THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. CYRIL DELFOSSE

le mardi 17 janvier 2017

Titre :

METHODES D'EVALUATION ET DE CONTROLE DU STRESS CHEZ LES SALMONIDES D'ELEVAGE : IMPLICATIONS SANITAIRES, ZOOTECHNIQUES ET ENVIRONNEMENTALES

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Département Sciences Agronomiques et Agroalimentaires (SSA-EIP)

Directeur(s) de Thèse :

M. PATRICK PAGEAT

MME CECILE BIENBOIRE-FROSINI

Rapporteurs :

M. DONALD MAURICE BROOM, UNIVERSITE DE CAMBRIDGE

M. HOWARD BROWMAN, INSTITUTE OF MARINE RESEARCH

Membre(s) du jury :

M. XAVIER MANTECA, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONE, Président

M. ANGELO GAZZANO, UNIVERSITA DI PISA, Membre

Mme CECILE BIENBOIRE-FROSINI, IRSEA, Membre

Mme MAGALI PETER, EI PURPAN, Membre

M. PATRICK PAGEAT, IRSEA, Membre

REMERCIEMENTS

C'est une fierté pour moi d'avoir été l'un des thésards du Pr. Patrick Pageat. En 2011, je suis arrivé à l'IRSEA pour effectuer mon stage de Master 1 traitant de l'effet de la phéromone MHUSA sur la poule pondeuse élevée en cage aménagée. A l'issu de ce stage, le Pr. Patrick Pageat m'a proposé de réitérer l'expérience pour mon stage de Master 2, cette fois-ci sur la gestion du stress chez les salmonidés d'élevage, et de poursuivre avec une thèse. Je le remercie donc sincèrement pour m'avoir donné l'occasion d'effectuer ce travail, pour sa confiance et pour avoir été un si bon directeur de thèse, disponible et à l'écoute. Ce travail n'est que le début d'un long chemin, et je lui suis vraiment reconnaissant de m'en avoir montré le début.

Je veux également remercier Mr Hugues Lucas de Leyssac, directeur financier et co-fondateur de l'IRSEA avec le Pr. Patrick Pageat, et le Dr. Alessandro Cozzi, directeur général, pour m'avoir également accordé leur confiance et pour avoir débloqué les fonds nécessaires au bon déroulement des recherches effectuées durant cette thèse.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Dr. Cécile Bienboire-Frosini, qui fût une excellente co-directrice de thèse, mais aussi une amie. Son professionnalisme, son sens critique, sa capacité d'écoute, sa patience, sa bienveillance et son humour ne sont qu'une infime partie de ses qualités qui m'ont permis d'aboutir à cette thèse.

Je remercie vivement le Pr Donald Broom et le Pr. Howard Browman, les deux rapporteurs de ma thèse, pour avoir accepté de juger mon travail. Ce fût un honneur pour moi d'être évalué par ces deux experts, du bien-être animal pour l'un et du saumon Atlantique pour l'autre. Et je remercie également le Dr. Magali Peter, le Pr. Xavier Manteca et le Pr. Angelo Gazzano, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour vos critiques, et surtout pour votre bienveillance et gentillesse le jour de ma soutenance.

Tusen takk aux membres de Prophylaxia AS© et plus particulièrement Bjørn-Vegard Løvik, Ellen-Marie Sætre et Ivar Gulla, pour leur expertise et leur accueil en Norvège, à l'IRSEA-ARC.

Bien évidemment, je remercie vivement tous les membres de l'IRSEA pour leur aide directe et indirecte. Merci à Héloïse, Johanna, Sandra, Antoine, Piotr, Benjamin, Tiago, Caroline, Miriam, Carlos, Mane, Laetitia, Elisa, Philippe, Julien, Didier et tous les autres !!

Je tiens également à remercier mes parents, qui ont toujours été présents pour me soutenir par tous les moyens dans mes choix de vie et mon orientation scolaire. Je reconnais la chance que j'ai d'avoir des parents qui ont su faire les sacrifices nécessaires à mon épanouissement. Je les aime et je sais qu'ils sont fiers de cet accomplissement. Plus largement, un grand merci à toute ma famille qui, chacun à sa manière, a réussi à me redonner le sourire et la confiance durant les périodes difficiles.

Et enfin un grand merci plein d'amour pour mes amis, qui m'ont toujours soutenu et avec qui je partage beaucoup : Marion, Jeanne, Camille, Eva et Simon. Vous avez toujours été là pour moi (même quand j'étais insupportable !) et je vous suis reconnaissant pour ça !

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS 6

LISTE DES ILLUSTRATIONS 8

AVANT PROPOS 11

PARTIE I : Introduction 14

Chapitre 1 : La truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique 15

1. Biologie des deux espèces d'études 15

1.1. Classification et phylogénie des salmonidés *15*

1.2. Anatomie externe et interne de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique *16*

1.3. Aire de répartition et habitat des deux espèces d'étude *19*

1.4. Cycles de vie *20*

1.5. Physiologie *23*

1.6. Environnement sensoriel *26*

1.7. Ethologie et écologie *33*

2. Elevages 37

2.1. Historique *37*

2.2. Cycles de production *39*

2.3. Statut actuel : espèces captives ou domestiques ? *49*

2.4. Les produits de la salmoniculture *50*

Chapitre 2 : Le stress **52**

1. Définitions et généralités du stress 52

2. Particularités du stress chez les poissons 53

3. Evénements et facteurs inducteurs de stress en élevage 56

3.1. Transports et manipulations *56*

3.2. Vaccinations *57*

3.3. Densité et interactions sociales *58*

3.4. Les facteurs environnementaux *59*

3.5. Maladies et parasites *61*

3.6. L'Abattage *68*

4. Conséquences sur la production 68

OBJECTIFS DE THESE **70**

PARTIE II : Résultats **73**

Chapitre 1 : Stress des salmonidés d'élevage **74**

1. Présentation de l'étude n°1 74
2. Etude n°1 75
3. Conclusion de l'étude n°1 77
4. Présentation de l'étude n°2 77
5. Etude n°2 80
6. Conclusion de l'étude n°2 90

Chapitre 2 : Stress et pathologie des salmonidés d'élevage : le cas du pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis* **91**

1. Présentation de l'étude n°3 92
2. Etude n°3 93
3. Conclusion de l'étude n°3 110
4. Présentation de l'étude n°4 110
5. Etude n°4 : 111
6. Conclusion de l'étude n°4 124
7. Présentation de l'étude n°5 124
8. Etude n°5 : 124
9. Conclusion de l'étude n°5 141

Chapitre 3 : Méthode de contrôle d'un inducteur de stress : lutte contre le pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis* **142**

1. Présentation de l'étude n°6 142
2. Etude n°6 : 143
3. Conclusion de l'étude n°6 146
4. Présentation de l'étude n°7 146
5. Etude n° 7 148
6. Conclusion de l'étude n°7 165

PARTIE III : Discussion générale **166**

Chapitre 1 : Objectifs, stratégie d'organisation du programme de recherche et principaux résultats **167**

Chapitre 2 : Critique méthodologique **171**

Chapitre 3 : Discussion des résultats et mise en perspective avec la littérature **179**

CONCLUSION **186**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **189**

LISTE DES PUBLICATIONS

Journaux à comité de lecture

Delfosse C, Bienboire-Frosini C, Chabaud C, Lafont-Lecuelle C, Cozzi A, Pageat P. 2016. Using physiological and zootechnical profiles to evaluate welfare in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under stressful conditions. *Aquaculture International*, 24(5), 1449-1457.

Delfosse C, Lafont-Lecuelle C, Barthélémy H, Chabaud C, Teruel E, Bienboire-Frosini C, Pageat P. A novel *in vivo* test system for studying the hooking behaviour of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) copepodids on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Soumis pour publication à *Journal of Fish Diseases*, le 05/10/2016.

Delfosse C, Pageat P, Lafont-Lecuelle C, Cozzi A, Bienboire-Frosini C. Handling procedures make Atlantic salmon (*Salmo salar*) more attractive to *Lepeophtheirus salmonis* copepodids. A soumettre pour publication à *Aquaculture*.

Delfosse C, Bienboire-Frosini C, Lafont-Lecuelle C, Asproni P, Chabaud C, Cozzi A, Pageat P. Are chronically stressed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) more attractive to the copepodid of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)? A Soumettre pour publication à *Aquaculture*.

Congrès internationaux avec comité de lecture

Pageat P, Cozzi A, **Delfosse C**, Barthélémy H, Mengoli M, Lafont-Lecuelle C, Alnot M, Saffray D. 2012. Improving animal welfare through appropriate attachment and early life experiences. *2nd Annual Meeting of the European College of Animal Welfare & Behavioural Medicine*, Martigny, Switzerland.

Delfosse C, Chabaud C, Lafont-Lecuelle C, Barthelemy H, Bienboire-Frosini C, Pageat P. 2013. A Multivariate Analysis approach to describe the influence of stress on growth in Rainbow trouts subjected to invasive husbandry maintenance. *3rd Annual Meeting of the European College of Animal Welfare & Behavioural Medicine*, Lisbon, Portugal.

Delfosse C, Chabaud C, Lafont-Lecuelle C, Bienboire-Frosini C, Pageat P. 2014. Physiological Response to Repeated Predation by Piscivorous Birds in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *4th Annual Meeting of the European College of Animal Welfare & Behavioural Medicine*, Apt, France.

Delfosse C, Pageat P. 2014. Evidence of a semiochemical as inhibitor of infesting behavior of *Lepeophtheirus salmonis* copepodits in Atlantic salmon smolts. *2nd IRSEA International Congress*, Apt, France.

Delfosse C, Pageat P. 2014. Evidence of the effect of S.C.A.I.S. (Sealice Copepodits Attachment Inhibiting Semiochemical) on the infesting behavior of *Lepeophtheirus salmonis* copepodits in salmon smolts: preliminary results. *The 10th International Sea Lice Conference*, Portland (Maine), USA.

Pageat P, **Delfosse C**. 2014. Effects of a salmon semiochemical on the infestation by *Lepeophtheirus salmonis* copepodits in salmon smolts: Preliminary results. *The 10th International Sea Lice Conference*, Portland (Maine), USA.

Delfosse C, Lafont-Lecuelle C, Barthélémy H, Chabaud C, Bienboire-Frosini C, Pageat P. 2016. A novel test system for the measurement of atlantic salmon (*Salmo salar*) attractiveness for *Lepeophtheirus salmonis* copepodids. *The 11th International Sea Lice Conferences, Westport*, Ireland.

Delfosse C, Bienboire-Frosini C, Lafont-Lecuelle C, Asproni P, Pageat P. 2016. Stress of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in industrial production: a review of causes, consequences and assessment. *6th Annual Meeting of the European College of Animal Welfare & Behavioural Medicine*, Cascais, Portugal.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

Tableau 1 : Datation des principaux nœuds de la phylogénie des salmonidés basées sur les chronogrammes Bayésien de l'études de Shedko et al. (2012).

Tableau 2 : Nombre de rayon durs et mous des nageoires dorsale et anale de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique.

Tableau 3 : Liste des maladies et parasites recensés en élevage de saumon Atlantique et truite arc-en-ciel.

FIGURES

Figure 1 : Photo d'un fossile d'*Eosalmo driftwoodensis*, le salmonidé le plus ancien connu à ce jour.

Figure 2 : Apparence générale du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel adultes.

Figure 3 : Anatomie interne et externe d'un salmonidé.

Figure 4 : Cycle de vie naturel de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) anadrome.

Figure 5 : Cycle de vie naturel du saumon Atlantique (*Salmo salar*).

Figure 6 : Coupe histologique d'épiderme de trois salmonidés : le saumon Atlantique (SA), la truite arc-en-ciel (TA) et le saumon coho (SC).

Figure 7 : Schéma d'une vue temporale d'un œil de téléostéen.

Figure 8 : Dessin d'une oreille interne de saumon Atlantique.

Figure 9 : Schématisation de la ligne latérale des poissons.

Figure 10 : Schéma d'une vue dorsale du système olfactif d'un téléostéen (A). Schéma de la jonction entre le nerf olfactif et le télencéphale (B). Photo de l'épithélium olfactif composé de lamelles formant une rosette (C).

Figure 11 : Photographie d'une coupe histologique d'une lamelle de la rosette olfactive de saumon Atlantique.

Figure 12 : Production mondiale de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique de 1950 à 2014.

Figure 13 : Photo d'œufs de saumon Atlantique et truite arc-en-ciel.

Figure 14 : Bassin circulaire d'eau douce. a) Bassin circulaire pour l'élevage de *fry* de saumon Atlantique. b) Bassin circulaire pour l'élevage de *parr* de saumon Atlantique.

Figure 15 : Schéma d'un *well-boat*, un bateau spécialisé dans le transport de poisson.

Figure 16 : Ferme d'élevage de saumon Atlantique.

Figure 17 : Schéma d'une cage en filet pour l'élevage du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel.

Figure 18 : Photo d'un *raceways*, système d'élevage utilisé principalement pour l'élevage de la truite arc-en-ciel potamodrome.

Figure 19 : Photo d'un bassin d'élevage de saumon Atlantique en circuit fermé.

Figure 20 : Schéma de localisation des cellules chromaffines et interrénales chez les téléostéens.

Figure 21 : Schéma de l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Interrénal chez les poissons.

Figure 22 : Photographie d'une vaccination par injection intrapéritonéale sur un salmonidé.

Figure 23 : Dessin illustrant les blessures infligées aux poissons attaqués par le héron cendré (en haut) et le grand cormoran (en bas).

Figure 24 : Photographie d'un saumon Atlantique atteint d'Anémie Infectieuse du Saumon.

Figure 25 : Photographie d'un saumon Atlantique atteint de furonculose.

Figure 26 : Photographie d'un saumon Atlantique atteint de Piscirickettsiose.

Figure 27 : Photographie d'un saumon Atlantique présentant une amibiase.

Figure 28 : Photographie de *Lepeophtheirus salmonis* adultes mâles et femelles.

Figure 29 : Photographie d'un smolt de saumon Atlantique infesté par le pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*.

Figure 30 : Photographie de lésions sur un smolt de saumon Atlantique infesté par le pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*.

Figure 31 : Schématisation de l'étude n°1.

Figure 32 : Photographie des tanks expérimentaux utilisés dans l'étude n°2.

Figure 33 : Photographie d'une prise de sang sur une truite arc-en-ciel.

Figure 34 : Schéma représentant le cycle de vie de l'ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*.

Figure 35 : Photographie de la procédure d'altération du système olfactif sur un smolt de saumon Atlantique.

AVANT PROPOS

Le poisson est un aliment consommé par l'Homme depuis des millénaires et ancré dans la tradition culturelle de nombreuses populations. En effet, les qualités nutritionnelles de la viande de poisson en font un aliment reconnu pour ses effets bénéfiques sur la santé. Le poisson est riche en protéines, en acides gras, en vitamines et en minéraux. En parallèle avec l'expansion démographique mondiale, la demande en viande de poisson est de plus en plus importante. Aujourd'hui, la pêche ne peut plus répondre à elle seule à cette demande. Ainsi, la pisciculture s'est développée ces dernières années pour pallier ce problème. Ces 60 dernières années, la part de la production issue de la pisciculture dans la production globale de poisson (pêche et pisciculture) est passée de 1,9% en 1950 à 38,9% en 2014 (FAO 2016a). La production piscicole était de 322 milles tonnes en 1950 et de 50 millions de tonnes en 2014 (FAO 2016a). La production de salmonidés a connu elle aussi une augmentation exponentielle, puisqu'elle est passée de 7 milles tonnes en 1950 à 3,4 millions de tonnes en 2014 (FAO 2016a). Parmi les 18 espèces de salmonidés élevées actuellement, le saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel ont un intérêt économique particulier. En effet, ces deux espèces sont les salmonidés les plus produits, avec 2,3 millions de tonnes pour le saumon Atlantique et 813 milles tonnes pour la truite arc-en-ciel en 2014. De plus, le saumon Atlantique représente la plus haute valeur économique parmi tous les poissons élevés (FAO 2016a). Toutefois, l'élevage récent et exponentiel de ces deux espèces a des conséquences sur leur biologie. D'une part, l'élevage récent de ces deux espèces de salmonidés en font des animaux en début de processus de domestication. D'autre part, la demande importante en salmonidés a conduit à un développement rapide des techniques d'élevage pour augmenter la production, parfois au détriment du bien-être des animaux. Or, depuis plusieurs années, les consommateurs sont de plus en plus sensibles au bien-être des animaux d'élevage, et exigent une viande issue d'animaux élevés dans de bonnes conditions. Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à l'élevage du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel.

En élevage, l'amélioration du bien-être des animaux passe inconditionnellement par l'étude des facteurs de stress inhérents à la production. Il existe de nombreux événements inducteurs de stress dans l'élevage de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique. Notre projet est d'améliorer les connaissances sur ces facteurs de stress. A cet effet, dans un premier temps, nous présenterons un état des connaissances actuelles sur ce sujet avec, au préalable, une description de la biologie des deux espèces étudiées, puis, les causes et conséquences du stress dans leur élevage. Dans un deuxième temps, nous établirons les objectifs de cette thèse et les moyens mis en œuvre pour y parvenir. Nous présenterons alors les résultats de ce travail

à travers sept études expérimentales effectuées durant cette thèse. Puis, en troisième partie de ce travail, les résultats seront discutés, confrontés à la littérature existante et mis en perspective, et nous finirons enfin sur les possibilités d'extension de notre travail.

PARTIE I : Introduction

Chapitre 1 : La truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique

1. Biologie des deux espèces d'études

1.1. Classification et phylogénie des salmonidés

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) et le saumon Atlantique (*Salmo salar*, Linnaeus 1758) sont deux poissons appartenant à l'embranchement *Chordata*, la classe *Actinopterygii*, l'ordre *Salmoniformes*, la famille *Salmonidae* (i.e. salmonidés) et la sous-famille *Salmoninae*.

