1 m<sup>3</sup>), en parallèle d'autres facteurs, pourrait avoir joué un rôle dans la survenue de cette maladie opportuniste.

## b. Luminosité de la salle

Au cours des premières semaines d'acclimatation, les truites étaient très réactives à tout stimulus extérieur, signe d'un stress marqué. La réduction de l'intensité lumineuse *via* la mise en place d'une occultation partielle des sources lumineuses a rapidement apaisé les animaux. En grands bassins, en élevage, les animaux peuvent mieux se cacher pour limiter leur stress, contrairement à notre station expérimentale, où les bacs sont de faible volume (pour favoriser l'observation des animaux), blancs, et donc très lumineux. Ils étaient éclairés avec une lumière assez forte produite par des néons.

La mise en place d'un filtre en plastique bleu a permis de filtrer les longueurs d'ondes d'environ 380 à 450 nm, tout en diminuant l'intensité globale de la lumière ambiante à une intensité d'environ 150 lx, diminuant le stress induit par la lumière. L'effet sur les animaux a été immédiatement observé.

## c. Densité des bacs

### 1. Poids des animaux

Avec un apport tardif de nouveaux poissons, l'étude débute avec des poissons d'environ 370 g au tri puis de 400 g lors du premier prélèvement à J0, soit 150 - 200 g de plus que ce qui était initialement prévu. Ainsi, la densité des bacs est de 18 kg/m<sup>3</sup> en début de manipulation, de 22,5 kg/m<sup>3</sup> à J42 pour finir à environ 29,9 kg/m<sup>3</sup> en fin d'étude dans les bacs contenant 9 poissons, au lieu des 11,25 kg/m<sup>3</sup> en début d'étude et 20,25 kg/m<sup>3</sup> en fin d'étude prévus. Selon les recommandations de la RSPCA (Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals), la densité maximale en élevage artificiel ne doit pas excéder 60 kg/m<sup>3</sup>. Si la densité ne semble pas être une difficulté particulière dans notre situation, la taille de ces poissons, dans nos bacs de faible volume, limite à la fois les possibilités de nage rapide (notamment celle observée lors de la prise alimentaire), ce qui s'est traduit par des chocs et des blessures observés sur les poissons, et les possibilités de fuite des animaux face aux dominants. Des bacs mal adaptés à des poissons de si grande taille sont sûrement la principale cause des troubles observés dès la période d'acclimatation. En fonction des animaux, l'adaptation des poissons à cet environnement a été plus ou moins aisée, probablement en lien avec d'autres facteurs (comme la présence d'animaux dominants, ou l'intensité lumineuse spécifique de chaque bac (cf. partie IV. A. c. 2.).

Dans les bacs conservant 8 ou 9 poissons jusqu'à la fin de la manipulation, soit les bacs avec la densité en poids la plus élevée, une croissance et un comportement alimentaire satisfaisant sont observés tout au long de la manipulation.

### 2. Densité et dominance

Un certain nombre d'études analysent l'effet de la densité en effectif de truites arc-en-ciel sur la productivité, la santé et les niveaux de stress. Une revue de la littérature menée par Ellis *et al.* en 2002 n'établit pas de lien entre une densité augmentée et une plus grande sensibilité aux

agents pathogènes, au stress ou à la mortalité. Ce sont surtout la prise alimentaire, la prise de poids et l'aspect des nageoires qui sont le plus affectés par une densité élevée.

Par ailleurs, une faible densité aura également tendance à diminuer la prise alimentaire et à augmenter les comportements de dominance entre les truites (Ellis *et al.*, 2002 ; Pottinger et Pickering, 1992). Lorsque des truites arc-en-ciel se trouvent en densités très faibles, leur prise de poids est diminuée, leur concentration sanguine en cortisol est augmentée et leur quantité de lymphocytes est diminuée par rapport aux truites dans des bacs de densité plus élevée. Une hiérarchie sociale avec des rapports de dominance plus marqués s'installe lorsque les effectifs sont faibles, créant un stress chronique pour les individus plus soumis. Ces derniers ont des fonctions immunitaires diminuées et une tendance à moins s'alimenter et à puiser dans leurs réserves énergétiques. Ceci peut conduire à une augmentation de la mortalité, créant alors une forte hétérogénéité dans les bacs avec certains poissons qui vont prendre du poids rapidement et d'autres qui vont en perdre (Roy *et al.*, 2021).

Pottinger et Pickering (1992) observent ces rapports de dominance en installant des bacs de paires de truites (à 13,8 kg/m<sup>3</sup>), de cinq truites (à 29,3 kg/m<sup>3</sup>) et des groupes de 10 truites (à 48,1 kg/m<sup>3</sup>). Seuls les groupes de 10 truites n'ont pas montré de signes évidents de relation de dominance. Au contraire, une relation de dominance est systématiquement observée dans les bacs contenant deux truites où, très souvent, un poisson perd du poids et maintient des niveaux de cortisol élevés tandis que l'autre s'acclimate rapidement et présente une courbe de croissance normale. Les groupes de cinq ont permis d'observer, de même, une prise de poids plus limitée voire une perte de poids chez certains, tandis que d'autres prenaient du poids et montraient des niveaux de cortisol très bas.

Dans les bacs fortement touchés par la saprolégniose en début de manipulation, le nombre d'animaux a parfois été assez bas, avec seulement 3 à 5 individus. Dans ces bacs, tout particulièrement, des absences de croissance voire des pertes de poids ont été observées sur certains poissons entre deux contrôles, ce qui s'est souvent traduit par une hétérogénéité des poids au sein du bac. C'est le cas par exemple du bac 21 (groupe F) dans lequel, un poisson dominant a émergé parmi les trois survivants. Ce dernier apparaissait d'une couleur claire, avec une croissance très rapide, alors que les deux autres animaux présentaient une coloration foncée et une courbe de poids stable voire en décroissance. Ces animaux ont fini par être euthanasiés.

Les truites arc-en-ciel sont des poissons capables de s'adapter à la couleur du fond de l'eau de manière à se camoufler vus du dessus, mais également vus du dessous avec une capacité à s'éclaircir afin de s'apparenter visuellement à la lumière à l'extérieur de l'eau. Lorsque des truites en bonne santé sont placées dans un bac noir, elles vont avoir tendance à devenir plus sombres tandis que dans un bac blanc, elles s'éclairciront (Kasagi *et al.*, 2020). Dans notre étude, les truites qui présentaient le moins de prise de poids étaient souvent les plus sombres du lot, présentant un contraste élevé avec leur bac blanc et démontrant d'une certaine incapacité à s'adapter à leur environnement.

Un élément que l'étude de Pottinger et Pickering ne traite pas est l'agressivité au cours des relations de dominance. En effet, une tentative d'introduction du dernier poisson du bac 21 (B21P1) avec les 4 derniers poissons du bac 16, très touchés par de la saprolégniose, a permis de visualiser l'agressivité du poisson B21P1, qui a produit une perte d'écaille importante en 48h chez certains. À la suite de la perte d'écailles, des lésions de saprolégniose se sont rapidement développées, s'apparentant à celles observées tout au long de l'étude.



Figure 49 : Photographie illustrant la perte d'écailles importante chez le poisson B16P1 5 jours après l'introduction du poisson B21P1

Il est possible que, selon les comportements de chaque truite, certains bacs de 9 individus ont contenu des poissons plus agressifs que d'autres, phénomène amplifié par la réduction des effectifs dans certains bacs. Les bacs ayant maintenu un effectif de 8 ou 9 poissons tout au long de l'étude, avec des animaux présentant une couleur assez pâle et une prise de poids homogène, ne contenaient probablement pas de poissons très dominants. Si ce phénomène ne semble pas présenter de conséquences directes sur la lignée rouge des poissons, il serait prioritairement responsable de l'atteinte de point limite chez 23,1 % des poissons, soit de tous les poissons sauf un (B18P9).

La mortalité de 23,1 % des poissons serait en grande partie liée aux conséquences du stress associé à une taille des poissons trop importante par rapport à leurs bacs en début d'étude, et à des comportements de dominance dans certains bacs liés à un effectif réduit. La prévalence de *Saprolegnia spp.* ne semble pas liée à la procédure expérimentale mais à un effet bac.

## B. Alimentation des poissons

À partir de 7 jours suivant leur arrivée en salle 3, salle où sont réalisées les manipulations de la présente étude, les poissons de l'ensemble des bacs ont présenté une bonne prise alimentaire, à l'exception des quelques bacs fortement touchés par la saprolégniose, pour lesquels la prise alimentaire demeurait plus lente. À chaque pesée, le plan d'alimentation a été mis à jour. Certains poissons, que l'on peut qualifier de dominés, ont présenté une prise alimentaire plus atténuée, souvent compensée par un comportement légèrement plus exacerbé chez d'autres poissons du même bac. Le suivi du poids des animaux tous les 15 jours reflète assez fidèlement le comportement observé quotidiennement.

Les prélèvements sanguins répétés, tous les 15 jours, ne semblent pas avoir eu d'influence sur la prise alimentaire. Très peu de refus ont été mesurés sur l'ensemble de l'étude (portion de l'aliment non consommée dans un bac). Là encore, un effet bac a pu être observé, mais il ne semble pas y avoir d'influence de la procédure expérimentale.

## C. Croissance des poissons

Tout au long de l'étude, l'ensemble des groupes ont présenté des courbes de croissances homogènes quelle que soit la quantité de sang prélevée à J0. Les poissons qualifiés auparavant de dominés ont présenté une croissance plus réduite, mais leur répartition homogène au sein des différentes procédures n'affecte pas significativement les courbes de croissance (cf. partie IV. a. iii. 2.).

Les courbes de gains de poids par groupe au cours du temps soulignent une diminution générale de prise de poids pour l'ensemble des groupes entre J15 et J42. L'augmentation de la charge allostatique liée aux manipulations entre J0 et J1, mais également au stress biologique de la perte sanguine résultant de ces prélèvements et la mobilisation de ressources énergétiques dans une érythropoïèse, peut être une explication plausible. En effet, les poissons mettront moins d'énergie dans leur croissance pendant cette période d'adaptation consécutive aux prélèvements. Cette charge allostatique peut être liée aux prélèvements de J0, mais également au stress accumulé par les prélèvements lors des contrôles suivants.

Une réaction au stress est très souvent liée à un ralentissement de la croissance et, plus ce stress est important, plus la croissance risque d'être ralentie (McCormick *et al.*, 1998). Cependant, tous les groupes de notre étude présentent cette diminution de gain de poids, quelle que soit la modalité de prélèvement. Ceci signifierait que les poissons du groupe F, ayant été prélevés 6 fois la quantité prélevée chez le groupe A en 3 manipulations différentes, ne présentent pas plus d'impact dans leur gain de poids que les autres groupes.

L'ensemble des modalités de prélèvement sanguin a permis une croissance homogène, ne présentant donc pas d'impact zootechnique lié à la quantité prélevée. Cependant, quel que soit le volume prélevé, un impact zootechnique sera présent à la suite d'un prélèvement pour l'ensemble des poissons sous la forme d'une diminution du gain de poids allant jusqu'à 6 semaines après le prélèvement.

#### D. Prélèvements sanguins

##### a. Site de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de la veine caudale par un abord latéral à gauche à l'intersection de la ligne latérale du poisson (1 mm en dessous) et de la ligne virtuelle reliant la base arrière de la nageoire dorsale à l'anus. Lorsque des lésions étaient présentes au niveau du site de ponction (perte d'écaille, lésion rouge résiduelle ...), le prélèvement a été réalisé soit de l'autre côté, soit par un abord ventral. Cela a également pu survenir lorsque la prise de sang s'avérait difficile par l'abord classique. Pour une journée de prélèvement donnée, cela ne concernait que quelques animaux au maximum.

Un abord ventral a été systématiquement réalisé sur un poisson qui présentait une conformation anatomique particulière, à savoir une déformation de la colonne (B22P6).

Si le changement de côté présente surtout des risques infectieux, avec multiplication des portes d'entrée en multipliant les sites de ponction, ainsi que des prélèvements moins précis par manque d'habitude de la part de l'opérateur, changer de site de prélèvement peut aussi engendrer un biais. En effet, tous les sites de prélèvements ne sont pas égaux quant aux lésions et aux séquelles internes créées. Sur les 8 prélèvements ayant eu un scoring de saignement, le poisson B22P6 a présenté 5 fois un saignement, dont 4 consécutifs. Il est ainsi possible que ce taux élevé de saignements soit lié à sa conformation, mais également à son site de ponction.

##### b. Lésions visualisées au cours de l'étude

Au cours de l'étude, certains poissons ont été euthanasiés pour atteinte de points limites, et principalement pour la présence de "lésions manifestées par une absence visible d'épiderme sur une surface supérieure à 1 cm<sup>2</sup>" (Annexe 3). Si les sites de prélèvements ont pu présenter sur certains animaux une discrète perte d'écailles ou un point rouge, aucunes des lésions motivant une euthanasie n'a été liée à des lésions significatives au niveau du site de prélèvement. Les cas de saprolégniose ont surtout engendré des lésions au niveau de la queue et au niveau de la crête dorsale en région caudale, des zones classiquement attaquées par les poissons dominants. Certains poissons avaient des lésions de forme cotonneuse et blanche (B16P3, Figure 51), ou de

forme jaunâtre ressemblant plutôt à du mucus (B15P4, Figure 50), tandis que d'autres présentaient des pertes d'épiderme (B13P1, Figure 52 et B16P4, Figure 53). Un réel effet bac est visible concernant la prévalence de ces lésions. En effet, si la procédure F a eu le maximum de mortalité (10 au total), 8 de ces poissons proviennent du même bac. Par ailleurs, d'autres bacs ayant été prélevés avec une procédure plus légère ont également une mortalité plus élevée. C'est le cas par exemple du bac 16 ayant subi la procédure D avec au total 5 poissons euthanasiés pour lésion de saprolégniose avant l'introduction du poisson B21P1.

*Saprolegnia spp.* peut causer de la nécrose cellulaire, pouvant mener à une destruction de l'épiderme et du derme des poissons, favorisant par la suite une infection secondaire. Certaines souches virulentes peuvent envahir le muscle ou encore des vaisseaux sanguins, conduisant à la mort du poisson par perte d'équilibre et difficultés respiratoires (Barde, 2022). Les poissons étant euthanasiés dès la visualisation de ces lésions, les poissons atteints ne présentaient pas encore d'atteinte de leur état général.