La datation des principaux nœuds de l'arbre phylogénique des salmonidés est présentée dans le **Tableau 1**. La datation de l'ancêtre commun des salmonidés est estimée approximativement à -52 millions d'années, le fossile de salmonidés le plus ancestral connu à ce jour étant *Eosalmo driftwoodensis* (Wilson and Li 1999) (**Figure 1**).

Tableau 1 : Datation des principaux nœuds de la phylogénie des salmonidés basées sur les chronogrammes Bayésien de l'études de Shedko et al. (2012).

	Datation
Ancêtre commun des *Salmonidae*	- 52 Ma
Ancêtre commun des *Salmoninae*	- 37 Ma
Séparation des genres *Salmo* et *Oncorhynchus*	- 19 Ma
Apparition de *Salmo salar*	- 7 Ma
Apparition d'*Oncorhynchus mykiss*	- 7 Ma

La phylogénie des salmonidés nous indique ici que la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique sont deux espèces très proches avec une séparation des lignées évolutives récente. Ainsi, ces deux espèces présentent de nombreuses similitudes physiologiques et comportementales.

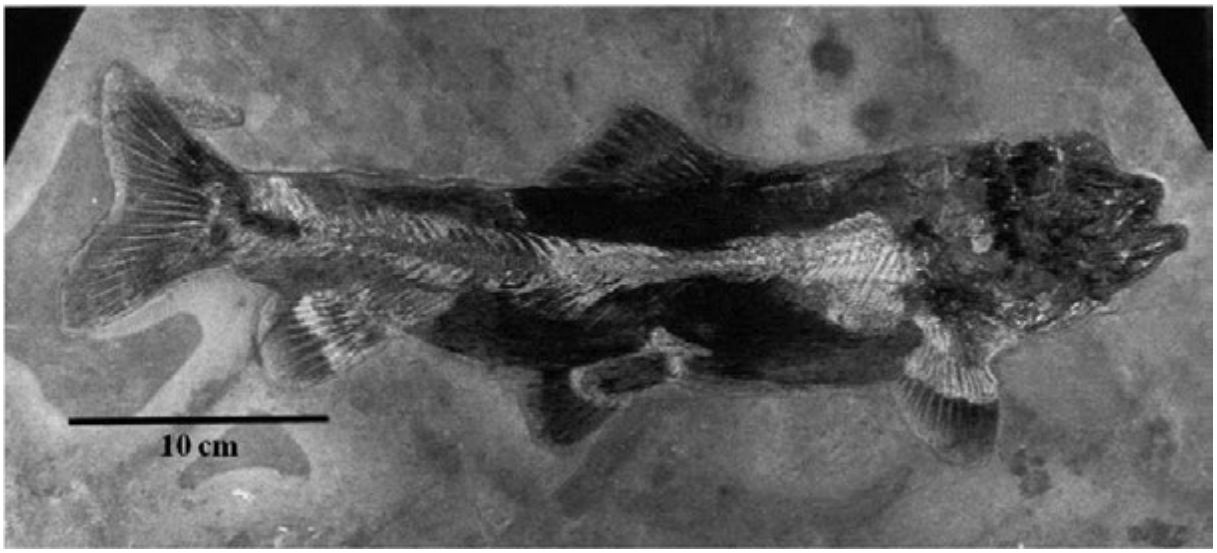

Figure 1 : Photo d'un fossile d'*Eosalmo driftwoodensis*, le salmonidé le plus ancien connu à ce jour. (Crédit photo : Wilson and Li, 1999)

1.2. Anatomie externe et interne de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique

L'apparence générale de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique est présentée dans la **Figure 2**. Les salmonidés ont un corps fusiforme, adapté à la nage en eau rapide. Cette famille se distingue également par la présence d'une nageoire adipeuse sans rayonnement osseux entre la nageoire dorsale et la nageoire caudale (Stewart et al. 2014) (**Figure 3)**. Comme pour la plupart des autres salmonidés, la mâchoire inférieure du saumon et de la truite mâle se courbe à la maturité sexuelle. Cette caractéristique permet au mâle de saisir la femelle lors de la fraie.

La taille maximale du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel est relativement semblable, entre 1,20 m et 1,50 m selon le sexe, pour un poids d'approximativement 23 kg.

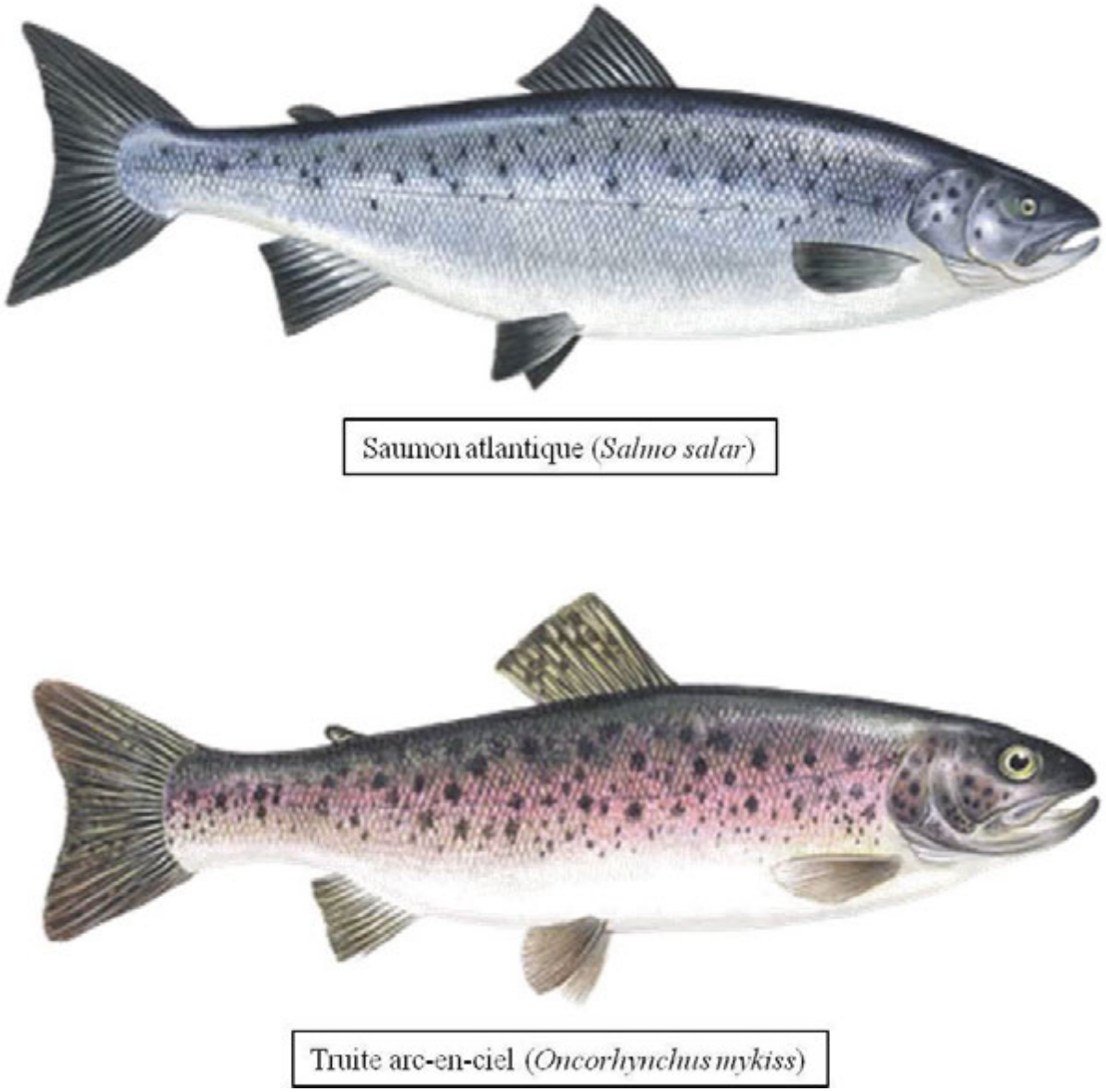

Figure 2 : Apparence générale du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel adultes. (Crédit photo : http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/index_fr.htm)

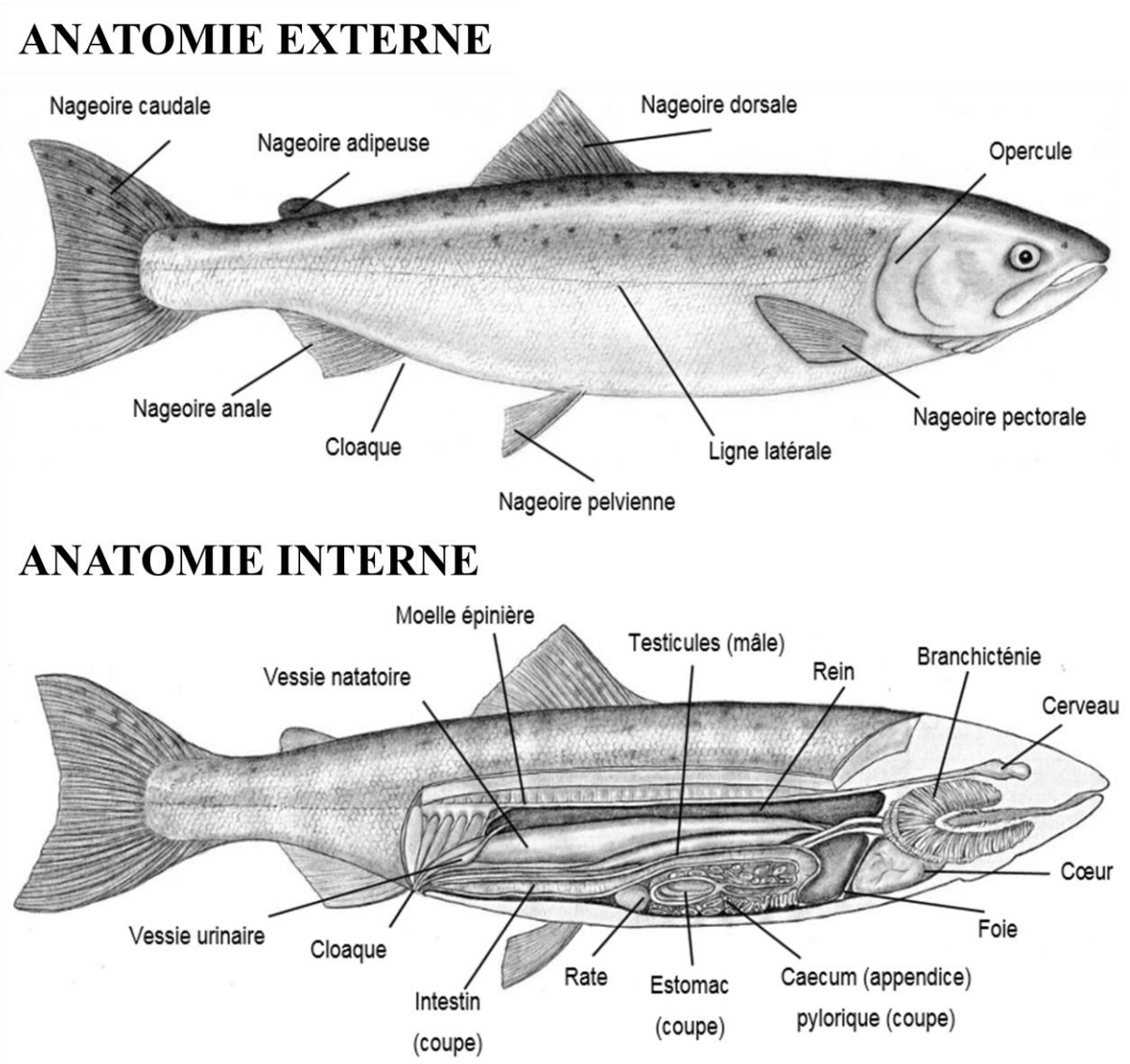

Figure 3 : Anatomie interne et externe d'un salmonidé. (Modifié d'après http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/education/documents/sicprimary-secprimaire/french/sic_primaire_unitebase_3.pdf)

Le nombre de rayons des nageoires permet la distinction de certaines espèces de poisson. Ce nombre s'inscrit selon un code universel indiquant le nombre d'épines dures en chiffres romains et le nombre de rayons mous en chiffres arabes. Ce nombre peut légèrement varier au sein d'une même espèce, d'un individu à un autre, selon l'âge et l'habitat du poisson. Les « codes nageoires » de la caudale et de l'anale de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique sont présentés dans le **Tableau 2**. Le critère principal utilisé dans les clés de détermination permettant de différencier les deux espèces est le nombre de rayons mous de la nageoire anale.

Tableau 2 : Nombre de rayons durs et mous des nageoires dorsales et anales de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique.

Nageoire	Truite arc-en-ciel	Saumon Atlantique
Dorsale	III-IV/10-12	III-IV/9-12
Anale	III-IV/8-12	III-IV/7-9

La coloration de la truite arc-en-ciel se compose d'une bande sombre de bleue à vert-olive sur le dos, d'une bande rose le long de la ligne latérale, et d'une bande argentée sur la face ventrale. Tout le corps, sauf la face ventrale, est recouvert de taches noires (**Figure 2**). Chez le saumon Atlantique, la coloration se décompose également en 3 bandes : une bande de noire-brune à verte-bleue sur le dos, une bande argentée sur les flancs et le ventre blanc. Toute la partie au-dessus de la ligne latérale présente des tâches noires en forme de croix (**Figure 2**).

D'autres critères permettent de distinguer la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique comme le pédoncule de la nageoire caudale qui est plus étroit chez le saumon. La bouche est également plus petite chez le saumon avec la commissure à l'aplomb des yeux.

L'anatomie interne ne diffère que très peu entre le saumon et la truite, et de manière générale entre les salmonidés (**Figure 3**). Le nombre de vertèbres est un exemple de différence entre la truite (60 à 66) et le saumon (59 à 60).

1.3. Aire de répartition et habitat des deux espèces d'étude

L'aire de répartition originelle de la truite arc-en-ciel s'étend sur le côté ouest de l'Amérique du Nord, de l'Alaska jusqu'au Mexique (FAO 2016b). Celle du saumon atlantique recouvre toute la partie nord de l'océan Atlantique, de la Pennsylvanie au Labrador du côté du continent américain, et du Portugal à la Russie du côté du continent européen (MacCrimmon and Gots 1979; FAO 2016c).

La truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique sont deux poissons diadromes anadromes, c'est-à-dire qu'une partie de leur cycle de vie se déroule en eau douce et une autre en milieu marin, la reproduction s'effectuant en rivière et la phase principale de croissance en mer.

Toutefois, il existe chez les deux espèces des souches dites potamodromes, c'est-à-dire que le cycle de vie s'effectue uniquement en eau douce. En effet, plusieurs populations naturelles de truites arc-en-ciel potamodromes ont été répertoriées. La migration s'effectue alors entre la rivière et un lac. Quelques populations potamodromes de saumons Atlantique, constituées lors de la dernière glaciation, ont également été identifiées dans les pays Scandinaves et au Canada (FAO 2016b; FAO 2016c).

1.4. Cycles de vie

La période de reproduction de la truite arc-en-ciel s'étale en hiver-printemps (**Figure 4**), tandis que chez le saumon Atlantique (**Figure 5**), elle intervient en automne-hiver. La femelle sexuellement mature creuse un nid dans le lit de la rivière (Esteve 2005). L'emplacement est choisi en fonction de la qualité de l'eau et du substrat. Les zones de fraie sont situées dans les radiers en amont des bassins versants. La truite arc-en-ciel préfère un gravier grossier, tandis que la femelle saumon établit son nid dans des galets de plusieurs centimètres. Une fois les œufs pondus dans ce nid, le mâle vient les recouvrir de sa laitance pour les féconder. Le nid est refermé par le mâle ou la femelle en recouvrant les œufs de gravier (Esteve 2005). Epuisés par la migration puis le frai, les géniteurs meurent après la reproduction. Chez le saumon, un faible pourcentage de géniteurs parvient à regagner l'océan, on les appelle alors « kelt » (IFREMER 2006; Verspoor et al. 2006; FAO 2016b; FAO 2016c). Ces kelts sont alors capable de refaire une fraie après s'être rengraissé en mer durant une ou deux années.

Quelques jours plus tard (350°j pour la truite-arc-en-ciel et 500°j pour le saumon Atlantique), les œufs éclosent. Les alevins sont pourvus d'un sac vitellin contenant les réserves nécessaires pour assurer le développement jusqu'à la résorption totale, 120°j pour la truite arc-en-ciel et 300°j pour le saumon, après éclosion. Durant toute cette période, l'alevin incapable de nager correctement mais simplement de frétiller, reste principalement dans le nid au milieu des galets (IFREMER 2006; Verspoor et al. 2006; FAO 2016b; FAO 2016c).

Une fois le sac vitellin résorbé, l'alevin devient alors un fretin (appelé *fry* pour le saumon Atlantique). Le jeune poisson qui mesure alors près de 2 cm, possède un système digestif fonctionnel et commence donc à se nourrir. Le fretin (ou *fry*) est alors attiré par la lumière, sort du nid (émergence) et commence à nager à la surface de l'eau pour chasser sa nourriture (IFREMER 2006; Verspoor et al. 2006; FAO 2016b; FAO 2016c). Les juvéniles se

nourrissent principalement de petits arthropodes (insectes et crustacés d'eau douce), de mollusques, de petits poissons et d'œufs de poisson.

Le fretin en croissance devient alors *parr* (appelé aussi tacon). Le poisson mesure entre 5 et 10 cm et poursuit sa croissance dans la rivière natale. La période passée en eau douce peut durer entre 2 et 5 ans suivant la vitesse de croissance des juvéniles, de la disponibilité en nourriture, de la température de l'eau et d'autres facteurs. Commence ensuite la descente de la rivière et le développement des *parr* en *fingerlings* (pour la truite) ou smolts (pour le saumon). Lors de la smoltification, de nombreux changements physiologiques se mettent en place pour permettre au poisson de passer de l'eau douce à l'eau salée. Au niveau de l'estuaire, le poisson est confronté à un gradient de salinité croissant, lui permettant d'accomplir sa smoltification de manière progressive. Que ce soit pour la truite arc-en-ciel ou le saumon atlantique, la smoltification s'effectue quand le poisson pèse environ 40 g (IFREMER 2006; Verspoor et al. 2006; FAO 2016b; FAO 2016c).

Une fois la rivière descendue, les poissons migrent alors dans des eaux plus profondes vers les pôles pour se nourrir du zooplancton et de petits poissons. La période de croissance en mer peut durer entre 2 et 5 ans. Les salmonidés deviennent alors sexuellement matures et commencent la migration vers les rivières. Toute la particularité du cycle de vie de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique réside dans le fait que ces poissons sont capables de reconnaitre leur rivière natale, après leur séjour en mer, pour s'y reproduire. Pendant toute la migration entre l'estuaire et le lieu de frai, les géniteurs arrêtent de se nourrir (IFREMER 2006; Verspoor et al. 2006; FAO 2016b; FAO 2016c).

Ce phénomène de retour à la rivière natale pour se reproduire est décrit dans la littérature scientifique sous le nom d'*imprinting*/*homing*. En effet, ce phénomène est décrit dès le 19ème siècle et c'est dans les années 1950 que le rôle de l'olfaction est démontré dans la réalisation de ce comportement (Hasler and Wisby 1951). Ainsi, les salmonidés sont capables de mémoriser l'odeur de la rivière à la descente de celle-ci lors de la smoltification (*imprinting*), puis reconnaitre et remonter le cours d'eau quelques années plus tard pour la reproduction (*homing*) (Leggett 1977; Hasler et al. 1978; Courtenay et al. 1997; Courtenay et al. 2001).

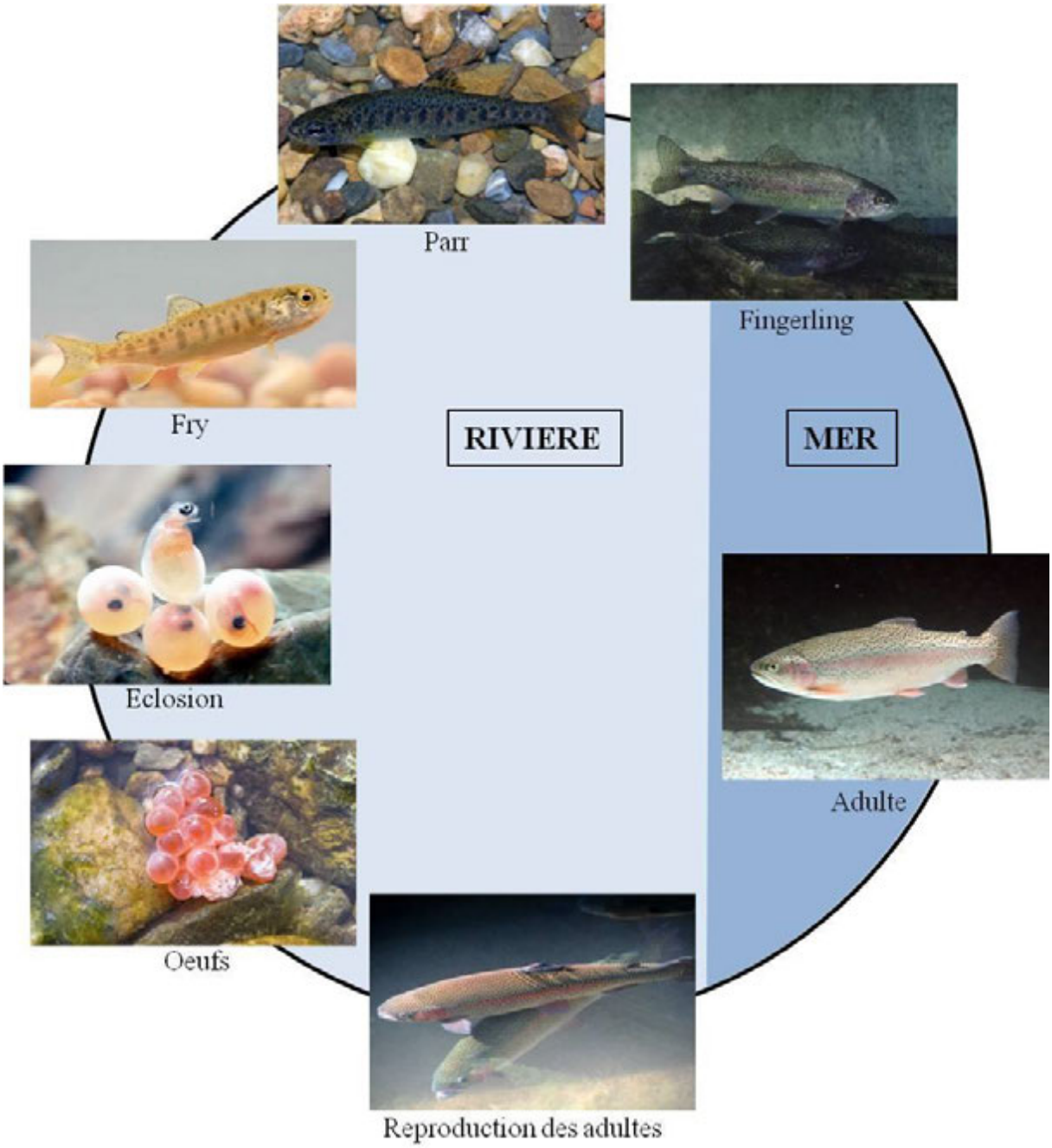

Figure 4 : Cycle de vie naturel de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) anadrome.

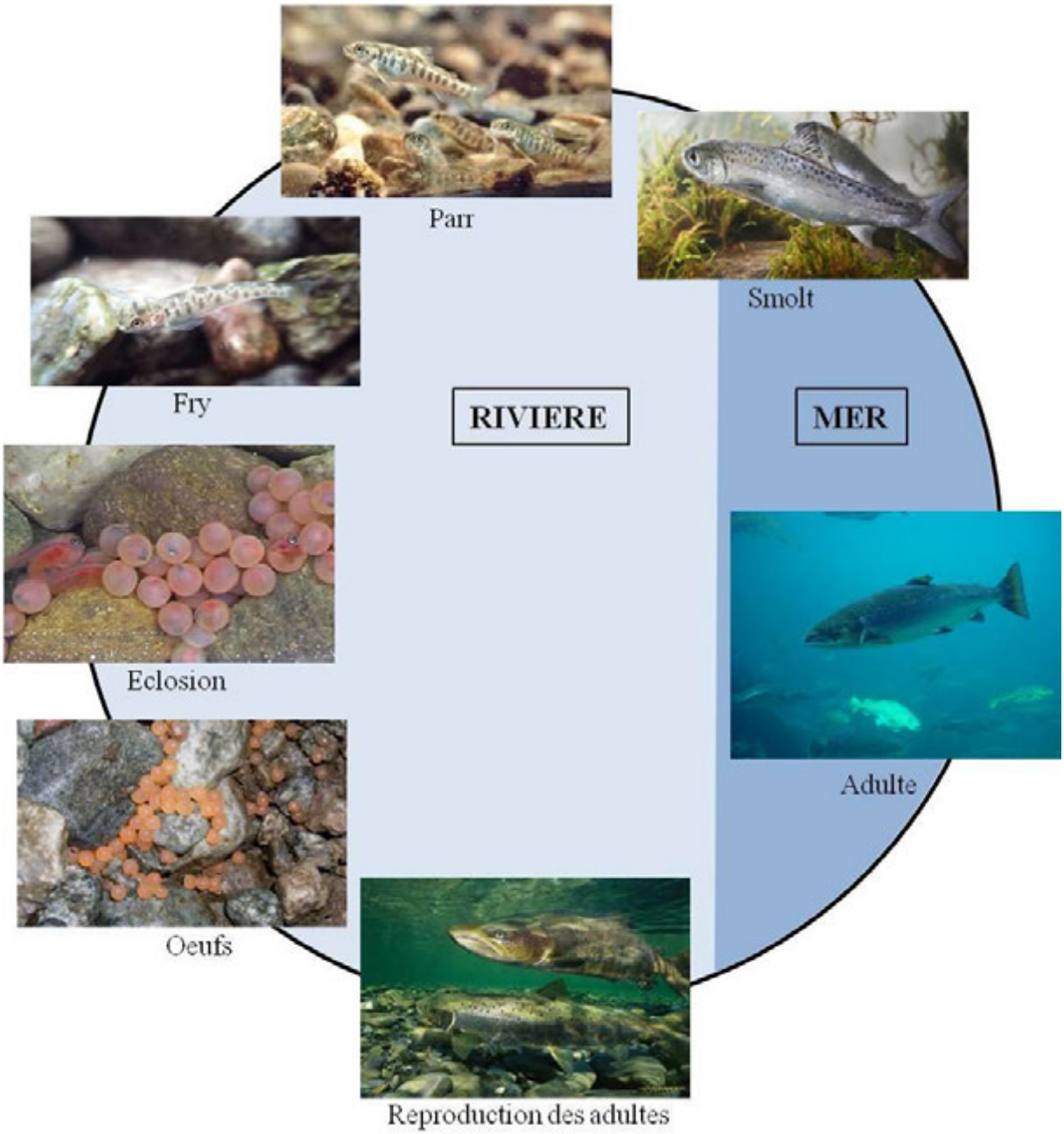

Figure 5 : Cycle de vie naturel du saumon Atlantique (*Salmo salar*).

1.5. Physiologie

Les poissons sont des animaux poïkilothermes et sont donc dépendant de la température de l'eau. La truite arc-en-ciel peut vivre dans des eaux entre 0 et 25 °C, avec une température optimum entre 10 et 20 °C (Javaid and Anderson 1967; Bidgood and Berst 1969). Le saumon Atlantique supporte des températures d'eau comprises entre 0 et 28°C, avec une température idéale entre 5 et 20 °C (Javaid and Anderson 1967; Garside 1973). Les poissons vivant en

dehors de ces températures optimales sont donc capables de survivre, mais au dépend de certaines fonctions physiologiques vitales, comme la reproduction et la croissance.

La température va notamment influer la quantité de dioxygène dissout dans l'eau. Ainsi, plus l'eau est chaude, plus le taux de dioxygène dissout est bas. La respiration des poissons s'effectue grâce au courant d'eau de la bouche aux opercules en traversant les branchies. Les gaz impliqués dans la respiration (O_2 et CO_2) sont alors échangés entre l'eau et le sang par diffusion passive à travers le tégument branchial. La diffusion passive des gaz à travers le tégument s'effectue grâce à la constante différence en pression partielle des gaz O_2 et CO_2 entre l'eau et le sang : la pression partielle en O_2 est plus élevée dans l'eau que dans le sang, induisant ainsi la diffusion passive de l'oxygène de l'eau vers le sang pour rétablir l'équilibre osmotique entre les deux milieux. Le principe est le même concernant le CO_2 avec une pression partielle en CO_2 plus élevée dans le sang que dans l'eau. Si la température influe la pression partielle en oxygène, la salinité de l'eau également. Ainsi, la solubilité de l'oxygène dans l'eau de mer est 20% inférieure à sa solubilité dans l'eau douce. D'autres mécanismes permettent alors une meilleure diffusion de l'oxygène comme le sens de la circulation sanguine inverse à celle de l'eau.

L'osmorégulation est l'ensemble des processus permettant de maintenir l'osmolarité (i.e. homéostasie), c'est-à-dire la concentration en sels dissout dans les fluides internes de l'organisme. Ces principaux « sels » sont les ions Na^+, Cl^- et K^+. La concentration de ces ions est régulée grâce à l'action des cellules à chlorure. Grâce à l'enzyme Na^+/K^+ ATPase, les cellules à chlorure absorbent ou excrètent les ions Na^+ et Cl^-. Chez les salmonidés, ces cellules à chlorure sont surtout abondantes à la base des branchies. En milieu dulçaquicole, l'organisme doit accumuler les sels pour maintenir l'osmolarité, alors qu'en milieu marins les sels doivent être excrétés. Ainsi, les poissons en milieu marin compensent la perte d'eau associée au maintien de l'osmolarité en buvant.

La peau des salmonidés se divise en plusieurs couches : le derme, l'épiderme et les écailles (**Figure 6**). Dans le derme, les chromatophores sont des cellules pigmentées responsables de la couleur de la peau du poisson. Les pigments contenus dans les chromatophores peuvent plus ou moins s'agréger, et ainsi changer la couleur générale de la peau. Les écailles de salmonidés sont de type élasmoïde cycloïde, elles sont donc fines, transparentes, aux bords arrondis et composées d'une couche basale d'os lamellaire surmontée d'une couche d'os spongieux. L'épiderme est composé de l'épithélium dans lequel

s'insèrent des cellules à mucus et des cellules à substance d'alarme. Les cellules à mucus sécrètent le mucus qui recouvre toute la surface du corps du poisson. Les cellules à substance d'alarme permettent la sécrétion de molécules ayant un rôle de signal d'alarme pour les congénères (voir 1.6. Environnement sensoriel).

La peau et le mucus ont également un rôle important dans le maintien de l'osmolarité du poisson en bloquant les échanges d'eau (pénétration de l'eau en eau douce ou déshydratation en eau de mer) (Shephard 1981; Shephard 1994). Le mucus est très visqueux et permet ainsi de bloquer plusieurs éléments comme des petites particules pouvant irriter la peau, les parasites, les bactéries (Benhamed et al. 2014), les métaux lourds et les sels. Le mucus et la peau sont donc à la fois des régulateurs de l'osmolarité, des barrières immunitaires, des transporteurs de signaux, et des protections contre les abrasions et les éléments toxiques (Shephard 1994).

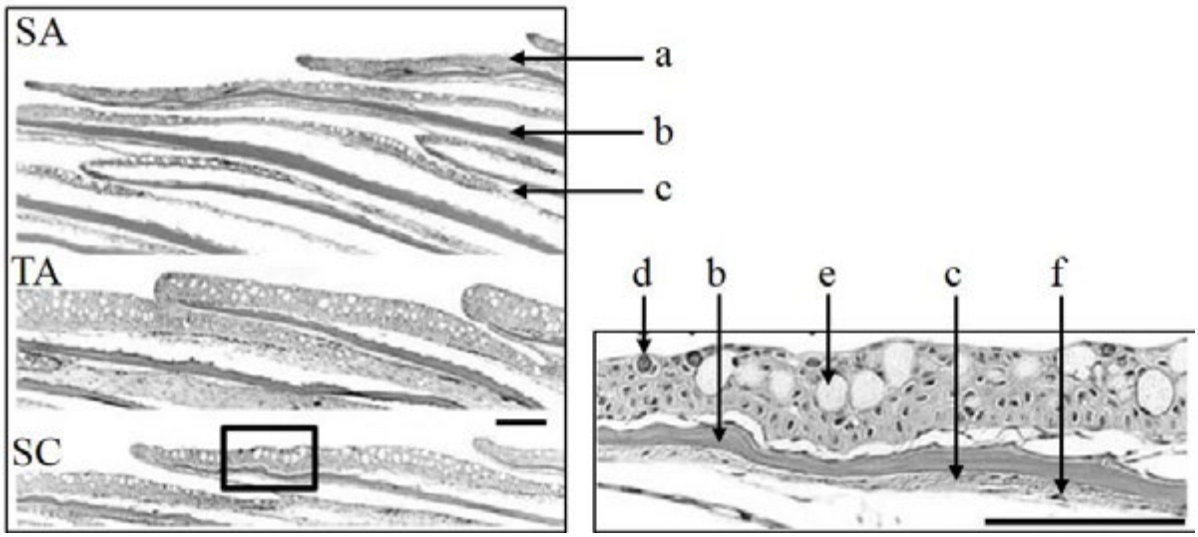

Figure 6 : Coupe histologique d'épiderme de trois salmonidés : le saumon Atlantique (SA), la truite arc-en-ciel (TA) et le saumon coho (SC). a) Epithélium. b) Ecaille. c) Derme. d) Cellule à mucus. e) Cellule à substance d'alarme. f) Chromatophore. Les barres noires représentent 0.125mm. (Modifié d'après Fast et al. 2002).

Dans le cas des salmonidés anadromes, le passage de l'eau douce à l'eau de mer (i.e. smoltification) implique de nombreux changements physiologiques nécessaires au maintien de l'osmolarité de l'organisme (Stefansson et al. 2012). Le passage progressif du milieu dulçaquicole au milieu marin en passant par des milieux aux salinités intermédiaires, permet ces changements drastiques du métabolisme et l'adaptation du poisson à son nouvel environnement.

1.6. Environnement sensoriel

Les capacités sensorielles des poissons et notamment des salmonidés sont vitales pour se nourrir, éviter les prédateurs, l'orientation spatiale, l'équilibre, la navigation et la communication sociale (Blaxter 1988).

Les salmonidés sont pourvus d'une paire d'yeux de forme aplatie, sur les côtés de la tête. L'image se forme grâce au passage de la lumière à travers la cornée et la lentille (i.e. cristallin) pour la concentrer sur les photorécepteurs de la rétine dans le fond de l'œil (Collin and Hart 2015) (**Figure 7**). Le cristallin rond est maintenu en suspension dans l'humeur vitrée grâce à des muscles et des ligaments (Khorramshahi et al. 2008). La contraction de ces muscles permet d'avancer ou de reculer le cristallin dans l'œil pour la mise au point de l'image. Le cristallin normalement transparent se trouble en cas de maladie. Il constitue alors un bon indicateur, facilement observable, de l'état sanitaire du poisson. La turbidité de l'eau est un facteur très important pour les salmonidés car il influe directement sur leur capacité à pouvoir chasser pour se nourrir (Collin and Hart 2015).