Figure 50 : Photographie illustrant une lésion de saprolégniose sur le flanc gauche en dessous de la ligne latérale (B15P4)



Figure 51 : Photographie illustrant une lésion de saprolégniose à gauche de la queue (B16P3)



Figure 52 : Photographie illustrant une lésion de saprolégniose avec perte de matière caudale à la nageoire adipeuse (B13P1)



Figure 53 : Photographie illustrant un furoncle à gauche de la queue (B16P4)

Seul le poisson B18P9 est mort sans euthanasie, et sans lésions apparentées à la saprolégniose. De multiples pétéchies, de petites taches rouges sur les écailles résultant de saignement sous cutanés, étaient présentes crânialement et ventralement au site de ponction (Figure 54). Il existe plusieurs causes pour l'apparition de pétéchies sur la peau d'un poisson. Chez des carpes d'ornement, de nombreuses pétéchies ont été visualisées ainsi qu'une hyperhémie des nageoires, une augmentation du flux sanguin au niveau des nageoires, en cas de septicémie dues à *Aeromonas* par exemple (Wildgoose, 1998). Chez des truites arc-en-ciel, une maladie émergente nommée "Puffy Skin Disease" (PSD) cause une hyperplasie de l'épiderme avec présence de pétéchies. Cependant, étant une maladie transmissible horizontalement, la faible prévalence de ce type de lésions au cours de l'étude rend l'hypothèse moins favorable (Cano *et al.*, 2016). Par analogie aux mammifères, il est fortement probable que ces lésions soient d'origine traumatique au sein du bac au vu de la durée séparant leur apparition du dernier prélèvement, soit 10 jours, et de l'absence d'altération de l'état général en amont.



Figure 54 : Photographie illustrant des pétéchies à proximité du site de prélèvement ainsi qu'une légère hyperhémie de la nageoire caudale (B18P9)

### c. Prélèvements initiaux

Plusieurs études ont exploré les volumes de sang prélevables chez les poissons en étudiant un voire deux volumes différents prélevés, sans toutefois proposer un suivi complet des variables hématologiques. Lane (1978) compare l'évolution des variables hématologiques à la suite d'un prélèvement de 12 % du volume sanguin chez des truites ayant subi une splénectomie ou non. Ce volume de sang a été calculé selon les résultats de Huggel *et al.* (1969), présentant un volume de sang total de respectivement 3,51 % et 4,39 % du poids vif par les méthodes d'injection d'albumine humaine iodée (HSA-I<sup>131</sup>) et d'injection d'érythrocytes marqués par du <sup>51</sup>Cr chez les truites arc-en-ciel, soit un volume total estimé supérieur à celui retenu dans notre étude. De plus, les truites ne sont pas utilisées comme leur propre témoin, la variabilité mesurée cumule donc variabilité inter- et intra-individuelle. Une seconde étude étudie la récupération ou non de poissons zèbres une semaine après un prélèvement de 0,4 % et 1 % du poids vif à l'aide d'une aiguille microcapillaire en verre. Si les poissons ont un taux d'hémoglobine correspondant à respectivement 87 % et 76 % de leur valeur mesurée lors du premier prélèvement, témoignant d'une bonne récupération, quoique incomplète pour les prélèvements de 1 %, seul le taux d'hémoglobine est suivi et la possibilité de multiplier ces prélèvements en 24h n'est pas explorée (Zang *et al.*, 2013). Afin d'explorer les limites de ce qui est réalisable chez les truites arc-en-ciel, les différentes modalités de prélèvements de notre étude ont été définies par analogie avec l'étude de Nahas *et al.* (2000).

Avec les difficultés décrites précédemment à la station aquacole menant à un apport de nouveaux individus dont la taille et le poids initiaux n'ont pas pu être contrôlés, certains poissons ont dû être prélevés des volumes allant jusqu'à 2,1 mL à J0 pour les plus gros d'entre eux. Nécessitant des seringues d'un volume supérieur, à savoir de 2,5 mL, la pression à exercer n'est pas identique à celle requise pour une seringue de 1 mL, rendant les prélèvements obtenus moins

précis et parfois augmentés par rapport aux volumes désirés. Par ailleurs, malgré un préleveur unique, le simple fait de changer de taille de seringue diminue *de facto* la reproductibilité des prélèvements, avec un temps d'adaptation nécessaire pour maîtriser l'afflux sanguin créé par une seringue nécessitant une pression plus élevée.

#### d. Prélèvements de contrôle

Le choix de réaliser les prélèvements toutes les deux semaines a pris en compte le besoin de réaliser des contrôles suffisamment fréquents pour avoir une estimation la plus précise possible du temps de récupération nécessaire, sans trop le prolonger artificiellement.

Suite à des prélèvements sanguins de 0,5 mL répétés toutes les semaines pendant trois semaines sur 15 truites d'environ 270 g, soit des prélèvements de 0,19 % du poids vif et 6,2 % du volume sanguin, il n'a pas été observé d'impact significatif sur les paramètres sanguins. Aucune variation du taux d'hémoglobine, notamment, n'est mise en évidence au cours de cette étude (Hoffmann et Lommel, 1984).

Au cours de notre étude, les prélèvements de contrôle ont été réalisés toutes les deux semaines, avec des volumes prélevés de 0,2 mL imposés par les besoins analytiques. L'hypothèse initiale était que l'influence de ces prélèvements sur les variables hématologiques des poissons était faible. D'autant plus que, pesant environ 400 g en début d'étude et jusqu'à 700 g en fin d'étude, ces volumes correspondent à 1,7 % du volume sanguin total et 0,05 % du poids vif chez un individu de 400 g, et à 0,9 % du volume sanguin et 0,03 % du poids vif d'un individu de 700 g, des seuils très inférieurs aux recommandations du CCPA, et bien plus faibles que ceux de l'étude de Hoffmann et Lommel (1984).

La récupération plus tardive qu'initialement anticipée interroge toutefois sur l'influence réelle de ces prélèvements répétés. Notamment, les poissons ayant suivi la modalité B' du protocole 2, sans prélèvement à J15, semblent présenter un retour plus rapide aux valeurs basales pour certains paramètres (notamment l'hématocrite). Bien que le nombre de poissons ayant survécu à J28 (9) soit limité, la forte variabilité des résultats mesurés et le biais de dilution du protocole B imposent une grande prudence quant à leur interprétation.

#### e. Anticoagulant

##### 1. Type d'anticoagulant

L'anticoagulant utilisé au cours de notre étude est l'héparine, utilisé préférentiellement à l'EDTA dans de multiples études (Witeska *et al.*, 2022). Si l'EDTA est l'anticoagulant de choix pour la réalisation de numérations sanguines, de formules sanguines et de frottis sanguins chez les mammifères, par sa capacité à préserver avec fiabilité la morphologie des cellules sanguines, il produit chez les poissons une légère augmentation de l'hématocrite, du VGM et de la CCMH. En effet, les sels contenus dans l'EDTA produisent un gonflement des cellules, par comparaison avec

l'héparine, diminuant la fiabilité des résultats obtenus. Par ailleurs, son utilisation lors d'une anesthésie avec du MS222 peut produire une hémolyse, nous incitant à favoriser l'utilisation de l'héparine (Maqbool *et al.* 2014). Sur l'ensemble de l'étude, seuls 5 échantillons n'ont pu être analysés en raison de la formation d'un caillot.

Pour autant, l'héparine n'est pas l'anticoagulant idéal pour conserver la morphologie des cellules et produire des frottis sanguins de bonne qualité. En effet, les frottis réalisés étaient de qualité moyenne avec un halo rosé autour des cellules, rendant parfois difficile l'identification de certaines cellules au cours des comptages cellulaires.

## 2. Quantité d'anticoagulant

Afin d'hépariner les seringues, environ 0,2 mL d'héparine ont été prélevés puis remis dans le flacon, recouvrant la paroi des seringues pour éviter une éventuelle coagulation lors du prélèvement de sang. Cette méthode a été réalisée lors des prélèvements initiaux, où la quantité d'héparine résiduelle dans la seringue, soit environ 0,04 mL, représentait au maximum 10 % du prélèvement pour les poissons prélevés de faibles volumes (groupes A et D). Lors des prélèvements de contrôle, ce pourcentage d'héparine est plus élevé en raison des prélèvements de volume réduit. En effet, 20 % du prélèvement final correspond à de l'héparine, diluant ainsi de manière non négligeable les échantillons.

Lorsque ce biais a été suspecté (J42), les seringues ont été systématiquement vidées au maximum avant tout prélèvement, laissant environ 0,01 mL d'héparine dans la seringue. Les méthodes de prélèvement ayant été modifiées à partir de J56, l'ensemble des prélèvements analysés entre J1 et J42 inclus ont été davantage dilués par de l'héparine, diminuant ainsi la numération globulaire, l'hématocrite, le taux d'hémoglobine et la numération leucocytaire lors de l'analyse sanguine. Ainsi, il est possible de comparer les résultats de J0 avec les résultats obtenus à partir de J56, ou d'observer la comparaison de l'ensemble des groupes qui ont tous subi le même biais, mais la comparaison entre J0 et les résultats obtenus entre J1 et J42 inclus sera très peu exploitable. Ceci ne concerne pas le VGM, la CCMH et la TCMH, construits à partir de rapports des autres variables et minimisant donc l'effet de la dilution.

Par ailleurs, sur environ 800 prélèvements réalisés, seuls 5 prélèvements sanguins ont coagulé ne permettant pas de réaliser d'analyse, témoignant de l'efficacité de l'anticoagulant choisi.

## E. Variables hématologiques

### a. La réponse au stress

La rate est un acteur principal lors d'une réponse à un stress, respiratoire ou non. En effet, comme mentionné lors de la première partie, certaines molécules synthétisées lors d'un stress, telles que l'adrénaline, causent une contraction splénique libérant des érythrocytes dans la

circulation de la truite (Fänge et Nilsson, 1985). Si cette adaptation permet de compenser une augmentation de l'activité de l'organisme liée à ce stress, ses conséquences hématologiques pourraient influencer des résultats sanguins. En effet, il est compliqué de confirmer qu'un hémocrite se situant dans les valeurs hautes de l'intervalle de référence est dû à une valeur de consigne légèrement plus élevée chez cet individu, ou à une augmentation de l'hémocrite à l'instant du prélèvement par splénocontraction ou érythrocytose par exemple (Pearson et Stevens, 1991).

Différents intervalles de référence d'hémocrite ont été évoqués précédemment, correspondant à une situation de stress avec enclenchement d'une contraction splénique ou non. C'est le cas par exemple de l'hémocrite, qui est d'environ 29-40 % (Nabi *et al.*, 2022) en prélèvement simple ou de 23-33 % (Gallaughier *et al.*, 1995) en prélèvement *via* un cathéter. Avec nos résultats, il n'est pas facile de discerner les variables biaisées par un état de stress des variables physiologiques. Certains poissons peuvent avoir été prélevés à J0T0h en condition de contraction splénique avec un hémocrite supérieur à 40 %, tandis que d'autres, plus résistants dans leur réponse à un stress aigu, présenteront une contraction splénique plus légère et donc un hémocrite inférieur. Les réserves spléniques peuvent également différer entre deux poissons, modulant davantage l'impact de la contraction splénique sur les variables hématologiques. L'écart d'hémocrite à combler au cours de la récupération n'est donc pas identique chez l'ensemble des poissons, qui pourront par la suite avoir une contraction splénique ou non (adaptation au stress) au cours des prélèvements de contrôle, influençant d'autant plus nos résultats.

Afin de faciliter l'identification des poissons lors des prélèvements à J0, les poissons ont été placés dans des bacs intermédiaires, par trois, avant leur passage dans le bac anesthésiant. Cette étape supplémentaire, réalisée dans le quart d'heure précédant l'anesthésie, et multipliant de fait le nombre de pêches subies par chaque poisson, a pu accentuer l'influence du stress sur les paramètres hématologiques à J0, et notamment le risque de contraction splénique. L'utilisation de bacs intermédiaires n'a pas été nécessaire pour les prélèvements de suivi. Ceci implique donc des conditions distinctes entre les prélèvements à J0 (stress maximisé par une double capture, première pêche/anesthésie/ponction sanguine des poissons) et les prélèvements suivants (une seule pêche, voire habituation potentielle au protocole)

Ainsi, certaines études évoquent la capacité des poissons à s'habituer à un stress et à diminuer leur réponse en fonction. C'est le cas de Ruiz *et al.* en 2024, qui mettent en évidence une réponse à un stress hypoxique diminuée lorsque l'on multiplie les manipulations. En effet, au bout du troisième passage en bac hypoxique (espacé du précédent par 48h), l'augmentation de la quantité de globules rouges, de la quantité d'hémoglobine, du VGM et de la CCMH n'est plus présente et aucune différence significative n'est observée par rapport au témoin. Bien que présentant une tendance à la diminution, seule la concentration sanguine de cortisol reste élevée en comparaison au témoin, mais ne semble plus avoir de répercussion sur les variables du sang. Au contraire, Barton *et al.* (1986) ont plutôt constaté une diminution de la production de cortisol sans

impact sur l'hématocrite suite à un stress aigu chez des individus manipulés quotidiennement. Il semblerait tout de même exister une forme d'adaptation à un stress récurrent que ce soit par une augmentation de la cortisolémie moins importante ou par une réponse au stress par des variables hématologiques plus limitées, provoquant de la variabilité individuelle.

La réponse au stress est difficilement quantifiable et anticipable au sein d'une manipulation expérimentale chez des truites arc-en-ciel. Elle crée un biais inévitable à J0, au cours des premiers prélèvements, et peut se prolonger lors des prélèvements suivants ou non, dépendant très certainement d'une variabilité inter-individuelle.

## b. Description des variables hématologiques

### 1. Exclusion de certains poissons

Entre les comportements de dominance provoquant une prévalence augmentée de saprolégniose et les erreurs analytiques, certains poissons ont été exclus de l'analyse des données car ils présentaient des valeurs hématologiques non alignées avec celles des autres bacs. Le tableau en Annexe 5 recense ces poissons exclus de l'analyse statistique et la cause de leur exclusion.

### 2. Entre J0 et J1

L'analyse sanguine des trois prélèvements répétés à J0, pour les groupes D, E et F, permet de souligner l'impact immédiat des pertes sanguines. Le groupe D présente une numération globulaire et un taux d'hémoglobine ne variant pas significativement entre J0 et J1, mais son hématocrite et son VGM diminuent, tandis que sa CCMH augmente. Ces variations témoignent d'un remplacement rapide de la population érythrocytaire par des cellules plus petites davantage concentrées en hémoglobine.

Ce mécanisme compensatoire limitant la baisse de la numération globulaire, mais surtout du taux d'hémoglobine, a cependant un seuil à partir duquel il ne peut plus compenser les pertes. Ainsi, plus on prélève du sang, moins l'organisme pourra compenser la numération globulaire et le taux d'hémoglobine, ce qui explique des résultats significativement plus faibles et ce de manière plus précoce pour le groupe F, par rapport aux groupes D et E.

Les délais étant trop courts pour que cet apport en érythrocytes provienne de l'érythropoïèse habituelle, et en l'absence de modification du pourcentage de cellules immatures entre J0 et J1, l'hypothèse est qu'il résulte d'une contraction splénique.

Lorsque l'on compare avec les modalités à prélèvement unique, seuls les groupes A et D ne présentent aucune variation significative à J1 par rapport à J0 pour la numération globulaire et le taux d'hémoglobine. Cependant, pour l'ensemble des groupes, l'hématocrite diminue significativement par rapport à ses valeurs à J0. Le groupe B présente une diminution de ses variables plus importante que celle du groupe C, malgré le fait que moins de sang n'a été prélevé, et qu'il n'y ait pas plus de saignements, ni plus d'anomalies cliniques. L'explication de ces résultats réside soit dans des saignements internes auxquels nous n'avons pas accès, soit à une variabilité inter-individuelle aléatoirement sélectionnée et plus sensible dans le groupe B que dans le groupe C.

Il est par ailleurs intéressant de noter que le groupe D, qui a eu trois fois la quantité de prélèvement du groupe A, et un volume total de prélèvement identique au groupe B, est le groupe dont les résultats se rapprochent le plus de ceux du groupe A à J1. Ceci suggérerait un effet immédiat plus réduit sur les variables hématologiques lorsqu'un volume est prélevé en trois fois, causant un choc moindre sur l'organisme.

La TCMH, quant à elle, ne présente pas de variations significatives par rapport à J0 car elle correspond à la quantité d'hémoglobine présente dans un seul globule rouge et n'est pas directement affectée par la dilution du sang et les variations de volume des globules rouges.

Il est supposé que des mécanismes de compensation (dus à une mobilisation de la réserve splénique) ont lieu entre J0 et J1, mis en évidence par un taux d'hémoglobine et une numération globulaire qui restent stables, tandis que d'autres variables telles que l'hématocrite, le VGM et la CCMH, présentent des variations.

Cependant, il existe un seuil de volume prélevé à partir duquel le taux d'hémoglobine et la numération globulaire ne peuvent plus être compensés, expliquant des résultats qui diminuent de manière plus marquée pour le groupe F.

### 3. Entre J1 et J42

À partir de J1, la numération globulaire et le taux d'hémoglobine chutent très légèrement, de manière plus évidente chez les groupes B, D, E et F. Un discret pic de valeurs est observable à J15. Lorsque mis en relation avec les comptages cellulaires, il reflète l'augmentation du nombre de globules rouges et de la quantité d'hémoglobine due à l'érythropoïèse. En effet, la quantité de cellules immatures pour l'ensemble des groupes culmine à J15 puis diminue progressivement jusqu'à J42. À J15, on a donc une modification de la population érythrocytaire avec une proportion plus élevée de cellules immatures, qui sont de taille supérieure à celle d'un érythrocyte mature et contiennent moins d'hémoglobine. Ces modifications causent une diminution de la TCMH, une

augmentation du VGM et une diminution de la CCMH qui auront pour conséquence une diminution du taux d'hémoglobine.

Suite à un prélèvement de 12 % du volume sanguin chez des truites arc-en-ciel, la numération globulaire, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine présentent une augmentation linéaire entre J9 et J27 d'environ 13 %, 20 % et 14 % de leur valeur initiale (Lane, 1978). Aucune récupération complète du taux d'hémoglobine n'est visualisée au bout de 27 jours. Nos résultats entre J1 et J42 montrent un pic de valeurs, observable à J15, et une relative stabilité, quoiqu'avec une très forte variabilité, voire une diminution, entre J1 et J42, du taux d'hémoglobine, de la numération globulaire ou de l'hématocrite, en lien probable avec notre biais de dilution sur cette période. L'influence de notre procédure de suivi peut également expliquer la lente remontée des paramètres hématologiques dans notre étude. Peu d'informations sont données concernant les modalités de prélèvement et les poissons au sein de l'étude de Lane.

Par ailleurs on retrouve une diminution de la CCMH entre J9 et J18 d'environ 15 % de la valeur initiale, qui peut être comparée à la diminution de la CCMH de 30 - 40 % entre J1 et J15 dans notre étude. La durée sur laquelle ces variations sont mesurées n'est pas la même, mais nous pouvons tout de même associer ce nadir de la CCMH autour de J15 - J18 dans les deux études à une modification de la population érythrocytaire liée à l'érythropoïèse. La CCMH dans l'étude de Lane (1978) est cependant généralement plus faible que celle visualisée au cours de notre étude. En effet, elle présente une CCMH d'environ 65 % de sa valeur initiale à J15, tandis qu'aucune CCMH moyenne inférieure à 85 % de sa valeur initiale n'a été enregistrée au cours de notre étude. L'étude de Lane a utilisé des pourcentages par rapport à des valeurs de références prédéfinies (de 19,4 % pour la CCMH par exemple) sans utiliser les poissons comme leur propre témoin, pouvant expliquer ces variations. Par comparaison, la moyenne de la CCMH de notre étude à J0 est de  $16,98 \pm 1,71$  % (Annexe 5), mais nous avons vu que les conditions environnementales, ainsi que des facteurs individuels tels que la souche des truites par exemple, non précisés dans l'étude de Lane, peuvent modifier cette variable hématologique déjà sujette à une forte variabilité inter-individuelle.

Concernant les comptages cellulaires, il n'a pas été possible de réaliser des comptages à chaque étape de prélèvement pour tous les poissons des groupes. Ainsi, seul un poisson par groupe a été suivi ne permettant pas de tirer de conclusion sur l'amplitude de la régénération sanguine selon les groupes. Cependant, ils nous permettent de confirmer que la régénération sanguine intervient au même moment pour l'ensemble des groupes, culminant à J15.

Chez les rongeurs, le pic de VGM est visualisé à J8, et non à J15 comme au sein de notre étude, et est proportionnel au volume prélevé avec une augmentation du VGM plus élevée chez les rongeurs des groupes qui ont été prélevés des plus gros volumes de sang (Nahas *et al.*, 2000). L'amplitude de ce pic n'est pas proportionnelle au volume prélevé au sein de notre étude, soulignant la variabilité chez les poissons. Par ailleurs, chez les rongeurs, la quantité de réticulocytes, le dernier stade dans l'érythropoïèse avant l'érythrocyte mature, augmente dans les

deux premiers jours à la suite d'une perte de 30 - 40 % du volume sanguin circulant, culmine vers 5 jours, puis retourne à un niveau habituel avant le 10<sup>ème</sup> jour (Ramaiah, 2018). Ceci témoigne d'une érythropoïèse déclenchée plus tardivement chez les truites arc-en-ciel par rapport aux rongeurs, justifiant d'une nécessité d'un temps de récupération à la suite d'un prélèvement supérieur à celui d'un mammifère, ce qui va à l'encontre des résultats de Zang *et al.* en 2013 chez des poissons zèbres.

Par ailleurs, deux poissons supplémentaires ont été suivis pour évaluer l'impact des relations de dominance sur cette régénération sanguine. Le poisson B21P1 (Fbis), poisson dominant, et le poisson B21P5 (Fter), poisson soumis, présentent le même type de courbe que les autres poissons avec une amplitude similaire, justifiant que ces relations ne se répercutent pas forcément sur leur récupération biologique (Figure 42).

À partir de J15, le VGM diminue tandis que la CCMH augmente, ce qui indique une maturation des cellules qui auront une taille plus petite et donc une concentration en hémoglobine plus élevée.

Pour l'ensemble des groupes, un pic d'érythropoïèse est observé à J15 pour lequel on retrouve le pourcentage maximal de cellules immatures. Ce pic intervient une semaine plus tard que chez les rongeurs, indiquant la nécessité d'attribuer un temps de récupération à la suite d'un prélèvement plus long chez les truites arc-en-ciel que chez les rongeurs.

Nos données ne permettent pas de relier l'intensité de l'érythropoïèse avec le volume prélevé.

#### 4. À partir de J42

À partir de J42, le taux d'hémoglobine, la numération globulaire et l'hématocrite augmentent progressivement, en parallèle de l'évolution du gain de poids des animaux. Les groupes ayant subi un prélèvement unique semblent récupérer plus rapidement les valeurs basales des paramètres hématologiques par rapport aux groupes ayant subi des prélèvements répétés à J0. En effet, seuls les groupes A, B et C présentent un taux d'hémoglobine et un hématocrite qui ne sont pas significativement différents par rapport à J0. La quantité d'héparine étant rigoureusement contrôlée dans les seringues à partir de J56, l'augmentation des valeurs peut être artificiellement provoquée par une concentration plus élevée du sang dans les tubes analysés à partir de cette date.

L'augmentation et la diminution très progressive du VGM et de la CCMH respectivement, qui tendent vers les valeurs obtenues à J0, indiquent un retour lent vers les valeurs initiales. Comme mentionné ci-dessus, ceci est plus marqué chez les groupes A, B et C que chez les groupes

D, E et F. Les groupes ayant subi un prélèvement unique à J0 semblent ainsi récupérer plus rapidement que ceux ayant subi trois prélèvements répétés, allant à l'encontre de ce que proposent Diehl *et al.* (2001) comme temps de récupération selon le type de prélèvement chez les rongeurs (Tableau VIII). La réalisation de plusieurs prélèvements en 24h sur des poissons nécessite, contrairement aux rongeurs, plusieurs anesthésies pouvant affaiblir davantage l'organisme. De plus, l'érythropoïèse semble intervenir plus tardivement chez les poissons, qui pourraient accumuler l'impact des prélèvements et réagir bien après l'ensemble des prélèvements quand les rongeurs pourraient au contraire entamer des processus érythropoïétiques plus spontanément dès la première perte de sang.

Différentes espèces animales n'ont pas la même érythropoïèse basale, quantifiable par le pourcentage de réticulocytes chez un individu sain. Les rongeurs ont une quantité de réticulocytes supérieure à celle d'autres mammifères ainsi que des érythrocytes avec une très courte durée de vie, pouvant justifier une réaction régénérative plus rapide à la suite d'une perte de sang (MacNeill, 2022).

Malgré la dilution des prélèvements par de l'héparine entre J1 et J42, la comparaison des résultats des différents groupes à chaque temps de prélèvement met en évidence une récupération qui semble plus rapide pour les groupes ayant subi un prélèvement unique en début d'étude, soit les groupes A, B et C. Ces résultats vont à l'encontre de ce qui est trouvé dans la littérature concernant les mammifères et en particulier les rongeurs.

La TCMH diminue progressivement au cours de l'étude, atteignant des valeurs significativement plus basses par rapport à J0 dès J15 pour les groupes B, D, E et F, et plus tardivement à J70 pour le groupe A. Celle du groupe C ne diminue cependant pas significativement. Cette baisse peut être liée à plusieurs éléments. En effet, le remplacement des globules rouges peut aboutir à des érythrocytes moins concentrés en hémoglobine, diminuant progressivement la TCMH. Une autre explication peut résider dans une carence en fer, conséquence des prélèvements répétés de contrôle, le fer étant nécessaire pour la synthèse de l'hémoglobine. Une carence en fer ne cause généralement que tardivement une diminution de la TCMH en raison de la durée de vie des érythrocytes, soit environ  $105 \pm 17$  jours chez la truite arc-en-ciel d'après Soldatov (2003), sauf en cas de stimulation de l'érythropoïèse renouvelant plus rapidement les érythrocytes, ce qui semble être le cas dans notre étude (Camaschella, 2018).

Une déficience en fer peut par ailleurs être exacerbée par un phénomène inflammatoire, qui va causer une déficience en fer fonctionnelle. En effet, chez les mammifères, un processus inflammatoire engendre une augmentation de la synthèse d'hépcidine, une protéine qui inhibe la libération du fer depuis les macrophages du foie et de la rate, menant ainsi à leur séquestration

dans ces systèmes. En conséquence, la quantité de fer disponible pour l'hémoglobine est réduite (Nairz *et al.*, 2016). Un phénomène analogue semble se produire également chez les poissons qui produisent également cette protéine en cas de réaction inflammatoire (Gerwick *et al.*, 2007), engendrant ainsi une diminution du fer disponible (Simko *et al.*, 1999).

c. Comparaison au groupe A : groupe témoin

Afin de s'affranchir au mieux du biais de dilution, nous avons décidé de considérer le groupe A comme lot témoin, correspondant à ce qui est connu et accepté comme volume prélevé chez le poisson. Si nous observons les valeurs sous forme d'index par rapport à J0, la numération globulaire et le taux d'hémoglobine varient très peu en comparaison aux valeurs du groupe A. En effet, seuls les groupes B, E et F, et les groupes B et F ont des valeurs de taux d'hémoglobine et de numération globulaire plus faibles que celles du groupe A à J1. À partir de J15, les résultats sont plutôt homogènes chez tous les groupes.

L'hématocrite est plus variable et son évolution ne dessine pas de réelle tendance tout au long de l'étude. Ces variations peuvent être liées à un certain nombre d'éléments. Tout d'abord, une dilution des prélèvements non constante a pu avoir lieu, affectant les moyennes de l'hématocrite entre les groupes, mais également entre chaque temps de prélèvement. De plus, une contraction splénique différente entre chaque poisson à chaque temps de prélèvement peut augmenter la variabilité de l'hématocrite. Enfin, une erreur analytique reste possible, que ce soit au niveau du protocole de centrifugation, peu standardisé pour du sang de poissons, ou originaire d'une lecture des tubes à microhématocrite par des opérateurs différents.

L'étude des rapports des variables hématologiques des groupes B, C, D, E et F avec celles du groupe A par un modèle linéaire mixte met en avant une absence de variation significative de la numération globulaire pour l'ensemble de ces groupes. Cependant, seuls les groupes B et C présentent un taux d'hémoglobine qui ne diverge pas significativement de celui du groupe A à partir de J15, montrant une récupération de cette variable hématologique semblable pour ces trois groupes.

En prenant en compte la numération globulaire et le taux d'hémoglobine, les modalités des groupes C et D ne causent pas de variations significatives par rapport au groupe A. À partir de J15, ces variables s'apparentent à celles du groupe A pour l'ensemble des groupes. L'hématocrite reste cependant une variable plus aléatoire qui ne permet pas de trancher quant à une éventuelle régénération sanguine au sein de notre étude.

La normalisation des résultats par rapport au groupe A met cependant en évidence une proximité plus marquée des résultats entre l'ensemble des groupes prélevés par prélèvement unique, à savoir entre les groupes A, B et C, qui récupèrent plus rapidement.

Ainsi, il est possible de réaliser des prélèvements répétés chez la truite arc-en-ciel mais le délai nécessaire pour obtenir un retour aux valeurs basales sera plus long qu'en cas de prélèvement unique.

#### d. Temps de régénération sanguine

Pour l'ensemble des variables hématologiques, il est admis qu'une différence relative supérieure ou égale à 10 % de la valeur basale peut être considérée comme significative (Nahas *et al.*, 2000). Le poisson étant reconnu pour son importante variabilité, nous avons opté pour un seuil de 15 %.

Les courbes d'analyse de survie permettent de mettre en évidence la proportion de chaque groupe ayant récupéré au moins 85 % de la valeur à J0 d'une variable donnée à chaque temps de prélèvement. La récupération de la numération globulaire ne varie pas entre les groupes, tandis que seul le groupe C présente une récupération de son taux d'hémoglobine analogue à celle du groupe A. Ainsi, les groupes à prélèvement unique semblent récupérer plus vite que ceux à prélèvements répétés. Bien que le groupe D présente des valeurs non significativement différentes par rapport au groupe A pour son taux d'hémoglobine moyen, ceci n'est pas reflété dans la courbe d'analyse de survie associée, le tracé du groupe D se séparant assez rapidement de celui du groupe A, aux alentours de J28. Ceci peut être imputable au fait que, malgré des résultats non significatifs entre les groupes A et D à J15 et J28, le groupe D a des valeurs juste en dessous de la limite prise en compte par le programme d'analyse de survie, soit inférieures à 85 % de sa valeur initiale.