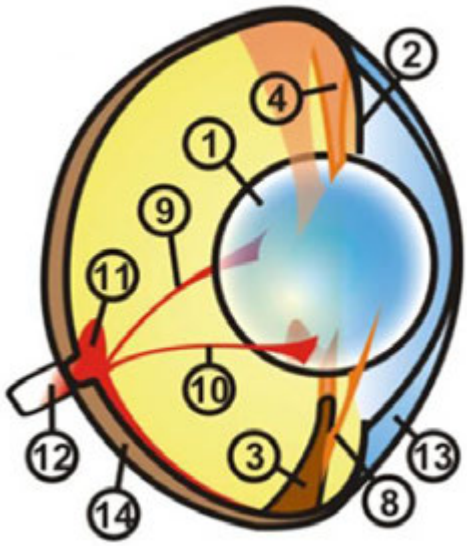

Figure 7 : Schéma d'une vue temporale d'un œil de téléostéen. 1) Cristallin. 2) Iris. 3) Muscle rétracteur du cristallin. 4) Ligament suspenseur central. 8) Ligament accessoire. 9) Ligament postérieur dorsal. 10) Ligament postérieur ventral. 11) Rétine et point aveugle. 12) Nerf optique. 13) Cornée. 14) Choroïde et sclérotique. (Modifié d'après Khorramshahi et al. 2008).

L'audition, et plus généralement la captation des vibrations, est un sens important chez les poissons. Chez les salmonidés, l'audition est assurée par une paire d'oreilles internes situées

sur les faces temporales de la tête (**Figure 8**). En plus de la captation des sons, l'oreille interne permet l'équilibre du poisson grâce à de petites concrétions minérales appelées otolithes. L'oreille interne des poissons est ainsi composée du saccule, surmonté de l'utricule contenant les otolithes, lui-même surmonté de 2 canaux semi-circulaires. La libre circulation des otolithes dans les fluides de l'utricule ainsi que les mouvements des fluides dans les canaux semi-circulaires permettent l'équilibre et l'orientation tridimensionnelle du poisson dans son environnement. Le saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel captent des sons de basse fréquence, inférieure à 380 Hz (Hawkins and Johnstone 1978; Schellart and Buwalda 1990). Cette capacité auditive est très faible comparée à d'autres poissons comme la morue ou la perche (Hawkins and Johnstone 1978). Toutefois, selon l'habitat et donc le stade de vie du salmonidé, cette capacité auditive diffère. En rivière, l'audition de la truite et du saumon est amoindrie à cause des bruits générés par les turbulences du courant, comparé à l'environnement marin. Ainsi, la truite et le saumon sont incapables de capter les sons aériens mais sont, en revanche, sensibles aux sons générés par le substrat de la rivière (Hawkins and Johnstone 1978; Schellart and Buwalda 1990). Ce phénomène joue un rôle important pour la chasse de la nourriture et l'évitement des prédateurs aquatique mais ne favorise pas la détection des prédateurs aériens comme les oiseaux piscivores.

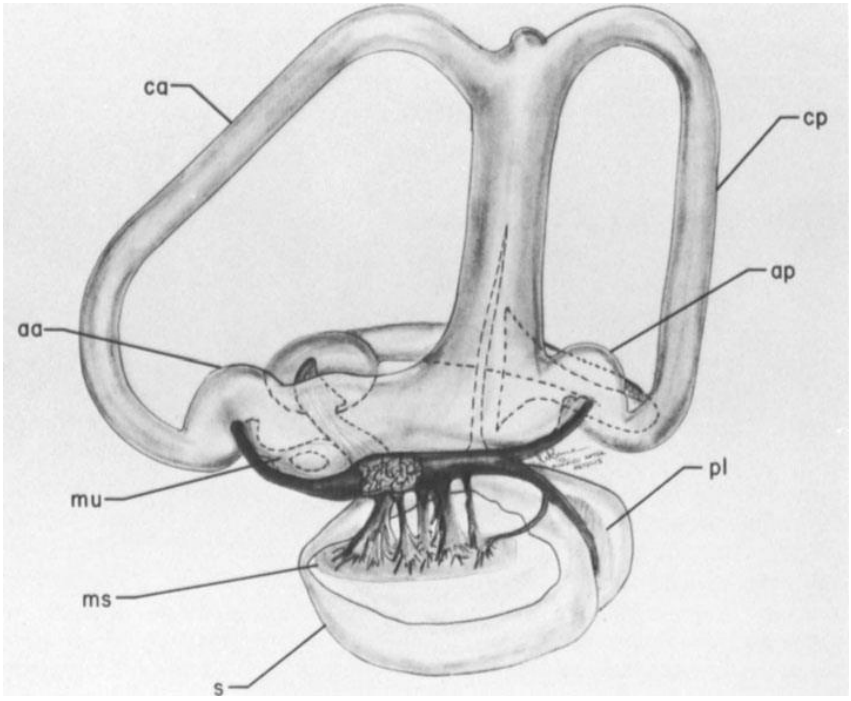

Figure 8 : Dessin d'une oreille interne de saumon Atlantique. **s** saccule. **ms** macula sacculaire. **mu** macula utriculaire. **aa** ampula antérieure. **ca** canal semi-circulaire antérieur. **cp** canal semi-circulaire postérieur. **ap** ampula postérieure. **pl** lagena. (Modifié d'après Platt and Popper 1981).

L'autre organe impliqué dans la détection des vibrations de l'eau est la ligne latérale (**Figure 9**). Il s'agit d'une ligne d'écailles spécialisées sur les flancs du poisson allant de l'opercule à la nageoire caudale. Les écailles sont perforées, permettant le passage de l'eau dans un canal tapissé de cellules ciliées appelées neuromastes. Les vibrations de l'eau et la vitesse du courant sont ainsi perçus par le poisson (Bleckmann and Zelick 2009).

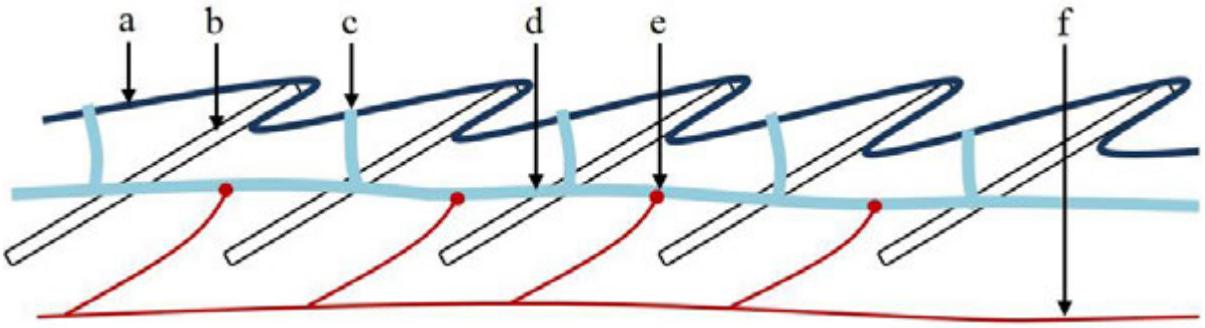

Figure 9 : Schématisation de la ligne latérale des poissons. a) Epiderme. b) Ecaille. c) Pore. d) canal de la ligne latérale. e) Neuromaste. f) Nerf.

De par sa structure, la vessie natatoire assure également le sens vibratoire des poissons. L'organe rempli d'air joue le rôle de caisse de résonnance et permet l'amplification de certaines vibrations qui ne pourraient être que difficilement détectées par l'oreille interne. Ce phénomène est d'ailleurs amélioré chez certaines espèces de poissons avec l'existence d'une chaine d'osselet (appelée appareil de Weber) reliant directement la vessie natatoire à l'oreille interne (Grande and de Pinna 2004).

L'odorat est certainement le sens le plus important chez les salmonidés, que ce soit dans le phénomène d'*imprinting/homing*, l'orientation, la communication sociale, la détection des proies ou l'évitement des prédateurs. L'organe de l'odorat est composé d'une paire de sacs olfactifs situés dans les narines logées de part et d'autre de la région antérieure de la tête (**Figure 10**). Le courant d'eau traverse les sacs olfactifs en rentrant par l'orifice antérieur et sortant par l'orifice postérieur. Le fond du sac olfactif est tapissé de l'épithélium olfactif, qui est composé de lamelles formant une rosette (**Figure 11**). L'épithélium olfactif est en partie composé de cellules ciliées exprimant les récepteurs olfactifs principaux (MOR) et de cellules à microvillosités exprimant les récepteurs olfactifs voméronasaux (VNR) (Dukes et al. 2006; Hino et al. 2009) :

- Les récepteur MOR peuvent être divisés en 2 classes : la classe I qui va permettre la détection des odeurs solubles dans l'eau et la classe II qui va permettre la détection des molécules volatiles. Chez le poisson, nous n'avons exclusivement que des gènes de la classe I (sauf chez le cœlacanthe (*Latimeria sp.*) où nous retrouvons quelques gènes de classe II).
- Les récepteurs VNR sont également divisés en deux classes : les récepteurs V1R et les récepteurs V2R. Ceux sont les récepteurs V2R, en majorité chez le poisson, qui vont permettre la reconnaissance de molécules solubles dans l'eau.

Le système olfactif du poisson est capable de détecter une large gamme de molécules comme les acides aminés, les nucléotides, les stéroïdes, les prostaglandines et les acides biliaires à des concentrations à partir de 10^{-14} M ($mol.l^{-1}$). L'olfaction intervient dans de nombreuses fonctions vitales chez les salmonidés :

- Le phénomène d'*imprinting/homing* : C'est en 1822 que Trevanius est le premier à émettre l'hypothèse que le saumon retourne pondre dans sa rivière natale grâce à l'olfaction (découverte du *homing*). Cette hypothèse est démontrée en 1951 par Hasler and Wisby, qui montrent que des saumons coho sont incapables de retourner à leur rivière natale si durant la descente de celle-ci les poissons étaient privés de leur olfaction (découverte de l'*imprinting*). Dans un autre étude, Scholz et al. (1976) ont constitué deux groupes de saumons coho ayant eu deux empreintes olfactives différentes (morpholine et 2-phényléthanol). Une fois lâchés dans un lac commun, les poissons ont migré vers leurs rivières respectives. D'après ces études, il semblerait que l'empreinte olfactive s'effectue à la descente de la rivière, durant la PST (Transformation *Parr*-Smolt). Des études se sont penchées sur l'expression des gènes codant pour les récepteurs olfactifs aux différents stades de vie du saumon. Johnstone et al. (2011) ont ainsi évalué le nombre de gènes de type *OlfC* exprimés aux stades *parr*, Smolt et Adulte chez *Salmo salar* sur deux populations anadromes et une potamodrome. L'étude ne met pas en évidence de différence significative dans la population potamodrome, mais une diminution significative du nombre de gènes codant pour les récepteurs V2R (-7 gènes *OlfC*) entre les stades « *Parr*-Smolt » et « Adulte » dans les populations anadromes. Ceci montre bien une augmentation de la capacité olfactive au moment de la PST. Ces 7 gènes *OlfC* semblent avoir une importance cruciale dans le phénomène d'empreinte olfactive. D'autres études ont démontré que les gènes *OlfC* codant pour les récepteurs de type V2R permettent la détection des acides aminés. Ainsi, l'étude comportementale de Yamamoto

and Ueda (2009) montre que des saumons du Pacifique (*Oncorhynchus keta*) discriminent le courant d'un autre selon sa composition et sa concentration en acides aminés. Ces auteurs ont montré la même chose pour le saumon rouge (*Oncorhynchus nerka*) (Yamamoto et al. 2010).

- La reconnaissance des liens de parenté est une stratégie que l'on retrouve chez de nombreuses espèces afin d'éviter la reproduction entre individus de proche parenté et donc la consanguinité (Pusey and Wolf 1996). Parmi ces stratégies de reconnaissance, l'olfaction est un outil utilisé par les salmonidés. Le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) est ainsi capable de distinguer des individus apparentés des individus non-apparentés (Quinn and Busack 1985). Il semblerait que cette reconnaissance soit basée sur la détection des acides biliaires sécrétés par le saumon (Quinn and Hara 1986).
- Les phéromones sexuelles ont une part importante dans la reproduction des salmonidés. L'effet attractif d'une part, et le déclenchement de la maturité sexuelle d'autre part, sont deux mécanismes indispensables pour initier ce processus. En effet, le rassemblement des adultes reproducteurs associé à la synchronisation de la maturité sexuelle est une stratégie cruciale pour le succès de la reproduction. L'urine de femelle mature est démontrée comme étant attractive pour les mâles matures chez le saumon masou (*Oncorhynchus masu*) et le saumon Atlantique (Olsén et al. 2002; Yambe et al. 2006a). Yambe and Yamazaki (2001) montrent également que cet effet attractif est spécifique, les mâles étant attirés par l'urine des femelles matures de leur espèce (ici saumon masou et truite arc-en-ciel). En plus de l'effet attractif, l'urine de femelle mature déclenche une réponse physiologique chez les mâles avec une augmentation du taux de testostérone chez le saumon Atlantique (Moore and Waring 1996; Olsén et al. 2001). Les prostaglandines-F contenues dans l'urine et les fluides ovariens de ces femelles matures sont démontrées comme étant des phéromones sexuelles chez le saumon Atlantique (Moore and Waring 1996; Olsén et al. 2001). L'urine des mâles matures semble également avoir un rôle dans ce processus. En effet, Young et al. (2003) montrent chez l'omble de fontaine (*Salvenius fontinalis*) que les mâles matures attirent les femelles et les mâles matures. On peut supposer que ce phénomène permet d'accroître le comportement de rassemblement des adultes reproducteurs. Toutefois, une autre étude démontre un effet inverse chez le saumon masou, l'urine de mâle mature serait répulsive pour les mâles immatures (Yambe et al. 2006b). Ce phénomène d'évitement est interprété par les auteurs comme étant une stratégie pour éviter les combats entre mâles au moment de la fraie.

- Les phéromones d'alarme ont un rôle important dans la communication conspécifique pour signaler un danger (prédateur, changement brusque d'un facteur physique ou chimique, etc…) aux individus avoisinants. Chez les poissons, ces phéromones d'alarme sont sécrétées par la peau des individus stressés ou blessés, puis diffusées par le mucus. Des truites arc-en-ciel mises en présence d'une solution de mucus de conspécifique stressé déclenchent un pic de cortisol (i.e. hormone du stress, voir Partie I chapitre 2) (Toa et al. 2004). Il a également été démontré que ces phéromones d'alarme de truite arc-en-ciel sont détectables par l'omble de fontaine et la truite fario (Mirza and Chivers 2001) exprimant davantage de comportement de fuite et moins de prise alimentaire. Toutefois, la réponse comportementale en présence de ces phéromones d'alarme est plus forte en situation conspécifique qu'hétérospécifique (Mirza and Chivers 2001).
- La capacité d'évaluer le risque de prédation dans un environnement est cruciale pour les organismes, car elle permet l'expression de stratégies anti-prédatrices nécessaires à la survie de l'animal (Keenleyside 1979). Chez les salmonidés, ces comportements sont notamment permis grâce à l'olfaction et donc la détection des odeurs sécrétées par les prédateurs. Plusieurs études se sont intéressées aux réponses comportementales de salmonidés mis en présence d'odeur de prédateur. Ferrari et al. (2008) montrent que des truites arc-en-ciel juvéniles naïves réduisent leur comportement de déplacement et d'exploration après avoir ajouté une solution à base de mucus de perche soleil (*Lepomis gibbosus*) dans leur eau d'élevage. Ils démontrent notamment que cette réponse anti-prédatrice est plus forte lors d'une deuxième exposition à l'odeur de prédateur, lorsque la première était associée à des phéromones d'alarme conspécifiques (Ferrari et al. 2008). Il y a donc un phénomène de sensibilisation à l'odeur de prédateur et donc une capacité d'apprentissage. L'augmentation des comportements anti-prédateurs face à l'odeur du grand brochet (*Esox lucius*) est également démontrée chez la truite arc-en-ciel, la truite fario (*Salmo trutta*) et le saumon Atlantique avec une diminution des déplacements, de la recherche de nourriture (i.e. foraging, voir 1.7. Ethologie), de l'exploration et une augmentation de la fréquence respiratoire, des comportements de regroupement (i.e. shoaling, voir 1.7. Ethologie) et de la station immobile (i.e. freezing, voir 1.7. Ethologie) (Brown and Smith 1998; Vehanen and Hamari 2004; Hawkins et al. 2007). Hawkins et al. (2007) montrent également que les juvéniles de saumon Atlantique augmentent leur fréquence respiratoire lorsqu'ils sont mis en présence de l'odeur d'un prédateur occasionnel comme le vairon commun (*Phoxinus phoxinus*).

- A l'inverse, la détection des odeurs de proie est également un outil indispensable pour faciliter la recherche de nourriture pour les carnivores tel que la truite et le saumon. Cette reconnaissance est principalement basée sur la capacité de détection des acides aminées chez les espèces marines (Carr and Derby 1986). Ainsi, la truite arc-en-ciel exprime un comportement de prise alimentaire lorsqu'elle est mise en présence d'une croquette à base d'extrait de calamar (Mackie 1982). La notion de palatabilité de la nourriture est ici avancée. Mearns et al. (1987) montrent ainsi que parmi les composés d'un extrait de crevette (protéines, lipides, composés acides, composés neutres, etc…), l'extrait pur et les protéines sont les plus palatables pour la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique.