Si l'on considère qu'un groupe a récupéré lorsque 85 % de l'effectif a atteint le seuil requis, tous les groupes ont récupéré leur numération globulaire à J84, seuls les groupes A, B et C ont récupéré leur taux d'hémoglobine à J84 et seul le groupe A récupère son hématocrite à J84. Avant J84, aucun des groupes n'a récupéré complètement.

Le modèle de Cox proposé fait abstraction de la variable temps et propose une estimation des chances de récupération pour l'ensemble des individus de chaque groupe, quel que soit le temps nécessaire. Les groupes A et D ont les meilleures chances que les variables hématologiques de leurs individus atteignent des valeurs semblables à celles de J0, tandis que les groupes B et F auront moins de probabilité que l'ensemble de leurs individus aient une régénération sanguine suffisante. Une fois de plus, le groupe B semble s'aligner avec les modalités les plus sévères. Les groupes E et C récupèrent plus ou moins tôt selon la variable considérée.

Si l'on estime que la régénération d'un groupe correspond à une récupération de 85 % des valeurs initiales de la numération globulaire, du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite chez 85 % d'individus de ce groupe, seul le groupe A récupère à J84, soit en 12 semaines.

Si l'on décide de faire abstraction de l'hématocrite jugée trop aléatoire en raison des prélèvements répétés tout au long de l'étude, les trois groupes A, B et C récupèrent à J84, plus rapidement que les trois groupes ayant subi une modalité à prélèvements répétés à J0.

#### e. Comparaison des deux protocoles

Si l'étude du second protocole semble indiquer une récupération plus rapide de l'hématocrite à J28 sans le prélèvement à J15, cette différence entre les groupes B (protocole 1) et B' (protocole 2) est à nuancer par le manque d'analyse statistique réalisée due à l'effectif réduit, mais également par un comportement différent des variables dès J1. En effet, l'hématocrite tout comme la numération globulaire ou le taux d'hémoglobine, semble être plus élevée pour le groupe B' que pour le groupe B. Ceci pourrait être une conséquence de l'effet de dilution causé par l'héparine pour le groupe B à J1 et J28 (cf. partie IV. D. e. 2.), non présent pour le groupe B' et limitant ainsi la réelle possibilité de comparer ces deux groupes. Pour cette même raison, comparer le groupe B' au groupe A ou au groupe C ne paraît pas envisageable.

Cependant, on observe tout de même un VGM et une CCMH revenus à leur valeur initiale à J28 chez le groupe B', contrairement à ceux du groupe B, témoignant d'érythrocytes en plus faible quantité, mais ayant repris une morphologie et une concentration en hémoglobine semblables à celles de J0. La TCMH est également moins diminuée chez le groupe moins prélevé, soulignant l'impact qu'un prélèvement supplémentaire peut avoir sur la quantité d'hémoglobine disponible.

Un autre moyen de comparer le groupe B' aux autres groupes du premier protocole est la comparaison des comptages cellulaires. Seul un frottis sanguin d'un individu du groupe B a été analysé, représentant le comptage avec le plus de cellules immatures en comparaison avec les individus des autres groupes, à savoir de 25,27 % de cellules immatures à J25, et de 13 % à J28. Cependant, l'évolution de la quantité de cellules immatures chez l'ensemble des groupes se comporte de manière similaire avec une récupération pour l'ensemble des groupes vers J70 - J84. La quantité de cellules immatures du groupe B' à J28 est inférieure à tous les poissons comptés dans le protocole 1, et correspond à des pourcentages retrouvés vers J56, voire J70. Si un seul poisson de chaque groupe est étudié ici, le différentiel de temps de récupération pour l'ensemble des groupes semble être supérieur pour le protocole 1 par rapport au groupe B' du protocole 2. Il est possible que les prélèvements de contrôle réalisés toutes les deux semaines créent un effet "bruit de fond" d'érythropoïèse, avec des quantités de cellules immatures qui restent supérieures aux quantités habituelles pendant plus longtemps.

Tableau XII : Pourcentages de cellules immatures obtenus à partir de comptages cellulaires chez un poisson par groupe pour le protocole 1, et une moyenne des comptages des poissons du groupe B' du protocole 2

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A (B17P4)	0,82	0,70	8,20	3,34	3,47	2,67	1,57	1,27
B (B14P2)	0,72	2,15	25,27	<b>13,00</b>	4,17	3,53	1,40	1,48
C (B18P5)	1,95	2,85	14,17	7,67	3,77	3,04	2,81	1,18
D (B22P1)	1,30	1,30	9,12	5,82	6,39	1,24	2,35	1,55
E (B24P6)	0,80	0,80	11,76	8,10	4,28	1,79	2,20	1,98
F (B19P2)	0,55	1,80	11,35	7,75	3,78	2,88	2,02	1,78
B' (moyenne)				<b>1,98 ± 0,53</b>				

De nombreux biais ne permettent pas de conclure quant à la différence de récupération entre le groupe B' (protocole 2) et le groupe B (protocole 1). Cependant, les comptages cellulaires ainsi que le VGM et la CCMH montrent une population immature moins importante pour le groupe B' à J28, suggérant une influence significative des prélèvements de contrôle toutes les deux semaines sur l'hématopoïèse.

#### f. Lignée blanche

Dans chaque groupe, quelques poissons se détachent des autres par une évolution de numération leucocytaire qui diverge. Cette numération peut se stabiliser vers des valeurs plus élevées (B24P4) ou plus basses (B22P1) ou évoluer de manière aiguë et courte vers l'augmentation (B18P4) ou la diminution (B17P4). Ces variations ne sont pas forcément liées à une même anomalie. En effet, B18P4 et B17P4 sont deux poissons qui prennent peu voire pas de poids au cours de l'étude, et B22P1 et B24P4 sont deux poissons qui restent parmi les plus gros de leurs bacs respectifs.

Une leucocytose aiguë peut être la conséquence de plusieurs phénomènes, les plus probables dans cette étude étant l'apparition d'une réaction inflammatoire, ou une réponse à un stress physique ou psychologique. Quant à la leucopénie, celle-ci peut être liée à des phénomènes aigus devenus chroniques, ou encore à de la malnutrition. Les rapports de dominance et de

soumission peuvent influencer sur ces grandeurs. En effet, chez des truites arc-en-ciel séparées en lots de tailles différentes, des rapports de dominance semblent se mettre en place dans les lots d'effectifs réduits, produisant un stress social chronique. Plus l'effectif est réduit, plus ce phénomène s'impose. Ainsi, chez des lots de 2, 5, ou même 9 poissons (Pottinger et Pickering, 1992 ; Roy *et al.*, 2021), le besoin naturel de former des liens hiérarchiques sociaux est amplifié. Non seulement le stress chronique conséquent peut induire directement une modification de la lignée blanche (leucocytose évoluant vers la leucopénie en cas de chronicité), mais il va également réduire la prise alimentaire, et favoriser la survenue de maladies. L'ensemble de ces facteurs peut causer une leucocytose, ou au contraire une leucopénie par déplétion.

Si les variations aiguës de la quantité de leucocytes sont majoritairement chez les poissons les plus légers ou présentant un état général moins bon, les poissons dont la prise de poids est la plus importante et qui ont un comportement dominant présentent des courbes qui se stabilisent vers des valeurs hautes ou basses. Ces valeurs peuvent correspondre à leurs valeurs basales, ou peuvent aussi être une conséquence d'un processus inflammatoire ou d'un stress moins important.

Bien que la lignée blanche soit homogène pour l'ensemble des groupes, quelques poissons présentent tout de même des écarts. Par identification des poissons et de l'ensemble des éléments zootechniques, cliniques et biologiques, il est fortement probable que ces écarts soient une autre conséquence de la mise en place de relation de dominance au sein des bacs.

#### F. Saignements et mortalité

Avec 24,2 % de mortalité, notre étude a présenté un taux de mortalité important. Cependant, la survenue de certains cas de saprolégniose dans la semaine précédant les manipulations, puis une prévalence plus importante de cas déconnectée des périodes de prélèvement semblent exclure tout lien entre les procédures étudiées et la mortalité. De plus, au vu de l'homogénéité des scorings de saignement, il est peu probable que la mortalité puisse y être imputée.

Un réel "effet bac" est visible quant à la prévalence de lésions de saprolégniose. En effet, 3 bacs ont été principalement touchés avec entre 3 et 8 poissons euthanasiés dans ces bacs, représentant 19 des 26 poissons euthanasiés au total.

## G. Modélisation statistique

Tableau XIII : Effectifs des poissons conservés dans les analyses statistiques jusqu'à J84

Groupe	Effectif de poissons présents jusqu'à J84
A	15
B	17
C	13
D	8
E	15
F	6

La mortalité élevée dans les bacs 16 et 21 laisse des effectifs réduits dans les groupes D et F, à savoir de 8 et de 6 respectivement, limitant ainsi la puissance des différents tests statistiques au cours de notre étude. De plus, l'exclusion arbitraire de certains individus, nécessaire pour ne pas impacter les résultats par les conséquences des relations de dominance au sein des bacs, réduit les effectifs tout en introduisant un biais vers des valeurs plus acceptables. En effet, en retirant certains individus présentant des résultats aberrants, on sélectionne les résultats qui nous semblent être dans les valeurs de référence. L'ensemble des données cliniques, zootechniques, et biologiques ont donc dû être prises en compte afin de ne pas exclure un poisson uniquement en raison d'une réaction inattendue de la part de l'une de ses variables hématologiques.

De plus, la dilution des prélèvements entre J1 et J42 inclus ne permet pas d'effectuer une réelle comparaison des valeurs de certaines variables hématologiques pendant cette période par rapport à celles de J0. Ceci rend difficile l'interprétation des modèles Imer, mais également des modèles de récupération des variables à moins de 15 % de leur valeur d'origine à T0.

Les modèles de récupération, construits comme une analyse de survie, présentent une pente très réduite entre J1 et J42 pour l'ensemble de leurs variables. Sans dilution, l'ensemble des groupes aurait pu récupérer plus rapidement, atteignant très probablement de meilleures proportions de récupération à J84. Ces modèles sont pertinents pour la comparaison des groupes par rapport au groupe A, mais ne rapportent pas de réelle information quant à la proportion exacte d'individus qui récupèrent à un instant donné.

De la même manière, les modèles Imer comparant les index d'une variable hématologique par groupe à sa valeur de J0, soit 100 %, sont également limités par des valeurs artificiellement plus faibles entre J1 et J42. Pour la numération globulaire, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite, seule l'utilisation du modèle avec un rapport des valeurs de chaque groupe avec

celles du groupe A est pertinente, permettant de normaliser chaque variable par rapport aux variations du groupe A, également sujet aux dilutions provoquées par les erreurs de manipulation.

L'utilisation du rapport avec les valeurs du groupe A, permettant de normaliser l'ensemble des résultats par rapport au groupe témoin, analysé avec un modèle linéaire mixte est plus fiable que la comparaison des variables deux à deux à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. En effet, il prend en compte plusieurs paramètres, à savoir les bacs, les groupes, les poissons et le temps, tandis que le test non paramétrique compare uniquement les moyennes des différentes variables à chaque temps de prélèvement.

Enfin, par manque de temps et de moyens, les comptages cellulaires n'ont pu être réalisés pour l'ensemble des poissons, ne permettant pas de dégager différents niveaux d'intensité d'érythropoïèse selon les différentes modalités de prélèvement. Les comptages sont donc là uniquement à titre indicatif pour évoquer une tendance générale chez l'ensemble des groupes à présenter le plus de cellules immatures à J15.

## Conclusion

Cette étude cherche à répondre à deux interrogations : Est-il possible de prélever un volume de sang plus important que celui préconisé par le CCPA chez des truites arc-en-ciel ? Quelle est la durée nécessaire pour la récupération selon le volume prélevé ?

Lors de cette étude, nous avons constaté que l'ensemble des modalités de prélèvement sanguin testées (prélèvements uniques ou répétés), est bien toléré par les poissons. En effet, bien que certains groupes aient présenté une mortalité élevée, cette dernière ne peut que difficilement être attribuée aux procédures testées.

La comparaison au groupe témoin, prélevé du volume préconisé par le CCPA, souligne l'absence de variation de la numération globulaire à partir de J15 pour l'ensemble des groupes, et du taux d'hémoglobine à partir de J15 pour les groupes ayant été prélevé 0,3 % et 0,45 % du poids vif en une fois, et plus tardivement pour ceux ayant été prélevé 0,3 %, 0,45 % et 0,6 % en trois fois. Ainsi, pour les prélèvements uniques, les groupes semblent compenser leurs pertes sanguines de la même manière 15 jours après le prélèvement initial, suggérant qu'il est possible de prélever ces volumes chez des truites arc-en-ciel et d'avoir une régénération sanguine adéquate par la suite, au même titre que les volumes recommandés par le CCPA.

Les réponses à la question concernant la durée de régénération sanguine restent cependant partielles. Si les groupes ayant subi un prélèvement unique en début d'étude semblent récupérer plus rapidement que ceux ayant subi trois prélèvements répétés, les nombreux biais mis en évidence ne permettent pas de donner une réponse précise quant au délai de régénération sanguine. Il est néanmoins possible de suggérer un temps supplémentaire au temps proposé pour les rongeurs par Nahas *et al.* (2000) selon le type de prélèvement et le volume prélevé. Une durée de 8 à 12 semaines semble être pertinente.

De plus, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, la comparaison de la même modalité de prélèvement dans les protocoles 1 et 2 suggère que les prélèvements de contrôle répétés toutes les deux semaines influencent significativement la régénération sanguine. Il serait pertinent de reconduire des séries de prélèvements en laissant 4 à 6 semaines entre chaque prélèvement afin de limiter les interférences avec la régénération sanguine causées par ces prélèvements de contrôle.

Enfin, nous avons pu souligner l'importance de la reproductibilité lors de manipulations, sans laquelle il est impossible d'interpréter l'ensemble des résultats.

Cette étude gagnerait à être complétée par une étude complémentaire ne provoquant pas de relations de dominance, c'est-à-dire avec plus d'effectifs de poissons plus petits dans des bacs plus grands, et en limitant davantage les prélèvements de contrôle. La lecture de frottis

sanguins sur plus de poissons serait également pertinente, permettant d'apporter un aperçu direct et plus fiable de l'activité érythropoïétique des poissons.

## Bibliographie

- Adair, G.S., Bock, A.V., Field, H., 1925. The hemoglobin system : VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin, *J. Biol. Chem.* vol. 63, pp. 529–545.
- Anderson, M.G., 2021. Chicken or fish? Do environmental complexity and stocking density impact affective states of broiler chickens and rainbow trout? Virginia Tech.
- Angelidis, P., Baudin-Laurencin, F., Youinou, P., 1987. Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Biol.* vol. 31, pp. 113–122.
- Atamanalp, M., Aksakal, E., Kocaman, E.M., Uçar, A., Şişman, T., Türkez, H., 2009. The alterations in the hematological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), exposed to cobalt chloride. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*
- Atkins, C.G., Buckley, K., Blades, M.W., Turner, R.F.B., 2017. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. *Appl. Spectrosc.* vol. 71, pp. 767–793.
- Barde, R.D., Deshpande, M., Nagthane, N., Darak, O., Baig, N.M.V., 2020. A Review of Saprolegnia Infection in Freshwater Fishes and Control of the Saprolegniosis. *Sustainable Humanosphere*, vol. 16, pp. 702-711.
- Barton, B., Schreck, C., Barton, L., 1986. Effects of chronic Cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Organ.* vol. 2, pp. 173–185.
- Bear, A-E., 2005. Effects of temperature on survival and growth of Westlope Cutthroat trout and Rainbow trout : implications for conservation and restoration, Montana State University.
- Benjamin, R.J., McLaughlin, L.S., 2012. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion (Paris)* vol. 52, pp. 9S-19S.
- Black, M.C., 2000. Chapter 30 - Collection of Body Fluids, in: Ostrander, G.K. (Ed.), *The Laboratory Fish, Handbook of Experimental Animals*. Academic Press, London, pp. 513–527.
- Börjeson, H., 1977. Effects of hypercapnia on the buffer capacity and haematological values in *Salmo salar* (L.). *J. Fish Biol.* vol. 11, pp. 133–142.
- Camaschella, C., 2018. Iron deficiency. *Blood*, The American Society of Hematology.
- Canada department of Fisheries and Oceans, Blood Sampling Template.
- Cano, I., Verner-Jeffreys, D.W., van Aerle, R., Paley, R.K., Peeler, E.J., Green, M., *et al.*, 2016. Puffy Skin Disease Is an Emerging Transmissible Condition in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum.
- Canovas M., Brandts, I., Mesalles, M., Roher, N., Pastor, J., Teles, M., date non renseignée Comparison of the effects of Na<sub>2</sub>EDTA and heparin as anticoagulants in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hematological parameters analyzed by an automated blood cell analyzer (Sysmex XN-1000V).
- Caldwell, C.A., Hinshaw, J., 1994. Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture* vol. 126, pp. 183–193.
- Casillas, E., Smith, L.S., 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* vol. 10, pp. 481–491.

- CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux. Lignes directrices sur : le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests.
- Charoo, S.Q., Chalkoo, S.R., Qureshi, T.A., 2014. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood profile alterations. Research Scholar, Department of Applied Aquaculture and Zoology Barkatullah, vol.9, no. 2.
- CIPA, Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture, 2023. Chiffres clés, La production d'eau douce.
- Conte, F.P., Wagner, H.H., Harris, T.O., 1963. Measurement of blood volume in the fish ( *Salmo gairdneri gairdneri* ). *Am. J. Physiol.-Leg.* Content 205, pp. 533–540.
- Corum, Orhan, Duygu Durna Corum, Ertugrul Terzi, and Kamil Uney. 2023. Pharmacokinetics, Tissue Residues, and Withdrawal Times of Oxytetracycline in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) after Single- and Multiple-Dose Oral Administration. *Animals* 13, no. 24: 3845.
- Crowell, J.W., Smith, E.E., 1967. Determinant of the optimal hematocrit. *J. Appl. Physiol.* vol. 22:3, pp. 501-504.
- De Kinkelin, P., Dorson, P., Prunet, P., 2018. Éléments d'ichthyologie. *Santé des poissons*, hal-02790955
- DeWilde, M.A., Houston, A.H., 1967. Hematological Aspects of the Thermoacclimatory Process in the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Res. Board Can.* vol. 24, pp. 2267–2281.
- Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., Vorstenbosch, C.V.D., 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* vol. 21, pp. 15–23.
- Doig, K., Zhang, B., 2017. A Methodical Approach to Interpreting the Red Blood Cell Parameters of the Complete Blood Count. *Am. Soc. Clin. Lab. Sci.* vol. 30, pp. 173–185.
- Duff, D.W., Fitzgerald, D., Kullman, D., Lipke, D.W., Ward, J., Olson K.R., 1987. Blood volume and red cell space in tissues of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 87A, pp. 393-398.
- Duman, M., Saticioglu, I.B., Suzer, B., Altun, S., 2019. Practices for Drawing Blood Samples from Teleost Fish. *North Am. J. Aquac.* vol. 81, pp. 119–125.
- Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.* vol. 11, pp. 453–491.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* vol. 61, pp. 493–531.
- Erikson, U., 2008. Live Chilling and Carbon Dioxide Sedation at Slaughter of Farmed Atlantic Salmon: A Description of a Number of Commercial Case Studies. *J. Appl. Aquac.* vol. 20, pp. 38–61.
- Evans, G., O., 1994. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals*, vol. 28(2), pp. 178-179.
- Fänge, R., Nilsson, S., 1985. The fish spleen: structure and function. *Experientia* 41, pp. 152–158.
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G., Faggio, C., 2015. The Influence of Acute Handling Stress on Some Blood Parameters in Cultured Sea Bream (*Sparus Aurata Linnaeus*, 1758). *Ital. J. Food Saf.* vol. 4 : 4174.
- France AgriMer, 2023. Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2023.
- FSBI, Fisheries Society of the British Isles, Granta information Systems, 82A High Street, Sawston, Cambridge CB2 4H, 2002. *Fish Welfare Briefing Paper 2*.

- Furie, B., Furie, B.C., 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* vol. 53, pp. 505–518.
- Gallaugh, P., Axelsson, M., Farrell, A.P., 1992. Swimming Performance and Haematological Variables in Splenectomized Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *J. Exp. Biol.* vol. 171, pp. 301–314.
- Gallaugh, P., Thorarensen, H., Farrell, A.P., 1995. Hematocrit in oxygen transport and swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Respir. Physiol.* vol. 102, pp. 279–292.
- Gebretsadkan, G., 2015. The Comparison between Microhematocrit and Automated Methods for Hematocrit Determination. *Int. J. Blood Res. Disord.* vol. 2.
- Gingerich, W.H., Pityer, R.A., Rach, J.J., 1987. Estimates of plasma, packed cell and total blood volume in tissues of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. Physiol.* vol. 87A, pp. 251–256.
- Gingerich, W.H., Pityer, R.A., 1989. Comparison of whole body and tissue blood volumes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with <sup>125</sup>I bovine serum albumin and <sup>51</sup>Cr-erythrocyte tracers. *Fish Physiol. Biochem.* vol. 6, pp. 39–47.
- Gingerich W.H., Pityer R.A., Rach J.J. 1990. Whole body and tissue blood volumes of two strains of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Physiol.* 97A, pp. 251–256.
- Grant, K.R., 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Veterinary Clin. North Am. Exot. Anim. Pract., Hematology* vol. 18, pp. 83–103.
- Härdig, J., Olsson, L., Höglund, L.B., 1978. Autoradiography on erythrokinesis and multihemoglobins in juvenile *Salmo salar* L. at various respiratory gas regimes. *Acta Physiol. Scand.* vol. 103, pp. 240–251.
- Heath, A.G., 1971. A critical comparison of methods for measuring fish respiratory movements. *Water research Pergamon Press*, vol. 6, pp. 1-7.
- Heydarnejad, M.S., Parto, M. and Pilevarian, A.A., 2013. Influence of light colours on growth and stress response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under laboratory conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 97, pp. 67-71.
- Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A., 1992. The Cardiovascular System, *Fish Physiology*, Academic Press.
- Hochachka, P.W., 1961. The effect of physical training on oxygen debt and glycogen reserves in trout. *Can. J. Zool.* vol. 39, pp. 767–776.
- Hoffmann, R., Lommel, R., 1984. Effects of repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish. *J. Fish Biol.* vol. 24, pp. 245–251.
- Holeton, G., Randall, D., 1967. Changes in Blood Pressure in the Rainbow Trout During Hypoxia. *J. Exp. Biol.* vol. 46, pp. 297–305.
- Houston, A.H., Dobric, N., Kahurananga, R., 1996a. The nature of hematological response in fish. *Fish Physiol. Biochem.* vol. 15, pp. 339–347.
- Houston, A.H., Roberts, W.C., Kennington, J.A. 1996b. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry* vol. 15, pp. 481-489.
- Huggel, H.J., Lane, H.C., Ducret, C.G, 1969. Détermination de la courbe d'homogénéisation et du volume sanguin circulant de la truite *Salmo gairdneri* Rich par la méthode de la dilution isotopique de l' <sup>131</sup>I et du <sup>51</sup>Cr. *J. de Physiol. (Paris)*, vol. 61, No. 2, pp. 145-154.
- Hughes, G.M., Morgan, M., 1973. The Structure of Fish Gills in Relation to Their Respiratory Function. *Biol. Rev.* vol. 48, pp. 419–475.

- Imtiaz, A., Ishtiyag, A., 2020. Effect of dietary protein levels on growth performance, hematological profile and biochemical composition of fingerlings rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* reared in Indian himalayan region. *Aquaculture Reports*, vol. 16, ISSN 2352-5134.
- Ishimatsu, A., Iwama, G.K., Bentley, T.B., Heisler, N., 1992. Contribution of the Secondary Circulatory System to Acid–Base Regulation During Hypercapnia in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *J. Exp. Biol.* vol. 170, pp. 43–56.
- Iwama, G.K., McGeer, J.C., Pawluk, M.P., 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool.* vol. 67, pp. 2065–2073.
- Iwama, G.K., 2007. The welfare of fish. *Dis. Aquat. Organ.* vol. 75, pp. 155–158.
- Jewett, M.G., Behmer, D.J., Johnson, G.H., 1991. Effects of Hyperoxic Rearing Water on Blood Hemoglobin and Hematocrit Levels of Rainbow Trout. *J. Aquat. Anim. Health* vol. 3, pp. 153–160.
- Johnsson, J.I., 2003. Group size influences foraging effort independent of predation risk: an experimental study on rainbow trout. *J. Fish Biol.* vol. 63, pp. 863–870.
- Jones, D.T., Moffitt, C.M., 2004. Swimming Endurance of Bull Trout, Lake Trout, Arctic Char, and Rainbow Trout following Challenge with *Renibacterium salmoninarum*. *J. Aquat. Anim. Health* vol. 16, pp. 10–22.
- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S., E., Panopoulos, G., Papoutsoglou., E., S., Chadio, S., Kalogiannis, D., 2008. Effects of light spectrum on growth and stress response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. *Aquacultural Engineering*, vol. 38, iss. 1, pp. 36-42,
- Kasagi, S., Miurab, M., Okazakib, T., Mizusawaa, K., Takahashia, A., 2020. Effects of tank color brightness on the body color, somatic growth, and endocrine systems of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 298, 113581.
- Kaya, H., Yilmaz, S., Gürkan, M., Hisar, O., 2013. Effects of environmental hypercapnia on hemato-immunological parameters, carbonic anhydrase, and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Toxicol. Environ. Chem.* vol. 95, pp. 1395–1407.
- Kondera, E., 2019. Haematopoiesis and haematopoietic organs in fish. *Scientific Annals of Polish Society of Animal Production* vol. 15, no. 1, pp. 9-16.
- Kulkeaw, K., Sugiyama, D., 2012. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. *Stem Cell Res. Ther.* vol. 3:55.
- Lamarche, M.C., 2010. Impact de l'hypoxie chronique et aigüe sur les capacités métaboliques de la morue franche (*Gadus Morhua*). Faculté des sciences et génie, Université Laval, Québec.
- Lane, H.C., 1978. Some haematological responses of normal and splenectomized rainbow trout *Salmo gairdneri* to a 12% blood loss. *J. Fish Biol.* vol. 14, pp. 159–164.
- Lane, H.C., Sharp, T.P., 1980. Changes in the population of polyribosomal containing red cells of peripheral blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following starvation and bleeding. *J. Fish Biol.* vol. 17, pp. 75–81.
- Lane, H.C., Rolfe, A.E., Nelson, J.R., 1981. Changes in the nucleotide triphosphate/haemoglobin and nucleotide triphosphate/red cell ratios of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, subjected to prolonged starvation and bleeding. *J. Fish Biol.* vol. 18, pp. 661–668.

- Lawrence, M.J., Raby, G.D., Teffer, A.K., Jeffries, K.M., Danylchuk, A.J., Eliason, E.J., Hasler, C.T., Clark, T.D., Cooke, S.J., 2020. Best practices for non-lethal blood sampling of fish *via* the caudal vasculature. *J. Fish Biol.* vol. 97, pp. 4–15.
- Lone, G.N., Shammi, Q.J., Mir, S.A., Sheikh, I.A., Chalkoo, S.R., 2012. Rainbow Trout Haematology Coinciding with Metabolic Requirement. *Walailak J. Sci. Technol. WJST* vol. 9, pp. 309–316.
- Luchiar, A.C. and Pirhonen, J. 2008. Effects of ambient colour on colour preference and growth of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology*, vol. 72: pp. 1504-1514.
- MacNeill, A.L., 2022. Hematology of Rodentia, *Schalm's Veterinary Hematology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1026-1033.
- Marine Directorate, 2023. Diseases of wild and farmed Finfish – Saprolegnia. *Diseases of finfish, molluscs and crustaceans*, Scottish Government.
- Maqbool, A., Ahmed, I., Ahmed Sheikh, Z., 2014. Effects of two commonly used anticoagulants on haematology and erythrocyte morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, vol. 2(1), pp. 239-243.
- McCarthy, D.H., Stevenson, J.P., Roberts, M.S., 1973. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Biol.* vol. 5, pp. 1–8.
- McCormick, S.D., Shrimpton, J.M., Carey, J.B., O’Dea, M.F., Sloan, K.E., Moriyama, S., Bjornsson, B.Th, 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, vol. 168, pp. 221–235.
- McGuill, M. W., Rowan, A. N., 1989. Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques. *ILAR Journal*, vol. 31, iss. 4, pp. 5–20.
- McLean, E., Ash, R., 1989. Chronic cannulation of the hepatic portal vein in rainbow trout, *Salmo gairdneri* : a prerequisite to net absorption studies. *Aquaculture*, vol 78, pp. 195-205.
- Migaud, H., Cowan, M., Taylor, J., Ferguson, H., W., 2007. The effect of spectral composition and light intensity on melatonin, stress and retinal damage in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, vol. 270, iss. 1–4, pp.390-404.
- Milligan, C.L., Wood, C.M., 1982. Disturbances in Haematology, Fluid Volume Distribution and Circulatory Function Associated with Low Environmental pH in the Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*. *J. Exp. Biol.* vol. 99, pp. 397–415.
- Mise Yonar, S., 2019. Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid. *Fish and Shellfish Immunology*.
- Mishra, B. K., Khalid, M. A., Labh, S. N., 2021. Assessment of water temperature on growth performance and protein profiles in liver and kidney of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Experimental Zoology*. 1. pp 145-152.
- Morgan, A.L., Thompson, K.D., Auchinachie, N.A., Migaud, H., 2008. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 25, pp. 791-799.
- Mork, O., I., Gulbrandsen, J., 1994. Vertical activity of four salmonid species in response to changes between darkness and two intensities of light. *Aquaculture*, vol. 127, pp 317-328.