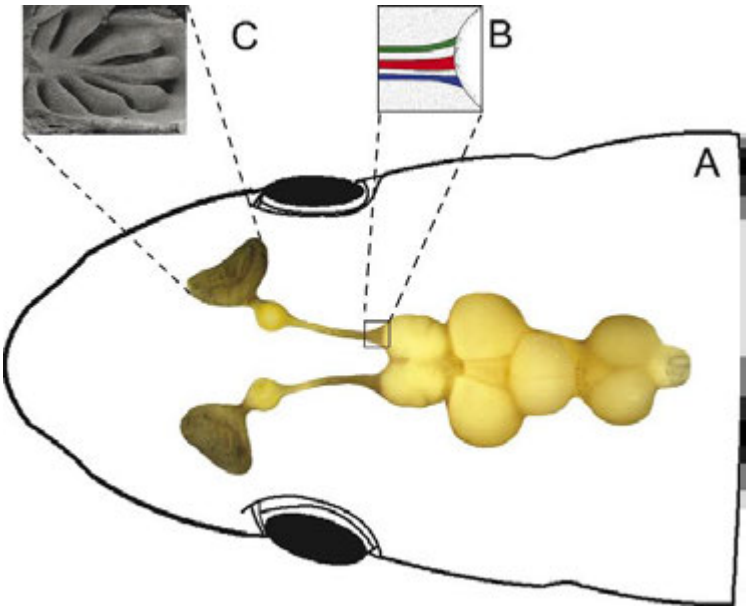

Figure 10 : Schéma d'une vue dorsale du système olfactif d'un téléostéen (A). Schéma de la jonction entre le nerf olfactif et le télencéphale (B). Photo de l'épithélium olfactif composé de lamelles formant une rosette (C). (Modifié d'après Hamdani and Døving 2007).

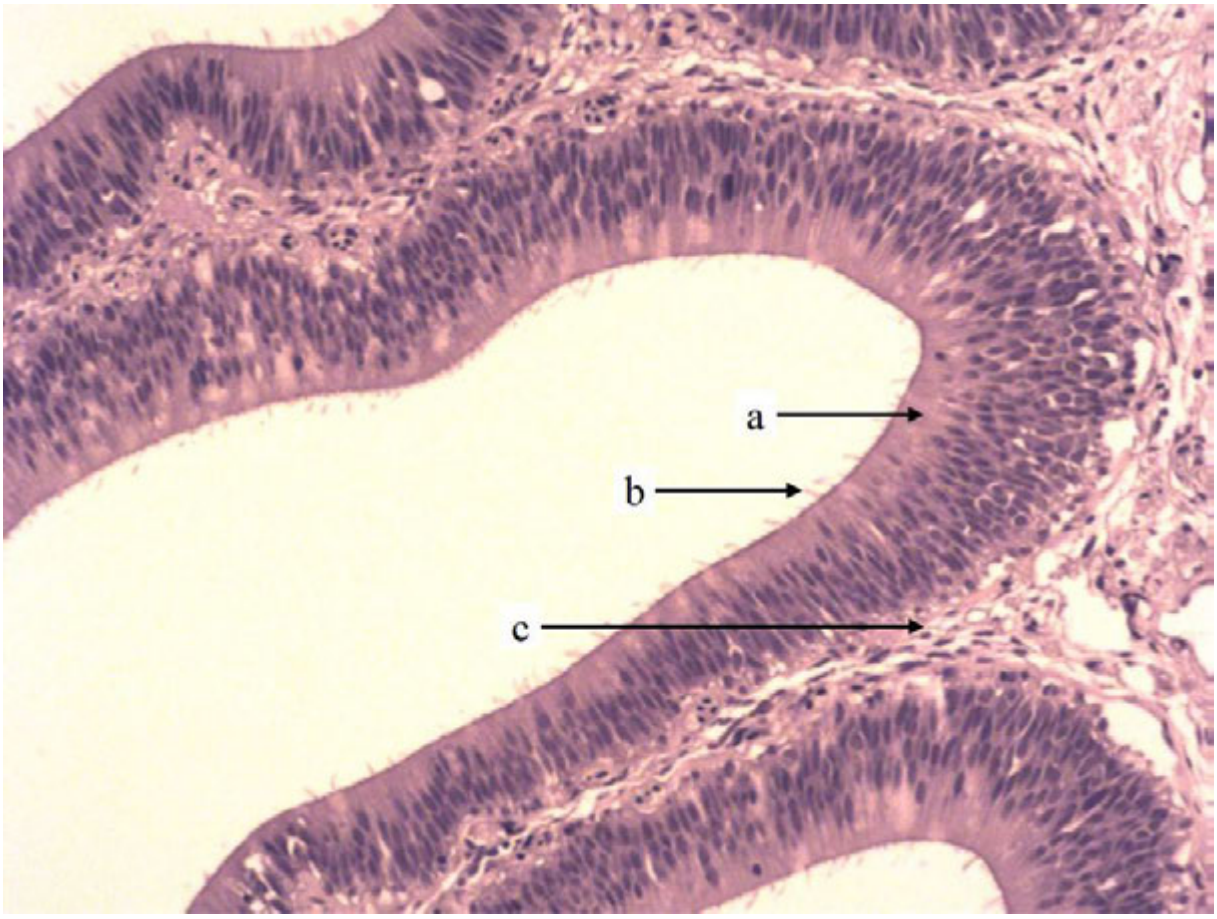

Figure 11 : Photographie d'une coupe histologique d'une lamelle de la rosette olfactive de saumon Atlantique. a) Epithélium olfactif. b) Cellule ciliée. c) Neurone olfactif. (Photo Pietro Asproni, ©IRSEA)

1.7. Ethologie et écologie

Les poissons expriment une grande diversité de comportements à des degrés de complexité variables selon les familles phylogénétiques. Le comportement des salmonidés peut être présenté en trois catégories :

Les comportements en relation avec l'environnement :

La truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique occupent des zones de profondeur différentes en fonction de leur habitat. En milieu dulçaquicole, les deux espèces sont benthiques, elles vivent donc à proximité du fond de la rivière. En milieu marin (ou dans les lacs pour les souches potamodromes), les deux salmonidés sont pélagiques, ils occupent donc la colonne d'eau entre le fond et la surface. Les zones et la profondeur ainsi occupées par les salmonidés en milieu dulçaquicole et marin sont principalement influencées, quotidiennement et de façon

saisonnière, par des facteurs physiques tolérés par les poissons (température, salinité, luminosité, etc…), la disponibilité en nourriture et les relations interspécifiques (compétition et prédation) (Drenner et al. 2012).

Le *foraging* peut être définit comme étant un comportement exploratoire pour la recherche de nourriture (Schoener 1971). Cette théorie prédit que les poissons doivent maximiser le gain énergétique(G) ($G = énergie\ ingérée - énergie\ dépensée$) en optimisant le choix des proies selon le type et la taille. La truite et le saumon sont deux poissons carnivores et donc chasseurs. En milieu dulçaquicole, les juvéniles sont dit opportunistes, ils se nourrissent en fonction des proies disponibles, de leur capacité stomacale et digestive, sans sélection en fonction de l'apport énergétique des proies (Bres 1986). Ainsi leur technique de chasse est plutôt basée sur le concept de *sit-and-wait*, c'est-à-dire très peu de comportement exploratoire pour la recherche de nourriture, mais une activité intense pour la capture de la proie (Tunney and Steingrímsson 2012). En milieu marin ouvert, les salmonidés adoptent une stratégie différente : les poissons explorent l'environnement jusqu'à la découverte d'un patch de ressource et l'exploitent jusqu'à sa disparition. L'activité locomotrice durant les phases d'exploration est estimée en moyenne à une longueur de corps par seconde (Drenner et al. 2012).

Les relations interspécifiques :

La compétition interspécifique pour une ressource limitante est primordiale pour la *fitness* des animaux. La compétition pour la nourriture ou un territoire se traduit par des comportements agonistiques (menace) et agressifs. Chez les salmonidés, la littérature existante définit ces comportements comme suit :

- Les comportements agonistiques se traduisent par l'approche lente ou rapide d'un individu (compétiteur) vers un autre (intrus) avec ou sans contact (Chiszar et al. 1975). Le compétiteur peut alors adopter plusieurs postures de menace en venant se placer rapidement ou lentement derrière ou au-dessus de l'intrus, avec ou sans contact des nageoires caudale ou dorsale.
- Les comportements agressifs se traduisent par l'approche rapide du compétiteur vers l'intrus, avec contact et parfois avec morsure du corps ou des nageoires (Chiszar et al. 1975).

A titre d'exemple, dans le Nord-Ouest de l'Amérique, la truite arc-en-ciel est une espèce introduite compétitrice des salmonidés indigènes, comme la truite fardée (*Oncorhynchus clarkii*), pour l'exploitation du territoire et de la nourriture (Seiler and Keeley 2007). Les truites arc-en-ciel expriment des comportements agressifs envers les truites fardée pour l'accès à la nourriture et aux zones d'abri.

Un autre type de relation interspécifique concerne la lutte contre les prédateurs. Nos deux salmonidés d'étude ne possédant pas de système de défense (épine, toxicité, etc…), les stratégies de défense contre la prédation sont principalement basées sur la mise à l'abri et la détection du prédateur pour le fuir. Toutefois, la couleur des écailles de la truite et du saumon peut valoir un certain mimétisme avec l'environnement : les écailles sombres du dos se confondant avec le substrat de la rivière et les eaux profondes de l'océan ; les écailles claires sur le ventre avec la lumière de surface. En milieu dulçaquicole, les juvéniles exploitent le substrat de la rivière pour s'y abriter. Les interstices créés par le chevauchement des galets offrent des lieux de planque idéaux selon la taille des poissons. Les plus petits (alevin et *fry*) pourront de loger entièrement dans ces espaces, alors que les plus gros (*parr* et smolt) se nicheront dans l'ombre des pierres (Cunjak 1988). Les poissons peuvent également exprimer le comportement de *freezing*, c'est-à-dire une immobilité totale sur le substrat (Brown and Smith 1998). En milieu marin comme en milieu dulçaquicole, la fuite est certainement la réponse la plus communément utilisée par les salmonidés face à un prédateur (*flight response*) (Johnsson et al. 2001). Ce comportement est permis grâce à une activité locomotrice efficace avec des nageoires aux muscles puissants et une forme de corps hydrodynamique.

Les comportements sociaux :

Les comportements sociaux regroupent l'ensemble des comportements mis en place entre les individus d'une même espèce. Le congénère pouvant jouer aussi bien le rôle de partenaire que de rival, les comportements peuvent être tantôt altruiste tantôt égoïste. Tout comportement social au sein d'une espèce découle d'une sélection au cours de l'évolution, basé sur le rapport coût/bénéfice du processus. Un comportement social est ainsi sélectionné car il améliore la *fitness* de l'individu ou de l'espèce.

Le *Schooling* est un comportement de rassemblement et de déplacement synchronisé de poissons d'une même espèce. Cette nage en banc se caractérise par une proximité entre les individus nageant dans la même direction et à la même vitesse (Lopez et al. 2012). Chez les

salmonidés, ce comportement favorise surtout le comportement alimentaire et l'évitement des prédateurs (Pitcher 1986). Ainsi, la formation en groupe permet de diminuer le temps passé à être vigilant, pour favoriser le temps à la recherche de nourriture. La probabilité de capture par un prédateur est également divisée par le nombre d'individu composant le groupe. La synchronisation des mouvements des poissons en banc augmente la probabilité de défaite pour le prédateur. Toutefois, si le comportement de *schooling* permet de réduire la prédation et la dépense d'énergie à la recherche de nourriture, elle réduit également la quantité de prise alimentaire par individu puisque le patch de ressource est à partager avec les autres membres du groupe. Ainsi, le *schooling* présente également des inconvénients pour un individu, ce qui peut tendre à sa désorganisation. Dans le cas de nourriture limitée, un individu aura tendance à se désolidariser du groupe pour avoir plus de chance de manger à sa faim, mais au détriment de sa protection contre les prédateurs (plus grande exposition, moins de vigilance, moins de stratégie d'évitement). Ce comportement égoïste mène à la désorganisation de la formation de *schooling* dans le cas de ressources vitales limitées, permettant à l'individu une meilleure exploitation de cette ressource, mais au détriment des avantages conférés au *schooling*.

L'établissement d'une hiérarchie de dominance dans un groupe de salmonidés est le résultat de compétitions intraspécifiques pour une ressource limitée (nourriture, abri, partenaire reproducteur). L'issue de ces combats établit ainsi le rang hiérarchique des individus gagnants et perdants. Dans un groupe de saumons Atlantique ou de truites arc-en-ciel, certains individus (dominants) parviennent à monopoliser certaines ressources durant un certain temps, au détriment d'autres individus (subordonnés). Cette hiérarchie est d'autant plus marquée que le nombre d'individus la composant est petit. Dans les stades juvéniles par exemple, le territoire et les abris sont des ressources essentielles. Des comportements agonistiques et agressifs (voir *compétition interspécifique*) sont alors exprimés par les individus en compétition pour ces ressources.

La reproduction des deux salmonidés d'étude fait suite à la migration des individus de l'océan aux rivières de fraie. Cette migration est éprouvante pour les individus qui arrêtent de s'alimenter dès l'estuaire, et qui font face à de nombreux obstacles à franchir (barrages naturels ou anthropiques, courants de forte intensité, etc…). Une fois dans les zones de fraie, les adultes reproducteurs expriment les comportements de reproduction (Beall and de Gaudemar 1999). Les femelles pondent la totalité de leurs œufs en plusieurs fois, donc dans plusieurs nids (jusqu'à 10 parfois) ; la majorité des œufs étant pondue dans les 3 premiers nids. La majorité de ces pontes à lieu la nuit (environs 80%). Après avoir choisi le lieu de

ponte, la femelle défend ce territoire contre les autres femelles. La femelle peut choisir de creuser son nid plus profondément qu'habituellement pour favoriser le succès d'éclosion des œufs. En effet, en cas de densité élevée de reproducteur, la probabilité pour un nid d'être détruit par une autre femelle voulant creuser son propre nid est élevée. Le surcreusement est une conséquence indirecte de la compétition entre les femelles. Une fois le nid creusé, les mâles entrent également en compétition pour avoir accès à la femelle et féconder ses œufs. Les mâles dominants ayant gagné les combats fécondent alors les œufs en se positionnant à côté de la femelle et en déversant sa laitance par-dessus les œufs (Beall and de Gaudemar 1999). Pendant ce temps, les mâles perdants se tiennent à quelques mètres derrière le nid et peuvent ainsi tenter des approches de la femelle pour participer à la fécondation des œufs. Chez le saumon atlantique et la truite arc-en-ciel, une particularité est à noter : une maturité sexuelle précoce peut avoir lieu chez de jeunes mâles et notamment au stade *parr*. Ces *parr* sexuellement mature (appelés mâles furtifs ou *sneakers*) sont de très petite taille, comparé aux adultes reproducteurs, et peuvent s'immiscer ainsi dans les nids pour féconder les œufs. La sélection sexuelle se retrouve chez les deux sexes : les femelles préfèrent les mâles de taille supérieure, et les mâles ne sélectionnent que des femelles en activité avancée de fraie (nid déjà creusé et femelle prête à pondre). Il existe également une compétition spermatique lors de la fécondation. Les œufs fécondés sont ensuite rapidement recouverts par la femelle ou un mâle pour éviter la prédation (Beall and de Gaudemar 1999). Après cela, les adultes reproducteurs meurent d'épuisement, mais certain parviennent à retourner à la mer (les *kelts*) pour se nourrir et peuvent alors recommencer une saison de reproduction.

2. Elevages

2.1. Historique

Les premières traces de consommation de salmonidés par l'Homme remonteraient au paléolithique supérieur et plus précisément le Magdalénien (-17 000 à -12 000 avant notre ère) dans le sud-ouest de la France (Le Gall 2001). Depuis, le saumon et la truite sauvage sont péchés et consommés par l'Homme. En revanche, l'élevage des salmonidés ne commence que tardivement. Les premières fécondations artificielles sont maîtrisées dans la seconde moitié du 19ème siècle pour le saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel. Les petits élevages ont alors pour objectif le repeuplement des rivières en juvéniles (principalement pour le saumon) et la pêche à la ligne (principalement pour la truite). Ce n'est qu'en 1960 que les élevages intensifs

font leur apparition avec le développement de l'aliment sec industriel (FAO 2016b; FAO 2016c). Depuis, la production des 2 espèces a connu une croissance exponentielle (**Figure 12**).