- Murad, A., Houston, A.H., Samson, L., 1990. Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Fish Biol.* vol. 36, pp. 289–305.
- Murad, A., Houston, A., 1991. Haemoglobin isomorph abundances in splenectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* vol. 38, pp. 641–651.
- Nabi, N., Ahmed, I., Wani, G.B., 2022. Hematological and serum biochemical reference intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells. *Saudi J. Biol. Sci.* vol. 29, pp. 2942–2957.
- Nahas, K., Provost, J.-P., Baneux, Ph., Rabemampianina, Y., 2000. Effects of acute blood removal via the sublingual vein on haematological and clinical parameters in Sprague-Dawley rats. *Lab. Anim.* vol. 34, pp. 362–371.
- Nairz, M., Theurl, I., Wolf, D. *et al.*, 2016. Iron deficiency or anemia of inflammation? *Wien Med Wochenschr*, vol. 166, pp. 411–423.
- Neiffer, D.L., Stamper, M.A., 2009. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR J.* vol. 50, pp. 343–360.
- Nikinmaa, M., Huestis, W.H., 1984. Adrenergic Swelling of Nucleated Erythrocytes: Cellular Mechanisms in A Bird, Domestic Goose, and Two Teleosts, Striped Bass and Rainbow Trout, *J. exp. Biol.* vol. 113, pp. 215-224.
- Nikinmaa, M., 2001. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respir. Physiol.* vol. 128, pp. 317–329.
- Nikinmaa, M., 1982. Effects of adrenaline on red cell volume and concentration gradient of protons across the red cell membrane in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Molecular Physiology*, vol. 2, pp. 287-297.
- Northrop-Clewes, C.A., Thurnham, D.I., 2013. Biomarkers for the differentiation of anemia and their clinical usefulness. *J. Blood Med.* vol. 4, pp. 11–22.
- Olson, K.R., Kinney, D.W., Dombkowski, R.A., Duff, D.W., 2003. Transvascular and intravascular fluid transport in the rainbow trout: revisiting Starling's forces, the secondary circulation and interstitial compliance. *J. Exp. Biol.* vol. 206, pp. 457–467.
- Olver, C.S., 2022. Erythropoiesis. Schalm's Veterinary Hematology.
- Orun, I., Suiçmez, M., Kalkan, E., Ulus, E., 2004. Effects of the copper on the haematology of the *Oncorhynchus mykiss*. *Indian Journal of Animal Sciences*, vol. 74, pp. 797-801.
- Palis, J., 2014. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* vol. 5.
- Panara, V., Varaliová, Z., Wilting, J., Koltowska, K. and Jeltsch, M., 2024. The relationship between the secondary vascular system and the lymphatic vascular system in fish. *Biol Rev.*
- Pankhurst, N.W., 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* vol. 170, pp. 265–275.
- Pearson, M.P., Stevens, E.D., 1991. Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* vol. 9, pp. 39–50.
- Perry, S.F., Gilmour, K.M., 1996. Consequences of Catecholamine Release on Ventilation and Blood Oxygen Transport During Hypoxia and Hypercapnia in an Elasmobranch (*Squalus Acanthias*) and a Teleost (*Oncorhynchus Mykiss*). *J. Exp. Biol.* vol. 199, pp. 2105–2118.
- Perry, S.F., Tufts, B., 1998. Fish Respiration. Academic Press.

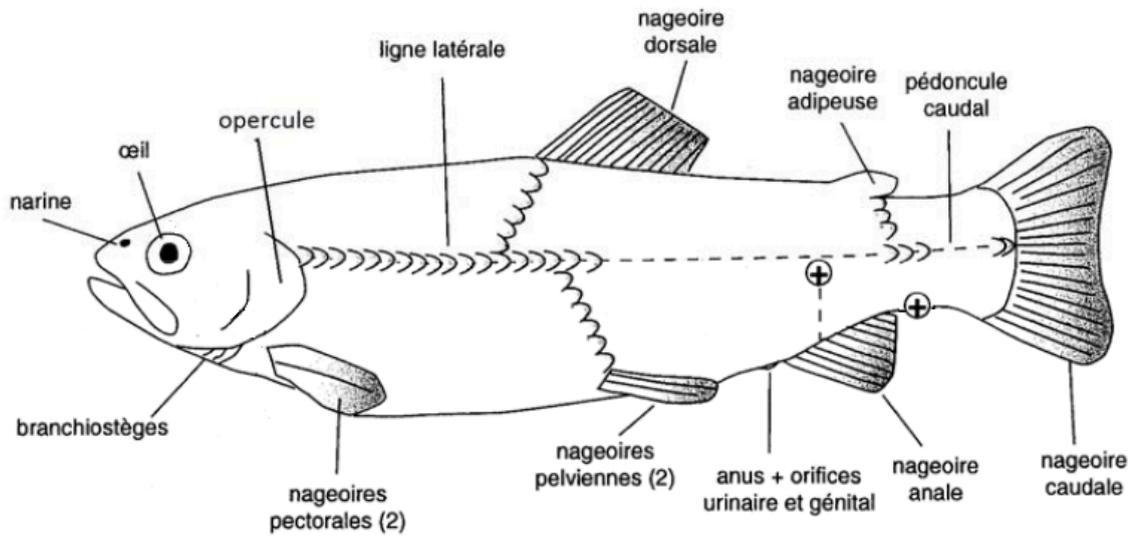
- Peters, G., Faisal, M., Lang, T., Ahmed, I., 1988. Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis. Aquat. Organ.* vol. 4, pp. 83–89.
- Piiper, J., 1982. Respiratory Gas Exchange at Lungs, Gills and Tissues: Mechanisms and Adjustments. *J. Exp. Biol.*, vol. 100, pp. 5–22.
- Pisciculteurs de France, 2023. Filière piscicole : les chiffres clés.
- Pottinger, T.G., Pickering, A.D., 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.* vol. 41, pp. 435–447.
- Raleigh, R. F., Hickman, T., Solomon, R. C., Nelson, P. C., 1984. Habitat Suitability Information : Rainbow trout.
- Ramaiah, L., 2018. The Hematopoietic System: Evaluation and Data Interpretation in Nonclinical Safety Studies.
- Readman, G.D., Owen, S.F., Murrell, J.C., Knowles, T.G., 2013. Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive? *PLoS ONE* 8(9): e73773.
- Řehulka, J., 2002. Aeromonas Causes Severe Skin Lesions in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology, and Biochemistry. *Acta Vet. Brno* vol. 71, pp. 351–360.
- Řehulka, J., Minařík, B., Řehulková, E., 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquac. Res.* vol. 35, pp. 529–546.
- Reid, C.H., Vandergoot, C.S., Midwood, J.D., Stevens, E.D., Bowker, J., Cooke, S.J., 2019. On the Electroimmobilization of Fishes for Research and Practice: Opportunities, Challenges, and Research Needs. *Fisheries* vol. 44, pp. 576–585.
- RSPCA, 2020. RSPCA welfare standards for farmed rainbow trout.
- Roth, B., Imsland, A.K., Foss, A., 2009. Live chilling of turbot and subsequent effect on behaviour, muscle stiffness, muscle quality, blood gases and chemistry. *Anim. Welf.* vol. 18, pp. 33–41.
- Roy, J., Terrier, F., Marchand, M., Herman, A., Heraud, C., Surget, A., Lanuque, A., Sandres, F., Marandel, L., 2021. Effects of Low Stocking Densities on Zootechnical Parameters and Physiological Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Juveniles. *Biology* vol. 10, pp. 1040.
- Ruiz, N., García-Meilán, I., Khansari, A.R., Teles, M., Pastor, J., Tort, L., 2024. Repeated hypoxic episodes allow hematological and physiological habituation in rainbow trout. *Front. Physiol.* vol. 15.
- Savić, N., Mikavica, D., 2021. Effects of different light intensity on the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. International Symposium on Agricultural Sciences AgroReS 2021, Proceedings, pp. 153-159.
- Schreck, C.B, 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 165, iss. 3, pp. 549-556.
- Simko, E., El-Mowafi, A., Bettger, W.J., Ostland, V.E., Ferguson, H.W. and Hayes, M.A., 1999. Alterations in iron, zinc and major plasma proteins of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), with sterile peritonitis induced by oil-adjuvanted multivalent bacterin vaccination. *Journal of Fish Diseases*, vol. 22, pp. 81-90.
- Soivio, A., Nynolm, K., 1975. A technique for repeated sampling of the blood of individual fish. *J. exp. Biol.*, vol. 62, pp. 207-217.

- Soldatov, A.A., 2003, Peculiarities of Organization and Functioning of the Fish Red Blood System. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 41, pp. 217-223.
- Souza, P.C. de, Bonilla-Rodriguez, G.O., 2007. Fish hemoglobins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* vol. 40, pp. 769–778.
- Sriram K., Y. B., Vázquez S., Tsai A. G., Cabrales P., Intaglietta M., and Tartakovsky D. M., 2012, Autoregulation and mechanotransduction control the arteriolar response to small changes in hematocrit, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 303:9, pp. H1096-H1106
- Steffensen, J.F., Lomholt, J.P., Vogel, W.O.P., 1986. In vivo Observations on a Specialized Microvasculature, the Primary and Secondary Vessels in Fishes. *Acta Zool.* vol. 67, pp. 193-200.
- Stern, J., 2022. Hematology of Salmonids, *Schalm's Veterinary Hematology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1176–1181.
- Thomas, P., Robertson, L., 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture* vol. 96, pp. 69-86.
- Thomson E., M., Kalayci, H., Walker, M., 2019. Conséquences cumulatives de l'exposition à des stressseurs chez les Canadiens : un profil de la charge allostatique. Rapport sur la santé, *Statistics Canada*.
- Tsin A., T., C., Beatty, D., D., 1977. Visual Pigment Changes in Rainbow Trout in Response to Temperature. *Science* vol. 195, pp. 1358-1360
- To, M., Villatoro, V., 2019. Red blood cell maturation.
- Tun, N., Houston, A.H., 1986. Temperature, oxygen, photoperiod, and the hemoglobin system of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* vol. 64, pp. 1883–1888.
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2006a. Effects of constant light on haematological parameters of cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Fish Physiol. Biochem.* vol. 32, pp. 113–120.
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2006b. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* vol. 251, pp. 596–602.
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2007. Some changes in the haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three artificial photoperiod regimes. *Fish Physiol. Biochem.* vol. 33, pp. 35–48.
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2008. Effects of different artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* vol. 34, pp. 159–167.
- Viel, A., Chailleux, A., Bachelet, F., David, C., Pineau, L., Calvez, S., Rostang, A., 2024. Étude pharmacocinétique de l'oxytetracycline et modélisation chez la truite à différentes températures. JRFP Rennes 2 juillet 2024.
- Viel, A., Rostang, A., Morvan, M.L., et al. 2021. Population pharmacokinetics/ pharmacodynamics modelling of enrofloxacin for the three major trout pathogens *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, 545:737119.
- Vermeulen, W., Kaiser, H., 2008. A note on the formation of red blood cells in rainbow trout vertebral bone marrow. *J. Appl. Ichthyol.* vol. 24, pp. 621–622.

- Wagner, G.N., Singer, T.D., Scott McKinley, R., 2003. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* vol. 34, pp. 1139–1146.
- Webster, A.J.E., 2001. Farm animal welfare : The five freedoms and the free market. *The Veterinary Journal* 2001, vol. 161, pp. 229–237.
- Wildgoose, W., 1998. Skin disease in ornamental fish: identifying common problems. *Exotic animals in practice*.
- Wilkie, M.P., Simmons, H.E., Wood, C.M., 1996. Physiological adaptations of rainbow trout to chronically elevated water pH (pH = 9.5). *J. Exp. Zool.* vol. 274, pp. 1–14.
- Witeska, M., 2005. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. *Electron. J. Ichthyol.* vol. 1, pp. 35-41.
- Witeska M., 2015. Anemia in teleost fishes. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, vol. 35(4), pp. 148-160.
- Witeska, M., Teodorczuk, B., Lugowska, K., 2017. Hematological effects of etomidate and tricaine in common carp. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* vol. 41, pp. 93–98.
- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., Bojarski, B., 2022. Hematological methods in fish – Not only for beginners. *Aquaculture* vol. 547, 737498.
- Witters, H.E., Van Puymbroek, S., Van Den Sande, I., Vanderborght, O.L.J., 1990. Haematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminium exposure. *J. Comp. Physiol. B* vol. 160, pp. 563–571.
- Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., Nishimura, N., 2013. A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. *Zebrafish*, pp. 425-432.

## Annexes

Annexe 1 : Dessin schématique de l'anatomie externe de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)  
Le dessin montre les emplacements des points de ponction de la veine caudale utilisés au cours de cette étude (De Kinkelin et al., 2018).

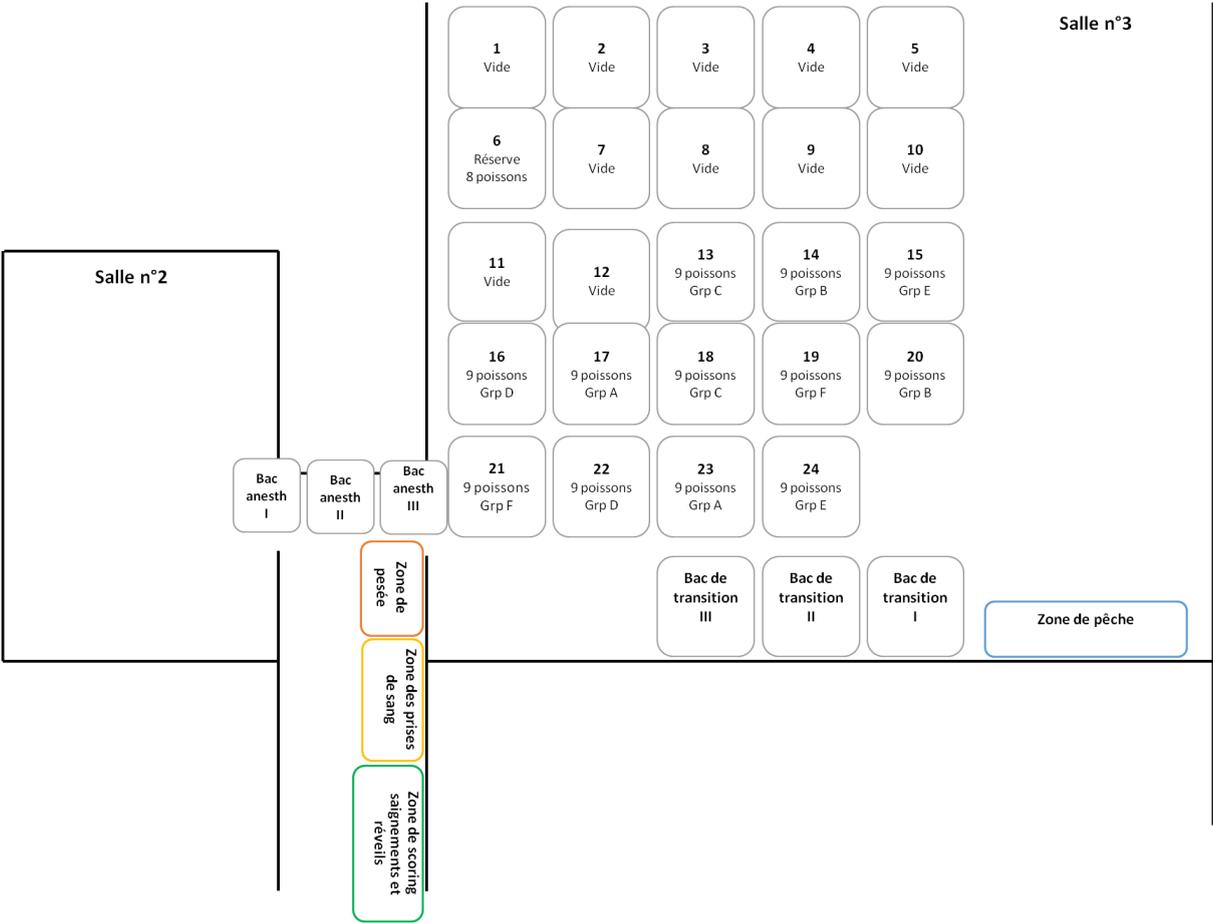


Annexe 2 : Planning des manipulations de l'ensemble de l'étude, avec le Protocole 1 commençant à J0, et le Protocole 2 à J56.

2024									J0	J1	J7	J15	
15-janv	22-janv	29-janv	05-févr	12-févr	19-févr	26-févr	04-mars	11-mars	18-mars	19-mars	25-mars	02-avr	
ACCLIMATATION DES POISSONS (salle1)		Tri Passage en salle 3 (120 poissons)	ACCLIMATATION DES POISSONS (salle 3)				Tri Identification (108 poissons)			<b>PROTOCOLE 1 :</b> Prélèvement initiaux (108 poissons)	Prélèvement unique de 0,2mL (108 poissons)		Prélèvement unique de 0,2mL (108 poissons)
									6 Bacs prélèvements uniques (54 poissons) 6 Bacs prélèvements répétés (T0h, T2h et T6h) (54 poissons)	Tous les bacs		Tous les bacs	
ACCLIMATATION DES POISSONS (salle1)													

J21	J28	J35	J42	J49	J56	J57	J63	J70	J77	J84
08-avr	15-avr	22-avr	29-avr	06-mai	13-mai	14-mai	20-mai	27-mai	03-juin	10-juin
	Prélèvement unique de 0,2mL (108 poissons)		Prélèvement unique de 0,2mL (108 poissons)		Prélèvement unique de 0,2mL (108 poissons)			Prélèvement unique de 0,2mL (108 poissons)		Prélèvement final et fin de protocole Euthanasie
	Tous les bacs		Tous les bacs		Tous les bacs			Tous les bacs		Tous les bacs
					<b>PROTOCOLE 2 :</b> Tri Identification Prélèvement initial (12 poissons)	Prélèvement unique de 0,2mL (12 poissons)				Prélèvement final et fin de protocole Euthanasie
					Bacs 11-12 Prélèvement unique procédure B (12 poissons)	Bacs 11 et 12				Bacs 11 et 12

Annexe 3 : Organisation de l'espace pour la manipulation du 18/03/2024 et répartition des groupes dans les bacs



#### *Annexe 4 : Fiche de points limites*

##### **Nage erratique**

0 : Nage sur le ventre avec une bonne mobilité de l'ensemble des nageoires, bon équilibre et gestion de sa flottaison

1 : nage visiblement perturbée (penche occasionnellement sur le côté ou sur le dos, mauvaise gestion de la flottaison)

**2 : perte définitive d'équilibre (nage sur le dos ou sur le côté en permanence, ou absence complète de mouvement ou position verticale)**

##### **Réaction à la stimulation**

0 : s'enfuit et s'éloigne rapidement

1 : fuite face à la stimulation nettement ralentie

**2 : absence de réaction normale à la stimulation (fuite)**

##### **Lésions**

0 : absence de lésions

1 : absence d'épiderme visible sur une surface inférieure à 1 cm<sup>2</sup>

**2 : lésions manifestées par une absence visible d'épiderme sur une surface supérieure à 1 cm<sup>2</sup>**

##### **Exophtalmie**

0 : absence d'exophtalmie

1 : exophtalmie légère bilatérale ou forte exophtalmie unilatérale

**2 : exophtalmie sévère et bilatérale**

**Si un animal atteint le score de 2 : atteinte d'un point limite**

- Sortir l'animal de son bac
- Identifier le poisson (numéro de puce)
- Anesthésie du poisson
- Prise de sang (0,3 mL) – tube hépariné
- Euthanasie du poisson
- Mise au congélateur dans un sac individuel
- Noter sur la fiche de prélèvements les signes cliniques justifiant l'euthanasie (avec la date)

Annexe 5 : Essais hématologiques sur 9 poissons en amont de l'étude

Date	Identification	GR	GR	HGB	HGB	Ht	Ht	VGM	VGM	TCMH	TCMH	CCMH	CCMH	PLT	WBC
		10 <sup>6</sup> /µL	manuel 10 <sup>6</sup> /µL	g/L	manuel g/L	%	manuel %	fl	manuel fl	pg	manuel pg	manuel %	%	10 <sup>3</sup> /µL	10 <sup>3</sup> /µL
30/10/2023	P9	0,66	0,9	58	66	26	38	400	352,0	61,1	77,3	15,3	22,0	2	30,8
	P9	0,68		62		394		357,3	64,3	82,7	16,3	23,1	1	33,8	
	P9	0,67		63		397		354,7	65,8	84,0	16,6	23,7	2	30,5	
	P9	0,67		64		400		352,6	67,4	84,2	16,8	23,9	2	29,8	
	P9	0,67		62		388		351,4	63,3	83,8	16,3	23,8	2	29,2	
	P9	0,67		62		399		356,0	65,0	82,7	16,3	23,2	2	30,5	
	P9	0,67		62		403		355,3	65,8	81,6	16,3	23,0	2	30,5	
	P9	0,67		61		394		356,8	63,3	82,4	16,1	23,1	2	30,0	
	P9	0,67		58		394		356,8	60,1	78,4	15,3	22,0	1	31,3	
30/10/2023	P9	0,66		61		26		394	356,2	63,2	83,6	16,1	23,5	2	30,7
	P1	0,79	-	70	74	30	41	385	366,3	65,7	84,3	17,1	23,0	7	17,2
	P2	0,76	-	71	83	30	43	391	353,6	64,5	84,5	16,5	23,9	1	16,7
	P3	0,73	-	60	63	25	36	340	339,7	56,6	82,2	16,7	24,2	10	18,1
	P4	0,81	-	65	67	32	40	396	377,6	64,4	76,5	16,3	20,2	3	23,3
	P5	0,67	-	56	63	25	33	369	338,4	62,6	76,7	17,0	22,7	3	7,7
	P6	0,71	-	66	64	26	43	365	354,8	56,0	90,4	15,3	25,5	6	12,5
	P7	0,66	-	56	60	26	35	388	345,9	62,1	75,7	16,0	21,9	5	19,8
P8	0,78	-	70	75	31	46	396	372,3	60,3	84,3	15,2	22,7	4	16,1	

*Annexe 6 : Moyenne des variables hématologiques obtenues sur l'ensemble des prélèvements à J0T0h*

Variable hématologique	Unité	Moyenne
Numération globulaire	$10^6/\mu\text{L}$	$0,73 \pm 0,05$
Taux d'hémoglobine	g/L	$64,39 \pm 4,47$
Hématocrite	%	$38,23 \pm 3,45$
VGM	fL	$525,14 \pm 37,88$
CCMH	%	$16,98 \pm 1,37$
TCMH	pg	$88,52 \pm 4,23$
Numération leucocytaire	$10^3/\mu\text{L}$	$13,54 \pm 3,94$

*Annexe 7 : Poissons exclus de l'analyse statistiques selon les anomalies cliniques, zootechniques et biologiques*

Groupe	Poisson	Cause de l'exclusion
C	B13P1	euthanasié à J15, valeurs de Hb, GR et Ht très inférieures au reste du bac
C	B13P3	absence de prise de poids, courbes de Hb, GR et Ht plus basses que le reste du bac
C	B13P5	mélanique intégralement, courbes de Hb, GR et Ht plus basses que le reste du bac
E	B15P2	euthanasié à J12, courbes de Hb, GR et Ht plus élevées que le reste du bac
E	B15P7	euthanasié à J28, valeurs de Hb, GR et Ht chutent
A	B17P4	uniquement pour la numération globulaire, valeur aberrante à J28
F	B19P7	absence de valeurs à J0 (caillot), impossible d'analyser par index
F	B19P8	absence de valeurs à J0 (caillot), impossible d'analyser par index
B	B20P2	absence de prise de poids (poisson dominé), courbe de GR plus basse que le reste du bac
F	B21P5	absence de prise de poids (poisson dominé), valeurs de Hb, GR et Ht chutent
F	B21P7	absence de prise de poids (poisson dominé), valeurs de Hb, GR et Ht chutent
D	B22P8	le plus lourd du bac (poisson dominant), courbes de Hb, GR et Ht plus élevées que le reste du bac
A	B23P6	absence de prise de poids (poisson dominé), courbes de Hb, GR et Ht plus basses que le reste du bac
E	B24P2	absence de prise de poids (poisson dominé), courbes de Hb et GR plus basses que le reste du bac

Annexe 8 : Dictionnaire des données utilisées dans le logiciel R

Variable	Signification	Code pour R	Type	Unité / Modalité	Remarque
Bac	Numéro du bac dans lequel se situe le poisson	Bac	Texte	B11-B24	
Poisson	Identification du poisson selon son bac et son numéro	Poisson	Texte	B13-B24 P1-P9 BXPX pour chaque poisson	
Groupe	Lot auquel appartient le poisson indiquant quelle modalité il a subi à J0	Groupe	Texte	A, B, C, D, E, F	
Numéro de Transpondeur	4 derniers chiffres du numéro de transpondeur du poisson	Transpo	Qualitatif nominal	4 chiffres	
Nombre de jours après le début de la manipulation	Nombre de jours depuis le prélèvement principal (18/03)	Jours	Quantitatif discontinu	1-84	

Jours après le début de la manipulation en 8 classes	Définition de la variable « Jour » en variable qualitative de 8 classes	C8Jour	Qualitatif (8 classes)	0, 1, 15, 28, 42, 56, 70, 84	
Ht	Valeur d'hématocrite mesurée manuellement	Ht_TX Ht_JX	Quantitatif	%	TX si J0 et prélèvement répété  JX à partir de J1
RBC	Numération globulaire	RBC_TX RBC_JX	Quantitatif	10 <sup>6</sup> /uL	TX si J0  JX à partir de J1
HGB	Hémoglobine	HGB_TX HGB_JX	Quantitatif	g/L	TX si J0  JX à partir de J1
VGM	Volume globulaire moyen (Htx10)/RBC	VGM_TX VGM_JX	Quantitatif	fL	TX si J0  JX à partir de J1
TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine  Hb/RBC	TCMH_TX TCMH_JX	Quantitatif	pg	TX si J0  JX à partir de J1
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine  (Hbx10)/Ht	CCMH_TX CCMH_JX	Quantitatif	%	TX si J0  JX à partir de J1

WBC	Numération leucocytaire	WBC_TX WBC_JX	Quantitatif	10 <sup>3</sup> /uL	TX si J0 JX à partir de J1
Date de chaque prélèvement	Date à laquelle la prise de sang est effectuée avec X correspondant au jour post prélèvement initial à J0	PDSJX	Date	Jour/Mois /Année	
Poids à JX	Poids du poisson au prélèvement effectué à JX	Poids_JX	Quantitatif	g	
Volume total à prélever	Volume total à prélever en une fois ou en plusieurs fois, selon le groupe et le poids du poisson à JX	Vtot_JX	Quantitatif	mL	
Volume à prélever T0	Selon la modalité, correspond au volume total à prélever ou au volume total à prélever divisé par trois à J0	VTX	Quantitatif	mL	X correspond aux heures de prélèvement (0h, 2h, 6h)
Volume prélevé	Volume effectivement prélevé à JX	Vprélevé_TX Vprélevé_JX	Quantitatif	mL	TX si J0 JX à partir de J1

Saignement	Saignement du poisson à la suite du prélèvement, établi selon un scoring de 0,1,2 à chaque prélèvement	S_TX S_JX	Qualitatif ternaire	0,1,2 avec 0 = absence de saignement 2=quantité importante de sang	TX si J0 JX à partir de J1
Ecart du volume prélevé par rapport à ce qui était prévu	Différence entre le volume effectivement prélevé et le volume à prélever, surtout important pour les prélèvements initiaux	DeltaV_TX DeltaV_JX	Quantitatif	mL	TX si J0 JX à partir de J1
Prise de poids entre deux prélèvements de contrôle	Gain de poids entre JX et J(X-14)	d_poids_JX pour la variation de poids entre JX et JX-14	Quantitatif	g	
Prise de poids total	Gain de poids entre la dernière pesée et J0	d_poids_tot	Quantitatif	g	
Index de l'hématocrite	Pourcentage de l'hématocrite de J0 obtenu à JX	HtX_Ht0 (non paramétrique) HtJ0_Ht (survie) Ht_IDX (Imer)	Quantitatif	%	Modification du nom des variables dû au changement de base de données

Index de l'hématocrite normalisé par rapport au groupe A	Rapport de l'index de l'hématocrite et de l'index moyen du groupe A à JX	HtX_Ht0_A (non paramétrique)  Ht_IDX_A (Imer)	Quantitatif	0 - 1,5	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Index du taux d'hémoglobine	Pourcentage du taux d'hémoglobine de J0 obtenu à JX	HbX_Hb0 (non paramétrique)  HGBJ0_HGB (survie)  HGB_IDX (Imer)	Quantitatif	%	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Index du taux d'hémoglobine normalisé par rapport au groupe A	Rapport de l'index du taux d'hémoglobine et de l'index moyen du groupe A à JX	HbX_Hb0_A (non paramétrique)  HGB_IDX_A (Imer)	Quantitatif	0 - 1,5	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Index de la numération globulaire	Pourcentage de la quantité de globules rouges de J0 obtenu à JX	GRX_GRO  RBCJ0_RBC (survie)  RBC_IDX (Imer)	Quantitatif	%	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Index de la numération globulaire normalisé par rapport au groupe A	Rapport de l'index de la numération globulaire et de l'index moyen du groupe A à JX	GRX_GRO_A (non paramétrique)  RBC_IDX_A (Imer)	Quantitatif	0 - 1,5	Modification du nom des variables dû au changement de base de données