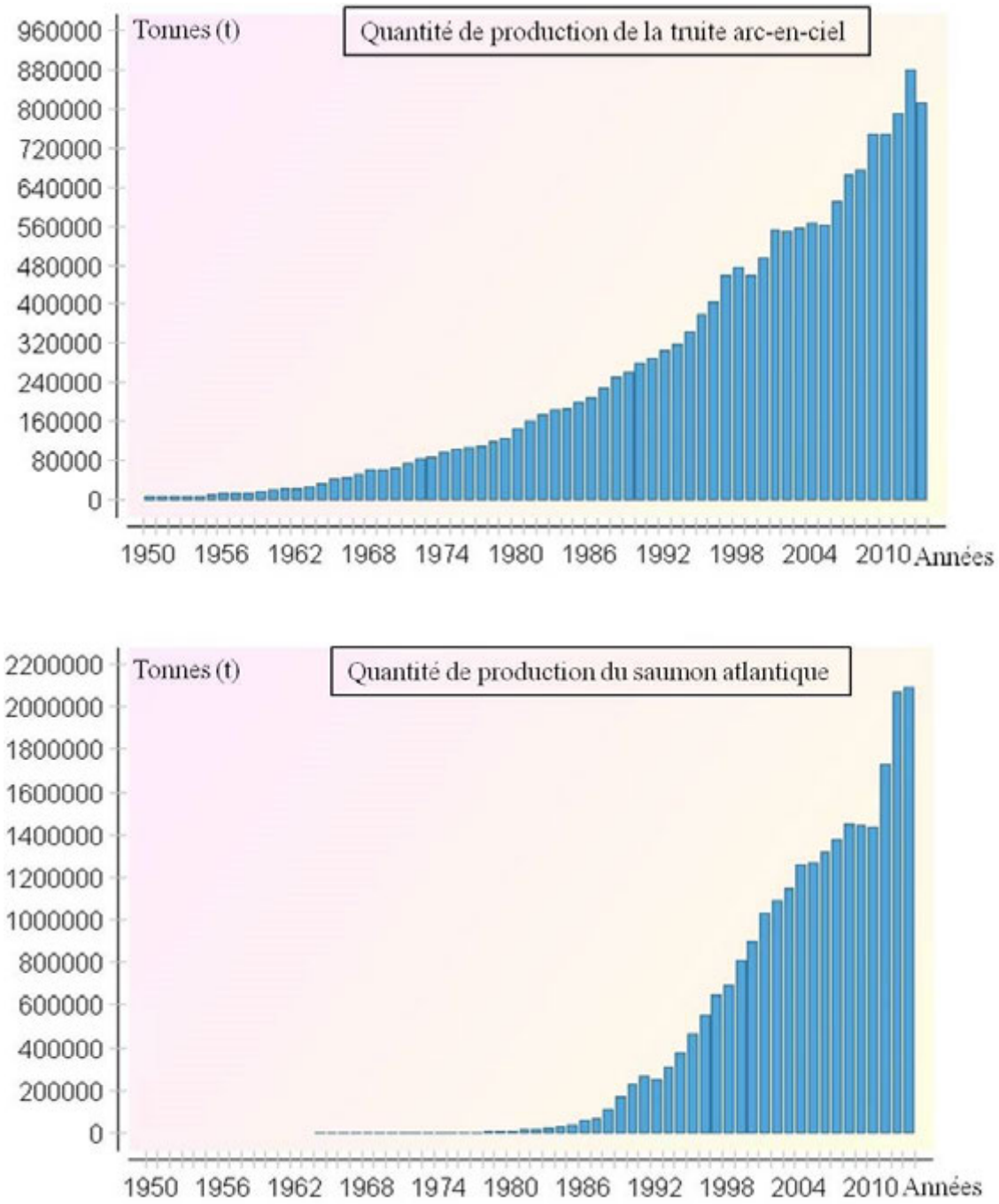

Figure 12 : Production mondiale de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique de 1950 à 2014 (FishstatJ© software (FAO 2016a)).

2.2. Cycles de production

Elevage anadrome du saumon atlantique et de la truite arc-en-ciel :

En automne, les adultes sexuellement matures sont placés en eau douce dans des bassins durant environ 2 mois. Après ce laps de temps, œufs et laitance sont extraits des géniteurs en massant et pressant l'abdomen des nageoires pectorales vers les nageoires pelviennes : c'est la lacération. Dans certains cas, la femelle peut être sacrifiée pour récupérer directement les œufs après laparotomie abdominale. La fécondation s'effectue en bassine par simple mélange des œufs et de la laitance. Un traitement préalable à l'eau peut être effectué pour permettre aux œufs de grossir et durcir, et faciliter ainsi la fécondation.

Les œufs sont ensuite étalés sur des plateaux d'éclosion ou dans un silo (**Figure 13**). Les œufs oeillés, c'est-à-dire embryonnés, apparaissent 250°j après la fécondation chez le saumon et 120°j pour la truite. Après 250°j de plus, les œufs éclosent. La grille sur laquelle sont stockés les œufs possède une maille permettant aux alevins de passer au travers, tandis que les chorions vides demeurent au-dessus. Le système permet ainsi de retirer les coques vides, afin de limiter le risque de contamination des alevins par les champignons saprophytes du type *Saprolegnia sp*, qui se développent sur les chorions en décomposition au contact des alevins.



Figure 13 : Photo d'œufs de saumon Atlantique et truite arc-en-ciel. a) Plateaux d'éclosion d'œufs de saumon Atlantique (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA). b) Grille d'éclosion pour œufs de truite arc-en-ciel (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA). c) Silo d'œufs de saumon Atlantique (Photo Mark Latti, ©Maine Department of Inland Fisheries & Wildilife).

Les alevins sont maintenus dans l'obscurité pour mimer la luminosité naturelle dans le nid de gravier. Un substrat artificiel rappelant le gravier (grille, tapis à picots, etc…) peut parfois être ajouté dans le fond des bassins pour permettre aux alevins de s'y réfugier. Une fois la vésicule résorbée, les *fry* nagent jusqu'à la surface de l'eau et sont prêt à recevoir leur première nourriture. Les premières rations de nourriture peuvent être distribuées dans les plateaux d'éclosion, mais le plus souvent les *fry* sont transférés dans des bacs circulaires d'eau douce à circuit ouvert, ou fermé et filtré (**Figure 14a**). Les *parr* puis les smolts (ou *fingerlings* pour la truite) sont eux aussi élevés dans des bassins circulaires à circuit ouvert ou fermé, ou plus rarement, dans des cages en lac (**Figure 14b**). Les éleveurs peuvent parfois jouer sur la température de l'eau ou la luminosité pour obtenir un approvisionnement continu de smolts (ou *fingerlings*) entre Avril et Septembre. Le smolt et le *fingerlings* peuvent peser entre 40 et

120 g, environ 1 an après l'éclosion. La smoltification en élevage se fait donc plus tôt qu'en condition naturelle, mais généralement à un poids supérieur.

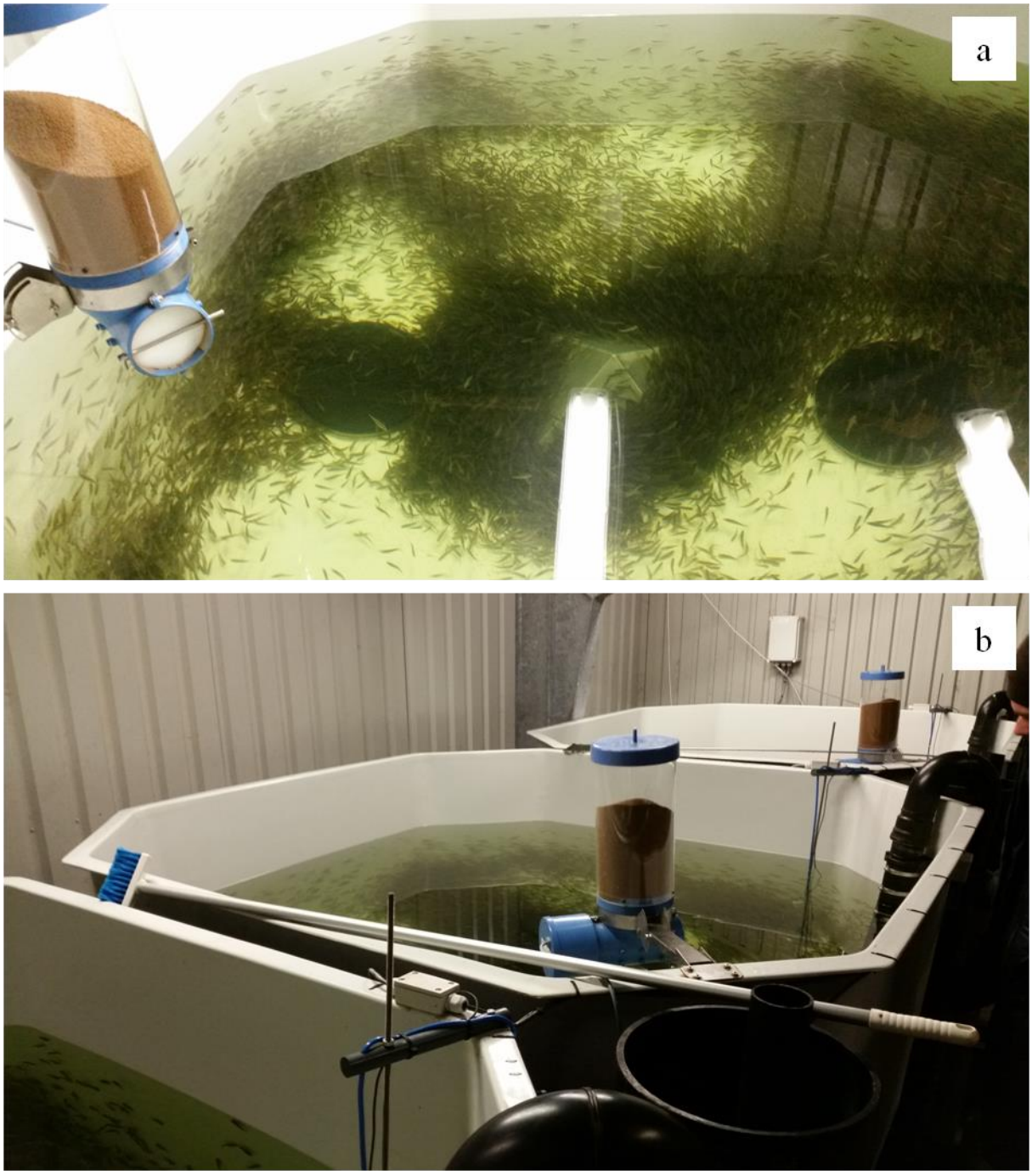

Figure 14 : Bassin circulaire d'eau douce. a) Bassin circulaire pour l'élevage de *fry* de saumon Atlantique. b) Bassin circulaire pour l'élevage de *parr* de saumon Atlantique. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

La salinité de l'eau d'élevage des smolts et *fingerlings* peut être augmentée petit à petit pour se rapprocher du processus naturel de smoltification. Mais bien souvent, la smoltification

se fait plus directement en transférant les poissons de l'eau douce à l'eau de mer. En effet, les smolts et *fingerlings* sont amenés dans les fermes en pleine mer par bateau appelé *well-boat* (**Figure 15**). Ces *well-boat* présentent un ou plusieurs bassins pour accueillir et transporter les poissons. Un large tuyau permet d'aspirer les poissons dans leur système d'élevage pour les transférer dans le bassin du bateau rempli d'eau de mer. Une fois arrivé à la ferme de pleine mer, les smolts et *fingerlings* sont relargués du *well-boat* pour être placés dans les cages en filet. Généralement une ferme se compose de minimum 6 cages circulaires ou carrés (jusqu'à 20 parfois) et d'une *feedstation* (**Figure 16a** et **Figure 17**). La *feedstation* est une plateforme de distribution de la nourriture et un lieu de vie pour les éleveurs, pour surveiller l'élevage en permanence via des caméras de surveillance disposées dans les cages (**Figure 16b**).



Figure 15 : Schéma d'un *well-boat*, un bateau spécialisé dans le transport de poisson. Le bateau est équipé d'un bassin pour maintenir les poissons et d'un tuyau aspirant pour les capturés dans leur bassin d'élevage (Crédit photo : http://www.marineinsight.com/types-of-ships/what-are-wellboats/).



Figure 16 : Ferme d'élevage de saumon Atlantique. a) Photo en vue aérienne d'une ferme classique de saumon Atlantique (Crédit photo : http://www.asc-aqua.org/index.cfm?act=update.detail&uid=266&lng=1). b) Photo d'une *feedstation*, bâtiment flottant destiné à la distribution de la nourriture et la surveillance de la ferme (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

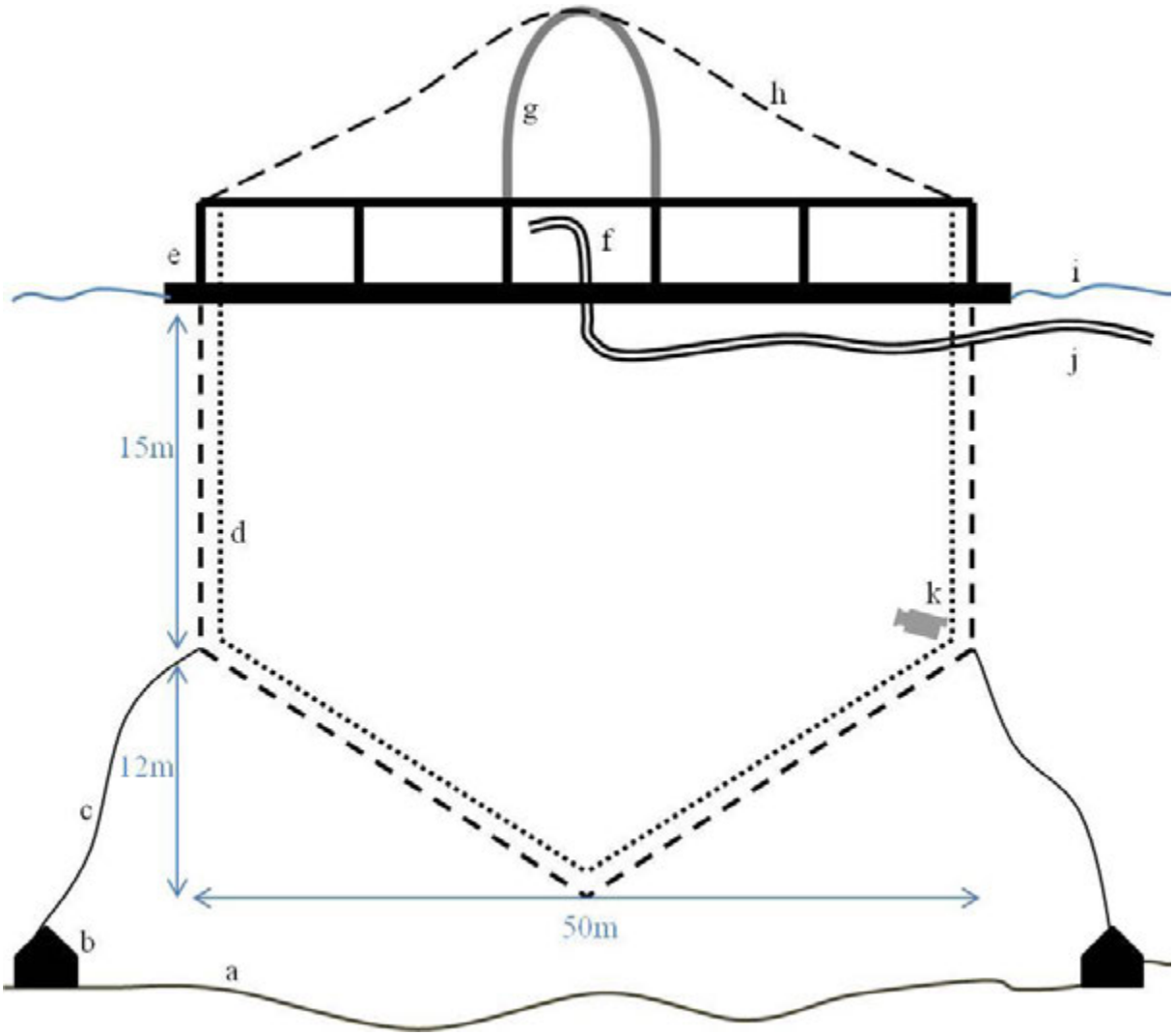

Figure 17 : Schéma d'une cage en filet pour l'élevage du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel. **a** Fond marin. **b** Structure d'amarrage. **c** Corde de fixation de la cage. **d** Paroi de la cage à double filets. **e** Structure flottante circulaire et plateforme. **f** Canon de distribution de la nourriture situé au centre de la cage. **g** Structure flottante située au centre de la cage pour supporter le filet de protection. **h** Filet de protection contre les oiseaux piscivores. **i** Surface de l'eau. **j** Tuyau d'alimentation de la cage en nourriture. **k** Caméra de surveillance.

Près d'un an et demi après l'arrivée des smolts et *fingerlings* en mer, les poissons sont à leur poids d'abattage (minimum 2 kg). Les poissons sont alors transportés par *well-boat* jusqu'à l'abattoir ou abattus sur place, à côté de la cage d'élevage, dans des bateaux spécialisés. A l'abattoir, les poissons sont directement envoyés sur la chaîne d'abattage ou parfois placés dans des bassins d'attente. L'abattage des saumons et truites se fait par étourdissement (coup de bâton, choc électrique, etc…) puis exsanguination en coupant les veines branchiales. Les poissons sont ensuite plongés dans de l'eau glacée durant l'exsanguination. Les viscères de l'animal sont ensuite retirés et le poisson est nettoyé. Les poissons vidés sont empaquetés dans des bacs de glace et expédiés.

La sélection des géniteurs n'existe pas vraiment dans l'élevage des salmonidés. En effet, les adultes reproducteurs sont obtenus en laissant quelques poissons dans la cage d'élevage après la récolte pour l'abattage. Au moment de l'abattage des individus du même lot, des analyses vétérinaires sont effectuées afin de déterminer l'état sanitaire du lot. Si les analyses sont concluantes, les quelques poissons laissés dans la cage y sont maintenus jusqu'à maturité sexuelle. Le temps nécessaire pour atteindre la maturité sexuelle est fluctuant selon plusieurs paramètres tels que la température de l'eau, l'alimentation, le cycle lumineux et surtout la salinité. Les adultes ne seront véritablement matures sexuellement qu'une fois transférés dans l'eau douce.

Un vide sanitaire de 6 semaines est généralement appliqué dans les cages en mer entre deux lots de saumon ou truite.

Elevage de la truite arc-en-ciel potamodrome :

L'élevage de la truite arc-en-ciel en eau douce est différent de celui en eau de mer sur certains points. L'une de ces différences réside dans la croissance des truites en phase d'engraissement qui est beaucoup plus lente en eau douce qu'en eau salée. Le but de cet élevage n'est pas seulement la consommation humaine, mais également le repeuplement des rivières pour la pêche à la ligne. Ainsi, la taille recherchée est bien moins importante que celle des élevages en eau de mer.

Le protocole de fécondation est le même que celui décrit précédemment : ovocytes et laitance sont obtenus par lacération des adultes reproducteurs et mélangés simplement en bassine avec de l'eau pour déclencher le processus de fécondation. Les œufs peuvent être maintenus en plateau d'éclosion ou en silo, mais généralement le système d'élevage majoritaire de la truite arc-en-ciel potamodrome est le *raceways* (**Figure 18**). Il s'agit d'un bac (souvent en béton) étroit et très long avec un courant d'eau allant d'un bout à l'autre. Les *raceways* sont généralement installés proches d'une rivière qui alimente ainsi le système d'élevage mécaniquement et en continue. Ainsi, dès le début, les œufs peuvent être maintenus dans des *raceways* à faible débit d'eau, et toujours étalés sur les grilles à œufs. L'avantage de cette structure d'élevage est qu'il permet de limiter les transferts des truites entre bassins en les maintenant dans le même *raceways* du stade œuf au stade *parr*. Après cela, une division du lot est souvent nécessaire à cause de la croissance des poissons qui induit une augmentation de la densité d'élevage.



Figure 18 : Photo d'un *raceways*, système d'élevage utilisé principalement pour l'élevage de la truite arc-en-ciel potamodrome (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

Pour les truites destinées à la consommation humaine, la taille d'abattage est généralement de 250 g (on parle de « truite portion »). Pour la taille des truites destinées au repeuplement des rivières et lacs (privés ou publics), tout dépend de la demande du client (particuliers, associations ou autorités publiques). Ces truites sont généralement examinées avec plus d'attention pour ne sélectionner que les individus en bonne santé et de bonne apparence (qualité des nageoires, des écailles, absence de parasites, etc…).

L'abattage, pour les truites destinées à la consommation humaine, se fait également par étourdissement (bâton, choc électrique, etc…) suivi parfois d'une exsanguination par section des veines branchiales. Egalement, beaucoup d'élevages pratiquent encore l'abattage par asphyxie en laissant la truite hors de l'eau, directement sur la glace.

Les autres systèmes d'élevage :

D'autres types d'élevage existent, comme par exemple l'élevage en circuit fermé (**Figure 19**). Les saumons sont alors maintenus du stade alevins à l'abattage dans des bassins circulaires en circuit fermé. L'eau douce pour les stades juvéniles et l'eau salée sont filtrées et ré-oxygénées en continu. Ce système permet un contrôle précis de la qualité de l'eau et élimine ainsi le problème de maladies et parasites. Cependant, cette méthode d'élevage entraîne un certain nombre de difficultés, et tout particulièrement le phénomène de maturité précoce des jeunes mâles (parfois dès le stade *parr*) rendant la chair inconsommable, ou encore l'apparition d'une odeur terreuse ou « odeur de vase », liée à l'accumulation de composés odorants comme la géosmine.



Figure 19 : Photo d'un bassin d'élevage de saumon Atlantique en circuit fermé (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

Les élevages des stades juvéniles peuvent également se faire à l'extérieur, en cage, selon les mêmes méthodes que nous avons décrites précédemment. Les lacs ou cours d'eau présentant un bon courant et donc un bon renouvellement d'eau, sont des endroits adaptés pour y installer ces cages.

L'alimentation

La taille des croquettes évolue au fils du développement (du stade *fry* à l'abattage), et donc en fonction de la taille de la bouche des poissons. La nourriture se compose d'huile végétale mais aussi et encore d'huile et de farine de poisson. Ceci étant, la qualité de l'aliment développé permet un indice de consommation des saumons et truites proche de 1. Le marché des salmonidés destiné à la consommation humaine expectant une couleur de chair rosée, des caroténoïdes peuvent être ajoutés à l'alimentation des poissons durant la période d'engraissement en mer. L'effet attractif, la palatabilité et le déplacement de la nourriture sont des paramètres indispensables pour induire le comportement alimentaire chez le saumon et la truite d'élevage.

2.3. Statut actuel : espèces captives ou domestiques ?

Le principal objectif de la domestication est certainement la sélection de lignées à haut potentiel de croissance et à faible agressivité. Ainsi, ce processus est à l'origine de profonds et irréversibles changements physiologiques et comportementaux. En aquaculture, la domestication tend à sélectionner des individus principalement pour la croissance, la survie, le retard de la maturité, la tolérance au stress, la résistance aux maladies, la qualité de la viande, la quantité d'œufs produits, l'agressivité, la vigilance face aux prédateurs et le comportement alimentaire (Begout Anras and Lagardere 2004; Verspoor et al. 2006). Dans le cas de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique, ces paramètres physiologiques, comportementaux et zootechniques, ne sont sélectionnés que depuis le début de l'élevage intensif et la maîtrise de la fécondation artificielle ; c'est-à-dire depuis les années 1960. Si on considère qu'une génération dure un peu moins de 3 ans, il y a donc eu environ 20 générations de truite et de saumon en 55 ans de production. Il est alors judicieux de s'interroger sur le statut de ces deux espèces, à savoir si leurs changements physiologiques et comportementaux sont assez importants pour justifier l'appellation d'espèce domestiquée.

La vigilance face au prédateur est différente entre les saumons sauvages et d'élevage. Ainsi, dans l'étude de Johnsson et al. (2001), le rythme cardiaque et les comportements de fuite sont plus élevés chez les saumons sauvages que chez les saumons élevés depuis 7 générations. Ces saumons étant issus de la même souche sauvage, il semblerait que la sélection génétique et les conditions environnementales du milieu d'élevage induisent des changements dans la réaction à la menace de prédation (Johnsson et al. 2001).

Le comportement alimentaire est également modifié en conditions d'élevage (Begout Anras and Lagardere 2004). Les périodes d'alimentation et les quantités de nourriture distribuées, imposées par les contraintes d'élevage, sont incontestablement différentes des besoins de l'animal en condition naturelle (Sanchez-Vazquez and Madrid 2001). De plus, pour nos deux espèces prédatrices, la nourriture inerte distribuée en élevage entraine une perte de la reconnaissance des proies et des capacités de chasse (Bégout Anras et al. 2001).

L'influence des conditions d'élevage sur l'agressivité et les comportements territoriaux n'est pas clairement établie chez les salmonidés. Chez la truite fario par exemple, Petersson and Jarvi (2000), ne montrent aucune différence dans les comportements agonistiques entre les populations sauvages et d'élevage. Toutefois, les auteurs montrent une différence notable

dans l'exploitation de la nourriture, et donc la croissance ente les deux souches. De manière générale, il est admis que les comportements agonistiques sont moins nombreux grâce aux caractéristiques de pratique d'élevage, et non pas par la sélection engendré par la domestication (Begout Anras and Lagardere 2004). Ces comportements agonistiques et la position hiérarchique des individus dans un groupe de salmonidés d'élevage, ont pour conséquence une inégalité dans l'accès à la nourriture, souvent problématique chez les éleveurs pour la croissance des individus. Les salmonidés dominants occupent ainsi les étages supérieurs de la colonne d'eau dans les cages d'élevage et monopolisent l'accès à la nourriture distribuée au détriment des individus dominés. Pour détourner ce phénomène, la nourriture est souvent distribuée sous vidéosurveillance (**Figure 17**) pour n'être stoppé qu'une fois que les individus du bas de la cage se sont nourris jusqu'à satiété.

Il n'est certainement pas approprié de parler d'espèce domestique, ni d'espèce en captivité pour nos deux espèces d'étude. Toutefois, tous ces changements dans le comportement et la physiologie des salmonidés d'élevage montrent que le processus de domestication est amorcé.

2.4. Les produits de la salmoniculture

Les produits pour la consommation humaine issus de la salmoniculture se déclinent de plusieurs manières. La truite arc-en-ciel potamodrome est principalement vendue entière (« truite portion ») à la taille de 250 g en France, 450 g aux USA (FAO 2016b). En élevage anadrome, les truites et les saumons sont vendus frais, fumés, entiers, en filet ou en préparation (rillette, pâtés, etc…) (FAO 2016b; FAO 2016c). Environs 60% de la production de saumon est destinée au fumage (FAO 2016c). D'autres produits annexes sont également élaborés à partir de ces élevages comme la transformation des déchets (tête, viscères, etc…) en farine de poisson pour l'aliment industriel, les œufs et les huiles de poisson.

Les paramètres les plus importants pour une bonne qualité de la viande sont la texture, la couleur, l'odeur, la teneur en graisse et la teneur en eau. La qualité des pratiques d'élevage et d'abattage vont influer ces paramètres définis par les consommateurs. La texture et les teneurs en eau et graisse de la viande seront influencées par les techniques d'élevage, d'abattage puis de conservation des poissons. La couleur de la chair est principalement donnée par des pigments (caroténoïdes) ajoutés à l'aliment distribué. Le type d'élevage influence l'odeur de la chair : ainsi, les poissons élevés en bassin ouvert et fermé auront une odeur plus

« terreuse » (accumulation de la géosmine) que les poissons élevés en milieu ouvert comme les cages.

Chapitre 2 : Le stress

1. Définitions et généralités du stress

Le stress, aussi appelé syndrome général d'adaptation, est d'abord définit par Hans Selye (1907-1982) en 1946 dans *The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation* (Selye 1946). Diplômé en médecine puis d'un doctorat en physiologie, ce spécialiste de l'endocrinologie définit le stress comme étant l'ensemble des réactions physiologiques et psychologiques déclenchées par un organisme subissant un stimulus externe qui déséquilibre son fonctionnement habituel. Il décrit alors ces réactions en 3 phases :

- Phase d'alarme : l'organisme libère l'énergie nécessaire pour faire face à l'événement.
- Phase de résistance : l'organisme épuise ces ressources pour lutter contre le stimulus.
- Phase d'épuisement : l'organisme n'est plus capable de résister et les troubles somatiques apparaissent.

L'équilibre physiologique évoqué par Hans Selye est également appelé homéostasie. L'homéostasie résulte donc d'une capacité pour un organisme à conserver un certain équilibre dans son fonctionnement malgré les changements environnementaux externes. Il s'agit par exemple pour un organisme endotherme de maintenir sa température interne à une valeur précise quelle que soit la température externe. Si ces changements externes deviennent trop importants, l'organisme n'est plus capable de maintenir son homéostasie et le stress se met en place pour faire face à la situation. Ainsi, si la température externe est trop faible, l'organisme endotherme entre dans un état de stress, et une cascade de réactions physiologiques et comportementales apparaissent (ralentissement du métabolisme, contractions musculaires, mise à l'abri, etc…).

Au fur et à mesure des découvertes scientifiques sur le sujet, le stress se définit plus précisément. Ainsi, Broom and Johnson (1993) définissent le stress comme étant « un effet de l'environnement sur l'individu qui se surimpose à ses systèmes de contrôle et induit des réactions adverses, réduisant à terme son adéquation à l'environnement (*fitness*) ». Dans cette définition du stress, les auteurs précisent le côté néfaste de cette réaction sur l'organisme. En effet, l'énergie habituellement mobilisée pour répondre aux besoins vitaux de l'organisme

(survivre et se reproduire) est, lors d'un stress, utilisée pour faire face à l'événement perturbateur.

Ces événements perturbateurs peuvent être de différents ordres : les facteurs abiotiques (température, luminosité, pollution chimique ou physique, etc…), les maladies, les parasites, les lésions, les interactions inter- et intraspécifiques, etc… (Broom et al. 2006). Ainsi le stress provoqué est soit aigu, répété ou chronique.

2. Particularités du stress chez les poissons

Comme décrit chez les mammifères, la réponse neuroendocrine du stress chez les poissons passe d'abord par l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Interrénal (i.e. axe HPI) (**Figure 21**). La première réponse consiste en la libération de catécholamines des cellules chromaffines situées à la tête des reins (Reid et al. 1998; Braithwaite and Ebbesson 2014) (**Figure 20**). Cette sécrétion de catécholamines déclenchée par transmission neuronale est rapide et permet de faire face aux premières contraintes du stress. L'adrénaline et la noradrénaline vont, par exemple, permettre une augmentation de l'oxygénation du sang (accélération du rythme cardiaque, augmentation de la fréquence respiratoire, etc…) pour faciliter la fuite du poisson face à un prédateur.

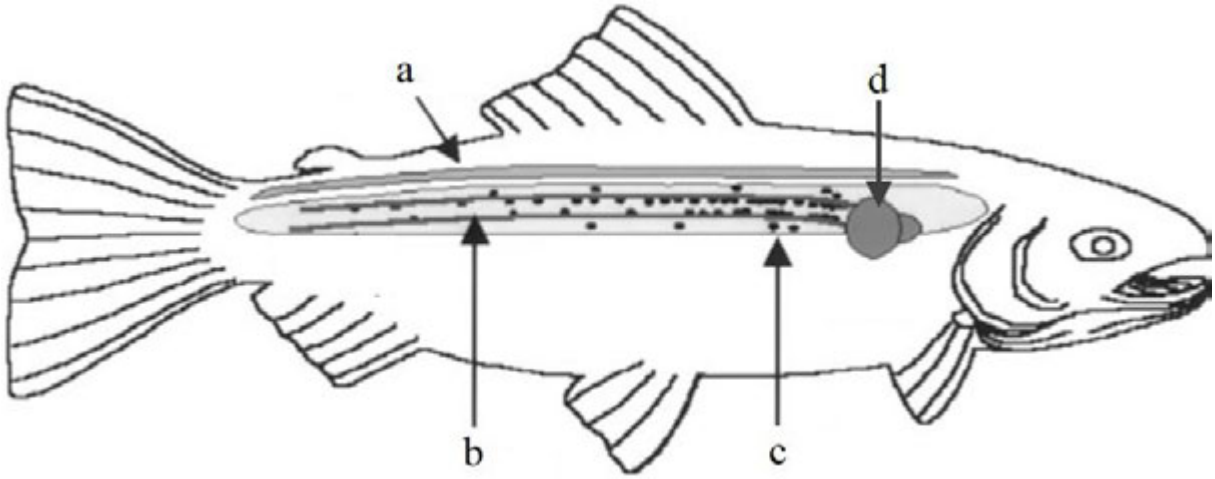

Figure 20 : Schéma de localisation des cellules chromaffines et interrénales chez les téléostéens. a) colonne vertébrale. b) Veine caudale postérieure. c) Cellules chromaffines et interrénales. d) Cœur. Les cellules chromaffines et interrénales sont situées à la tête des reins et contre la paroi de la veine caudale postérieure. (Modifié d'après Reid et al. 1998).

Dans le même temps, la détection d'un événement stressant s'accompagne de la libération de corticolibérine (CRH pour *Corticotropin-Releasing Hormone*) par l'hypothalamus (**Figure 21**). La libération de CRH entraine à son tour la sécrétion d'adrénocorticotrophine (ACTH) par le lobe antérieur de l'hypophyse dans la circulation sanguine. L'augmentation du taux d'ACTH sanguin déclenche ainsi la sécrétion de cortisol par le tissu interrénal. Le cortisol permet ainsi de faire face à l'événement stressant en agissant sur plusieurs organes cibles et déclenchant d'autres réponses physiologiques et comportementales. Notamment, le cortisol induit au niveau du foie une mobilisation des réserves de carbohydrate à la fois en libérant du glucose hépatique dans la circulation sanguine, mais également en augmentant les réserves de glycogène dans le foie par gluconéogenèse (Mommsen et al. 1999; Iwama et al. 2005). Ainsi, une augmentation de cortisol circulant induit tantôt une augmentation du glucose sanguin, tantôt une diminution, voir même une stabilisation. L'augmentation des réserves ou la libération de glucose a pour objectif d'augmenter l'énergie dans l'organisme pour faire face à l'événement stressant (Mommsen et al. 1999; Iwama et al. 2005).

Un rétrocontrôle existe également pour limiter une production trop importante de cortisol (**Figure 21**). En effet, le cortisol agit au niveau de l'hypophyse, bloquant ainsi la production d'ACTH (Mommsen et al. 1999; Braithwaite and Ebbesson 2014). Quelques heures après l'événement stressant, le cortisol revient alors à son niveau basal.

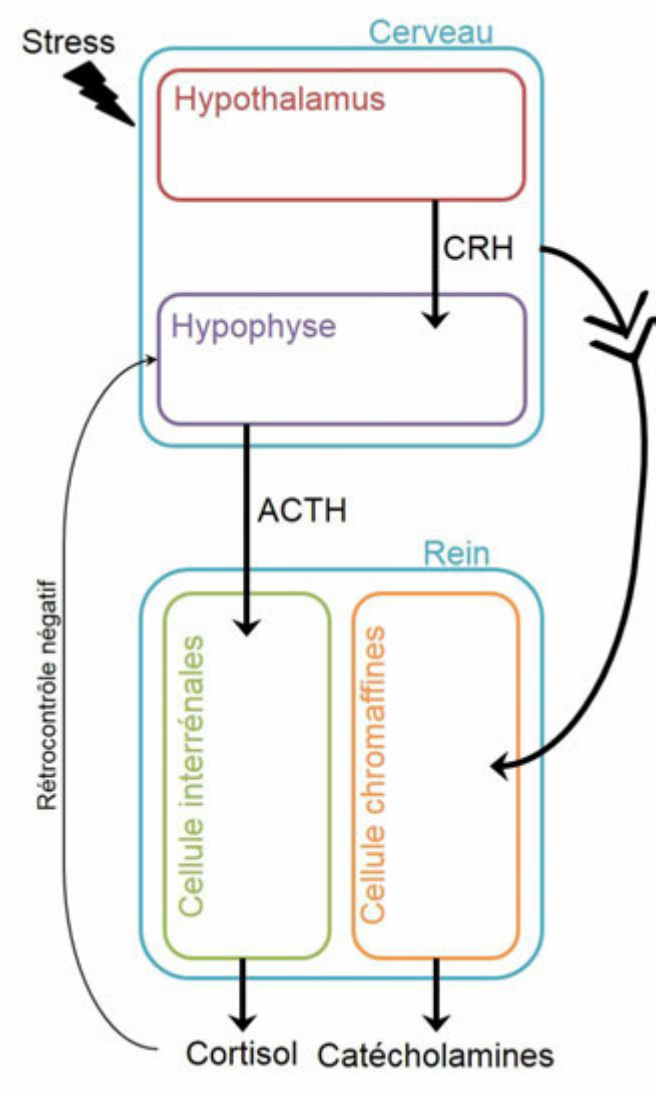

Figure 21 : Schéma de l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Interrénal chez les poissons.