Index du VGM	Pourcentage du VGM de J0 obtenu à JX	VGMX_VGM0 (non paramétrique)  VGM_IDX (Imer)	Quantitatif	%	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Index de la CCMH	Pourcentage de la CCMH de J0 obtenu à JX	CCMHX_CCMH0 (non paramétrique)  CCMH_IDX (Imer)	Quantitatif	%	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Index de la TCMH	Pourcentage de la TCMH de J0 obtenu à JX	TCMHX_TCMH0 (non paramétrique)  TCMH_IDX (Imer)	Quantitatif	%	Modification du nom des variables dû au changement de base de données
Statut	Récupération ou non de 85 % de la valeur initiale d'une variable chez un poisson donné à chaque temps de prélèvement	Statut	Qualitatif binaire	0 (< 85 %)  ou  1 (> 85 %)	

*Annexe 9 : Tableaux de résultats du poids moyen et de l'écart type associé à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

Poids moyen à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	404,41	447,45	485,14	517,56	567,94	621,63	690,22
B	402,32	448,09	484,68	513,67	557,51	607,44	669,31
C	407,57	447,59	487,61	525,32	576,32	625,34	683,16
D	399,02	434,70	468,91	504,14	548,46	480,46	697,47
E	402,35	432,38	473,56	514,57	556,66	603,00	657,32
F	390,23	434,89	455,68	483,54	546,89	596,44	663,49

Ecart-type du poids à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	23,33	28,27	36,32	42,53	56,09	65,55	77,35
B	26,51	27,57	32,19	35,89	42,42	49,12	62,25
C	21,86	22,71	38,01	44,36	48,24	53,62	64,43
D	22,63	24,93	33,17	32,92	44,27	221,75	52,91
E	20,44	25,41	33,27	39,05	52,67	68,38	84,85
F	35,41	40,39	51,41	66,61	66,77	76,72	77,23

*Annexe 10 : Tableaux de résultats du gain de poids moyen et de l'écart type associé à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

Gain de poids moyen à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	45,56	37,69	32,42	44,13	73,00	62,36
B	45,77	36,59	28,99	43,83	68,87	58,12
C	41,88	40,85	37,71	46,47	70,58	72,85
D	38,36	34,21	28,05	44,32	35,37	60,40
E	30,03	37,42	37,16	42,09	86,57	43,88
F	41,26	33,06	27,85	41,46	93,60	52,70

Ecart-type du gain de poids à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	14,98	13,12	14,13	27,89	76,19	27,02
B	10,22	10,57	12,62	16,54	62,71	13,49
C	10,46	23,54	11,22	13,32	81,95	28,74
D	20,04	17,26	9,79	22,10	90,57	22,88
E	28,13	18,67	13,36	21,96	126,51	26,14
F	10,02	23,19	32,22	13,23	117,87	28,74

*Annexe 11 : Tableaux de résultats du taux d'hémoglobine et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

Taux d'hémoglobine moyen sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	100,00			96,95	89,60	87,85	86,23	96,92	97,56	95,90
B	100,00			79,47	84,69	81,36	86,49	91,78	96,94	94,93
C	100,00			84,61	87,89	84,83	82,89	95,43	100,17	103,86
D	100,00	99,11	95,22	92,39	80,12	75,62	78,86	87,71	86,03	93,29
E	100,00	95,11	95,57	80,98	82,78	80,87	77,81	85,43	88,58	91,02
F	100,00	93,50	86,80	76,01	78,39	75,16	82,76	84,23	90,66	88,68

Ecart type du taux d'hémoglobine sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00			9,52	8,98	6,90	10,40	10,99	12,65	9,40
B	0,00			12,34	10,48	12,11	12,76	12,76	14,12	13,06
C	0,00			13,51	11,02	11,02	11,13	11,13	12,00	10,49
D	0,00	6,84	7,73	10,14	7,81	10,29	13,17	13,17	17,55	19,74
E	0,00	5,14	4,50	9,35	8,09	11,21	11,05	11,06	11,00	11,33
F	0,00	5,14	5,57	12,23	8,48	5,10	15,53	9,83	10,78	11,58

Taux d'hémoglobine moyen sous forme de rapport de l'index de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
B	1,00	0,82	0,95	0,93	1,00	0,95	0,99	0,99
C	1,00	0,87	0,98	0,97	0,96	0,98	1,03	1,08
D	1,00	0,95	0,89	0,86	0,91	0,91	0,88	0,97
E	1,00	0,84	0,92	0,92	0,90	0,88	0,91	0,95
F	1,00	0,78	0,87	0,86	0,96	0,87	0,93	0,92

Écart type du taux d'hémoglobine sous forme de rapport de l'index de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00	0,10	0,10	0,08	0,12	0,11	0,13	0,10
B	0,00	0,13	0,12	0,14	0,16	0,13	0,14	0,14
C	0,00	0,14	0,12	0,13	0,15	0,11	0,12	0,11
D	0,00	0,10	0,09	0,12	0,15	0,14	0,18	0,21
E	0,00	0,10	0,09	0,13	0,13	0,13	0,11	0,12
F	0,00	0,13	0,09	0,06	0,18	0,18	0,11	0,12

*Annexe 12 : Tableaux de résultats de la numération globulaire et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

Numération globulaire moyenne sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	100,00			94,82	89,70	93,00	89,61	103,09	104,38	102,81
B	100,00			80,90	92,75	87,28	90,41	98,28	105,44	105,11
C	100,00			84,33	91,85	90,25	87,16	100,30	104,75	109,95
D	100,00	99,36	94,32	93,66	86,89	85,79	85,30	96,86	101,89	102,20
E	100,00	97,45	97,11	83,98	90,10	88,72	85,85	96,56	101,79	103,95
F	100,00	94,43	86,07	77,15	85,64	86,09	88,49	95,02	101,31	101,46

Écart type de la numération globulaire sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00			9,28	7,70	6,36	7,93	9,95	10,05	7,30
B	0,00			11,13	11,31	12,43	12,54	11,26	13,93	14,21
C	0,00			10,48	9,92	8,10	11,48	9,15	7,81	9,58
D	0,00	5,71	7,16	11,06	8,38	10,36	10,69	12,54	21,18	17,62
E	0,00	4,50	5,21	8,26	4,41	8,38	7,83	9,95	10,42	8,27
F	0,00	5,39	5,88	11,30	6,12	6,80	10,37	4,57	7,12	8,72

Numération globulaire moyenne sous forme de rapport de l'index de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
B	1,00	0,85	1,03	0,94	1,00	0,95	1,00	1,02
C	1,00	0,89	1,02	0,97	0,97	0,97	1,00	1,07
D	1,00	0,99	0,97	0,92	0,95	0,94	0,98	0,99
E	1,00	0,89	1,00	0,95	0,96	0,94	0,98	1,01
F	1,00	0,81	0,95	0,93	0,99	0,92	0,97	0,99

Écart type de la numération globulaire sous forme de rapport de l'index de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00	0,09	0,08	0,07	0,09	0,10	0,10	0,07
B	0,00	0,12	0,13	0,13	0,14	0,11	0,13	0,14
C	0,00	0,11	0,11	0,09	0,13	0,09	0,07	0,09
D	0,00	0,12	0,09	0,11	0,12	0,12	0,20	0,17
E	0,00	0,09	0,05	0,09	0,09	0,10	0,10	0,08
F	0,00	0,12	0,07	0,07	0,12	0,04	0,07	0,08

*Annexe 13 : Tableaux de résultats de l'hématocrite et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

Hématocrite moyen sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	100,00			79,24	96,84	86,52	76,43	92,17	100,33	98,58
B	100,00			60,21	79,92	66,33	66,90	75,84	87,43	90,65
C	100,00			60,18	82,28	65,68	67,38	80,38	76,96	99,94
D	100,00	96,44	83,96	70,65	84,47	81,53	70,78	82,87	87,66	92,41
E	100,00	90,78	94,40	63,59	88,80	73,24	73,83	80,84	81,29	86,93
F	100,00	85,71	76,28	56,79	77,92	68,71	68,03	77,32	62,62	83,43

Écart type de l'hématocrite sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00			8,54	8,61	11,93	10,59	12,59	12,74	14,36
B	0,00			9,58	13,67	9,03	11,14	8,77	14,10	11,00
C	0,00			8,17	11,17	8,60	10,63	9,42	9,83	15,91
D	0,00	11,67	11,04	15,47	14,58	17,20	23,46	17,91	31,81	16,89
E	0,00	5,09	7,13	6,63	17,20	9,89	10,72	8,54	9,28	9,10
F	0,00	8,25	4,28	7,68	10,99	12,30	8,26	5,54	24,89	11,00

L'hématocrite moyen sous forme de rapport de l'index de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
B	1,00	0,75	0,83	0,77	0,87	0,81	0,87	0,91
C	1,00	0,77	0,88	0,78	0,90	0,88	0,79	1,06
D	1,00	0,85	0,85	0,91	0,84	0,84	0,79	0,89
E	1,00	0,80	0,91	0,87	0,96	0,86	0,81	0,88
F	1,00	0,71	0,81	0,83	0,91	0,82	0,63	0,84

Écart type de l'hématocrite sous forme de rapport de l'index de chaque groupe par rapport à celui du groupe A à chaque temps de prélèvement

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00	0,10	0,09	0,14	0,13	0,12	0,13	0,15
B	0,00	0,13	0,14	0,11	0,14	0,10	0,14	0,11
C	0,00	0,09	0,10	0,09	0,12	0,08	0,09	0,11
D	0,00	0,12	0,13	0,16	0,17	0,13	0,16	0,12
E	0,00	0,09	0,16	0,07	0,14	0,09	0,10	0,09
F	0,00	0,10	0,11	0,14	0,06	0,06	0,25	0,11

*Annexe 14 : Tableaux de résultats de la numération leucocytaire et des écarts types associés à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

La numération leucocytaire moyenne sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	100,00	78,29	68,96	79,34	87,96	73,39	89,60	94,23
B	100,00	66,90	75,79	71,27	70,95	69,72	79,61	82,41
C	100,00	64,56	62,37	57,85	46,44	60,07	83,85	62,61
D	100,00	39,15	61,29	79,01	71,59	79,12	75,20	71,03
E	100,00	64,78	75,52	66,32	89,62	77,90	93,15	86,97
F	100,00	73,70	93,78	99,78	87,41	89,26	118,39	92,79

Écart type de la numération leucocytaire sous forme d'index à chaque temps de prélèvement selon le groupe

Groupe	J0	J1	J15	J28	J42	J56	J70	J84
A	0,00	23,52	19,06	31,39	26,31	20,6	25,05	29,91
B	0,00	23,66	24,60	23,75	31,68	40,78	29,84	35,32
C	0,00	20,21	13,78	13,89	21,22	28,13	57,87	18,66
D	0,00	17,36	15,25	20,64	21,19	26,27	16,06	20,10
E	0,00	37,96	21,04	25,18	33,07	29,25	35,98	41,90
F	0,00	42,67	35,56	33,21	26,65	39,15	43,67	45,60

*Annexe 15 : Tableaux de résultats des saignements à chaque temps de prélèvement pour chaque groupe*

Part des effectifs par groupe ayant eu un saignement de score 1 à chaque prélèvement

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70
A	2/18			2/18	3/16	4/16	1/16	1/16	3/16
B	1/18			2/18	0/18	3/18	3/18	4/18	1/18
C	3/18			0/18	1/17	3/15	1/15	5/14	4/14
D	2/18	6/18	5/18	3/18	2/14	1/14	2/13	3/13	1/10
E	4/18	5/18	8/18	1/18	3/17	3/17	5/16	3/16	3/16
F	4/18	5/18	7/18	4/18	1/16	3/11	1/11	3/9	0/8

Part des effectifs par groupe ayant eu un saignement de score 2 à chaque prélèvement

Groupe	J0T0h	J0T2h	J0T6h	J1	J15	J28	J42	J56	J70
A	0/18			0/18	2/16	3/16	0/16	0/16	1/16
B	6/18			1/18	1/18	3/18	0/18	2/18	1/18
C	4/18			0/18	1/17	3/15	1/15	2/14	2/14
D	1/18	1/18	0/18	0/18	0/14	4/14	0/13	1/13	1/10
E	1/18	3/18	0/18	0/18	2/17	1/17	0/16	1/16	2/16
F	4/18	2/18	0/18	0/18	2/16	4/11	0/11	0/9	0/8



**GUY Jessica**

**IMPACT DE DIFFÉRENTES PROCÉDURES DE PRÉLÈVEMENTS SANGUINS SUR LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) ET DURÉE DE RÉGÉNÉRATION SANGUINE ASSOCIÉE**

*IMPACT OF DIFFERENT BLOOD SAMPLING PROCEDURES ON RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS) AND THE ASSOCIATED PERIOD FOR BLOOD REGENERATION*

**Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 3 octobre 2024**

## **RÉSUMÉ**

Afin de mieux raffiner les protocoles utilisant des salmonidés en expérimentation animale et de mieux respecter leur bien-être, une meilleure compréhension de l'impact des prélèvements sanguins sur l'homéostasie des animaux était nécessaire. D'après le CCPA, seul 0,1 % du poids vif d'un poisson devrait être prélevé. Cependant, ce volume est souvent insuffisant pour permettre de mesurer l'ensemble des paramètres requis sans euthanasie, et ne permet généralement pas de réaliser des suivis longitudinaux, pourtant les plus à même de réduire le nombre d'animaux utilisés et de mieux déterminer les variabilités inter-individuelles. L'objectif de la présente étude est de caractériser l'impact de prélèvements sanguins de volumes supérieurs à 0,1 % du poids vif chez des truites arc-en-ciel, en prélèvement unique ou répétés, ainsi que le temps au bout duquel ces poissons seraient de nouveau prélevables.

Nous avons montré au sein de cette étude que les volumes prélevés, à savoir 0,1 %, 0,3 % et 0,45 % du poids vif en prélèvement unique et 0,3 %, 0,45 % et 0,6 % du poids vif en prélèvements répétés, sont des ponctions bien tolérées chez les truites arc-en-ciel. La durée de régénération sanguine à la suite de ces prélèvements reste cependant plus difficile à définir, probablement entre 8 et 12 semaines. Les poissons prélevés en une seule prise semblent récupérer plus vite que les poissons prélevés en plusieurs fois. Dans notre étude, l'impact des prélèvements de contrôle de 0,2 mL toutes les deux semaines semble être plus significatif qu'anticipé sur la régénération sanguine.

Du fait des nombreuses difficultés rencontrées au sein de cette étude, telles qu'une forte mortalité due à un champignon opportuniste, qu'une panne de courant à la station aquacole et ses nombreuses conséquences sur l'organisation de l'étude ou qu'une mauvaise calibration de l'héparine dans le matériel de prélèvement, cette étude n'a pas complètement permis de qualifier la vitesse de régénération sanguine et gagnerait à être complétée afin de préciser ces résultats.

## **MOTS CLÉS :**

- TRUITE ARC EN CIEL
- PRÉLÈVEMENT DE SANG
- REGENERATION
- ERYTHROPOIESE
- EXPÉRIMENTATION ANIMALE

**DATE DE SOUTENANCE : 3 octobre 2024**