Dans le cas d'un stress répété, la réponse au stress sera différente de la précédente en fonction de plusieurs paramètres modulateurs. Un phénomène de sensibilisation ou d'habituation au stimulus, peut se mettre en place (Groves and Thompson 1970). Ainsi, l'organisme peut répondre plus fortement à un stimulus répété et, à force de répétition, s'y habituer. Il présente donc une réponse moins forte, voir même inexistante. Dans l'étude de Brown et al. (2006), par exemple, des cichlidés répondent plus fortement à une odeur de prédateur quand ils ont été exposés préalablement à cette même odeur à forte concentration, comparé à ceux exposés préalablement à une faible concentration. Il y a donc bien dans cette étude une démonstration de sensibilisation à un stimulus répété. Dans un exemple similaire, l'étude de Kortan et al. (2011) montre que des carpes d'un étang sous forte pression de

prédation présentent le même taux de cortisol que des carpes d'un étang sans prédation. Il y a ici un phénomène d'habituation au stimulus répété qu'est l'attaque d'un prédateur.

C'est dans le cas d'un stress chronique que les conséquences pour l'organisme sont plus néfastes. En effet, la sollicitation continuelle du tissu interrénal pour la production de cortisol induit d'abord un niveau de cortisol plasmatique constamment élevé, puis un retour au niveau basal dû à une sollicitation continue des cellules interrénales. Le stress chronique compromet ainsi la réponse habituelle et empêche la cascade physiologique nécessaire à l'organisme pour faire face à l'événement stressant (Braithwaite and Ebbesson 2014). Ainsi, dans le cas d'un stress chronique, les conséquences néfastes pour l'organisme sont nombreuses : perte de l'appétit, réduction de la croissance, atrophie musculaire, immunosuppression, perturbation de la reproduction, et réduction des capacités cognitives (Barton et al. 1987; Pickering and Pottinger 1989; Van Weerd and Komen 1998; Gregory and Wood 1999; Barcellos et al. 2004).

3. Evénements et facteurs inducteurs de stress en élevage

3.1. Transports et manipulations

Le transport des poissons, les transferts entre unités d'élevage et de manière générale, les manipulations des animaux, sont des événements stressants (Ashley 2007). Dans un premier temps, la contention des poissons, qu'elle soit manuelle, par un filet ou par le passage dans un tuyau, peut être douloureuse pour l'animal et entrainer une perte de mucus et d'écailles. Dans un deuxième temps, ces manipulations sont souvent associées à une mise hors de l'eau plus ou moins longue du poisson. Ces mises hors de l'eau entrainent une hypoxie plus ou moins importante en fonction de leur durée. Ainsi, l'étude de Nomura et al. (2009) montre, par exemple, une augmentation du taux de cortisol chez des saumons Atlantique après un transport en camion. Une augmentation du taux de cortisol est à noter également pour le saumon Atlantique après une mise hors de l'eau de 15 secondes (Fast et al. 2008), ou pour la truite arc-en-ciel enfermée dans une épuisette pendant 3 minutes (Vijayan et al. 1994).

Ces manipulations sont parfois nécessaires pour l'application de certains traitements pharmaceutiques (Burridge et al. 2010). C'est le cas des traitements utilisés contre les poux de mer (i.e. *Lepeophtheirus salmonis*, *Caligus elongatus*, *Caligus rogercresseyi*), des ectoparasites marins de salmonidés (Costello 2006). Les poissons sont alors aspirés de leur

cage pour être traités dans le *well-boat* puis relâchés dans leur cage (Liu and Bjelland 2014). Désormais, il existe également des traitements, comme l'avermectine, directement incorporés dans la nourriture, évitant ainsi ces perturbations (Burridge et al. 2010; Liu and Bjelland 2014). Toutefois, la manipulation de certains individus est nécessaire pour le contrôle de l'évolution de la population de parasite dans l'élevage. En Norvège par exemple, le contrôle s'effectue sur 10 ou 20 poissons, chaque semaine ou tous les 15 jours, et sur la moitié des cages de la ferme. Ces poissons sont maintenus hors de l'eau durant le contrôle et subissent donc un stress aigu.

3.2. Vaccinations

La vaccination des salmonidés s'effectue durant la période d'élevage en eau douce, sur les juvéniles. Les poissons sont vaccinés manuellement à l'aide d'un pistolet à injection (**Figure 22**) ou automatiquement avec des machines plus ou moins perfectionnées. En plus de la manipulation nécessaire de l'animal pour effectuer la vaccination, la piqûre entraîne une douleur pendant plusieurs jours. L'injection intrapéritonéale peut entrainer une péritonite et ainsi déclencher un stress de douleur (Bjørge et al. 2011). Dans cette étude de Bjørge et al. (2011), les saumons Atlantique vaccinés présentent une latence de prise alimentaire plus élevée que les saumons contrôles, jusqu'à 3 jours après l'injection.



Figure 22 : Photographie d'une vaccination par injection intrapéritonéale sur un salmonidés. (Crédit photo : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_trutta/en).

3.3. Densité et interactions sociales

La densité d'élevage à également une influence sur le niveau de stress des salmonidés. La proximité entre les individus peut, en effet, augmenter les contacts entre les animaux et créer ainsi des lésions aux parties les plus proéminentes du corps, comme les nageoires. Turnbull et al. (2005) montrent que le bien-être des saumons Atlantique en cages marines, basé sur le taux de cortisol et les lésions des nageoires, et réduit à partir d'une densité d'élevage de 22 $kg.m^{-3}$. L'étude de Cañon Jones et al. (2011) compare deux densités d'élevage de *parr* de saumon Atlantique (8 $kg.m^{-3}$ et 30 $kg.m^{-3}$) en eau douce. Les auteurs montrent également des lésions des nageoires dorsales plus importantes dans le groupe à forte densité. Toutefois, la croissance et les autres lésions sont meilleures dans ce même groupe comparé au groupe à faible densité. Ce paradoxe s'explique par une autre influence de la densité d'élevage sur les individus : les interactions sociales.

Les salmonidés sont des poissons sociaux avec une hiérarchie simple de type dominant/dominé, basée sur l'accès aux ressources limitées (voir 1.7. Ethologie et Ecologie).

En élevage, même si la nourriture est généralement distribuée jusqu'à satiété des poissons, une compétition existe entre les individus pour l'accès aux zones supérieures du système d'élevage. Cette compétition induit une hiérarchie plus ou moins marquée, les poissons dominants occupent les zones supérieures de la colonne d'eau et sont acteurs d'agressions envers les poissons dominés des zones inférieures (Kadri et al. 1996; Gilmour et al. 2005). Le statut social des salmonidés influence également le niveau de stress des individus. En effet, les poissons dominés sont confrontés à une situation de stress répété, due aux agressions des dominants, se traduisant par un taux de cortisol constamment élevé et les conséquences précédemment décrites : réduction de la croissance, immunosuppression et augmentation de la mortalité (Gilmour et al. 2005). La taille des individus de même âge peut ainsi être considérablement différente suivant leur statut social ; les individus dominants étant plus gros que les individus dominés (Harwood et al. 2003). Cette hiérarchie est d'autant plus marquée que le groupe de poisson est petit (Cañon Jones et al. 2011). Ce phénomène explique le paradoxe selon lequel le bien-être des salmonidés serait meilleur dans des densités d'élevage plus élevés (Cañon Jones et al. 2011) dans une certaine limite (Turnbull et al. 2005).

3.4. Les facteurs environnementaux

L'influence des facteurs abiotiques sur le niveau de stress des poissons est à noter également. La teneur en oxygène dissout dans l'eau peut parfois être inférieure au besoin des salmonidés et engendrer ainsi un stress. Cette situation peut avoir lieu en été avec l'augmentation de la température de l'eau. En élevage contrôlé, les éleveurs peuvent alors supplémenter l'eau en oxygène artificiellement, ou réduire la densité d'élevage en réallotant les poissons. En élevage en cages en mer, la situation est plus difficilement gérable et les salmonidés subissent alors un stress jusqu'au rétablissement de la température de l'eau et de l'apport en oxygène.

Un autre facteur pouvant engendrer un stress est la salinité de l'eau. Celle-ci peut, en effet, baisser temporairement lors de précipitations intenses. Les salmonidés en cages en mer subissent alors un stress osmotique aigu.

La teneur en métaux lourds de l'eau d'élevage peut également engendrer un stress oxydatif chez les poissons. C'est le cas, par exemple, pour le mercure chez le saumon Atlantique (Berntssen et al. 2003).

Parmi les facteurs environnementaux biotiques, les prédateurs peuvent être des inducteurs de stress et engendrer des pertes économiques conséquentes pour les élevages. Au-delà de la consommation directe des poissons, les attaques répétées et les blessures engendrées par les attaques ratées, sont des événements inducteurs de stress. Les oiseaux piscivores en élevage potamodrome de la truite arc-ciel et les phoques en élevage en mer sont des exemples de prédateurs à l'origine de stress et de perte de production. En France, la protection des hérons et des cormorans a eu pour conséquence l'augmentation de la pression de prédation sur les élevages de truite. Les blessures infligées aux truites d'élevage se traduisent par des lésions plus ou moins profondes et une perte des écailles et du mucus (EIFAC 1988) (**Figure 23**). Les élevages de salmonidés en cages en mer connaissent le même problème, au chili par exemple, avec les phoques qui peuvent mordre les poissons à travers le filet (Vilata et al. 2010).

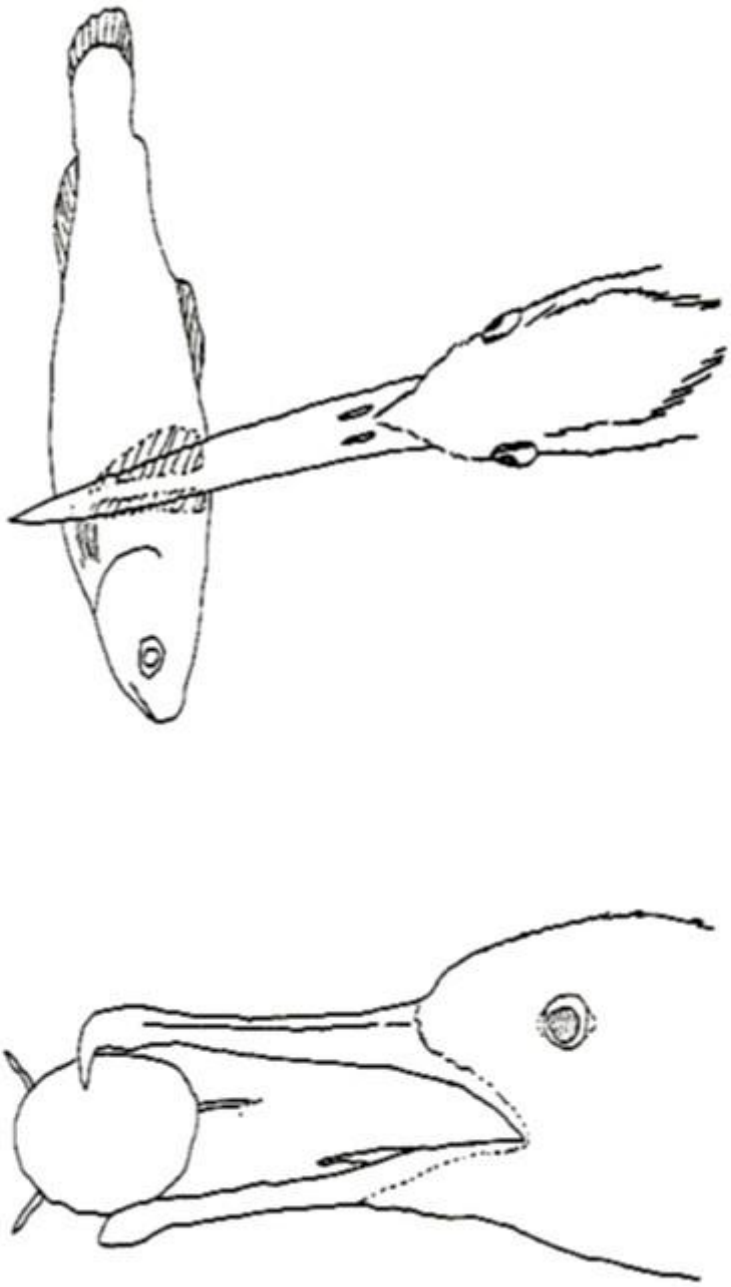

Figure 23 : Dessin illustrant les blessures infligées aux poissons attaqués par le héron cendré (en haut) et le grand cormoran (en bas). La zone rayée sur le poisson, sous le bec du héron, représente la perte d'écaille. (Extrait de Ranson and Beveridge 1983).

3.5. Maladies et parasites

Les maladies sont certainement les facteurs de stress les plus importants. Maladie et parasitisme engendrent un stress chronique associé à des taux de cortisol élevés, un affaiblissement du système immunitaire, une baisse de la croissance, pouvant conduire jusqu'à la mort de l'individu. Plusieurs maladies ont été recensées en élevage du saumon

Atlantique et de la truite-arc-en-ciel (**Tableau 3**). L'occurrence de ces maladies est plus ou moins élevée en fonction du pays producteur.

L'Anémie Infectieuse du saumon par exemple, est surtout présente dans les élevages de l'Atlantique Nord, puis fera son apparition dans les élevages du Chili en 2007. Aujourd'hui, on la retrouve principalement au Canada, en Norvège et au Chili (OIE 2016). Cette maladie se caractérise par des branchies pâles, un foie sombre et des pétéchies recouvrant l'ensemble du tissu adipeux (**Figure 24**).

Une autre maladie commune en élevage de salmonidés est la furonculose qui provoque une septicémie hémorragique (bactérienne ici, différente de la SHV par *Rhabdovirus*) (Vigneulle 1986). La répartition de cette maladie est mondiale et affecte aussi bien les élevages en eau douce qu'en eau de mer. Les symptômes visibles de la furonculose sont une inflammation de l'intestin, des nageoires sanguinolentes et des lésions recouvrant le corps du poisson (FAO 2016c) (**Figure 25**).

La Piscirickettsiose est une autre maladie commune en élevage de saumon Atlantique. Les saumons infectés ont le corps de couleur sombre, un abdomen enflé et nagent en surface de l'eau. A l'autopsie, des points blancs sont visible sur le foie (**Figure 26**).

Un autre exemple de la maladie commune aux élevages de saumon est l'amibiase. Il s'agit d'une amibe se développant sur les branchies du saumon et réduisant à terme les capacités respiratoires de l'animal (**Figure 27**). Cette maladie était jusqu'à maintenant exclusivement présente dans les élevages d'Australie, en Tasmanie. Aujourd'hui l'amibiase se retrouve également dans les élevages norvégiens et chiliens (Steinum et al. 2008; Bustos et al. 2011).

Tableau 3 : Liste des maladies et parasites recensés en élevage de saumon Atlantique et truite arc-en-ciel. (D'après FAO 2016a et FAO 2016b).

Maladie	Agent	Type	Espèce touchée
Anémie Infectieuse du Saumon (AIS)	*Orthomyxovirus*	Virus	Saumon
Septicémie Hémorragique Virale (SHV)	*Rhabdovirus*	Virus	Saumon & truite
Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI)	*Birnavirus*	Virus	Saumon & truite
Maladie Pancréatique Virale du Saumon (MPVS)	*Togavirus*	Virus	Saumon
Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (NHI)	*Novirhabdovirus*	Virus	Truite
Furonculose	*Aeromonas sp.*	Bactérie	Saumon & truite
Vibriose	*Vibrio anguillarum*	Bactérie	Truite
Rénibactériose	*Renibacterium salmoninarum*	Bactérie	Saumon
Maladie des ulcères hivernaux	*Moritella viscose*	Bactérie	Saumon
Yersiniose ou maladie de la bouche rouge (ERM)	*Yersinia ruckeri*	Bactérie	Saumon
Piscirickettsiose	*Piscirickettsia salmonis*	Bactérie	Saumon
Maladie Bactérienne de Rein (MBR)	*Corynebacterium*	Bactérie	Truite
Maladie Bactérienne de Branchie (MBM)	*Myxobacterium*	Bactérie	Truite
Saprolegniase	*Saprolegnia*	Champignon	Saumon & Truite
Maladie du tourni	*Myxosoma cerebralis*	Protozoaire	Truite
Hexamitase de la truite	*Hexamita truttae*	Protozoaire	Truite
Costiase	*Costia necatrix*	Protozoaire	Truite
Tache blanche	*Ichthyophthirius multifilis*	Protozoaire	Truite
Gyrodactylose	*Gyrodactylus sp.*	Trématode	Truite
Pou marin	*Lepeophtheirus salmonis ; Caligus sp.*	Ectoparasite	Saumon & Truite
Amibiase de branchie	*Paramoeba pemaquidensis*	Ectoparasite	Saumon
Protozoaire d'eau douce	*Ichthyobodo; Trichodina; Ichthyophthirius*	Ectoparasite	Saumon
Vers solitaire	*Eubothrium; Diphillobothrium*	Endoparasite	Saumon

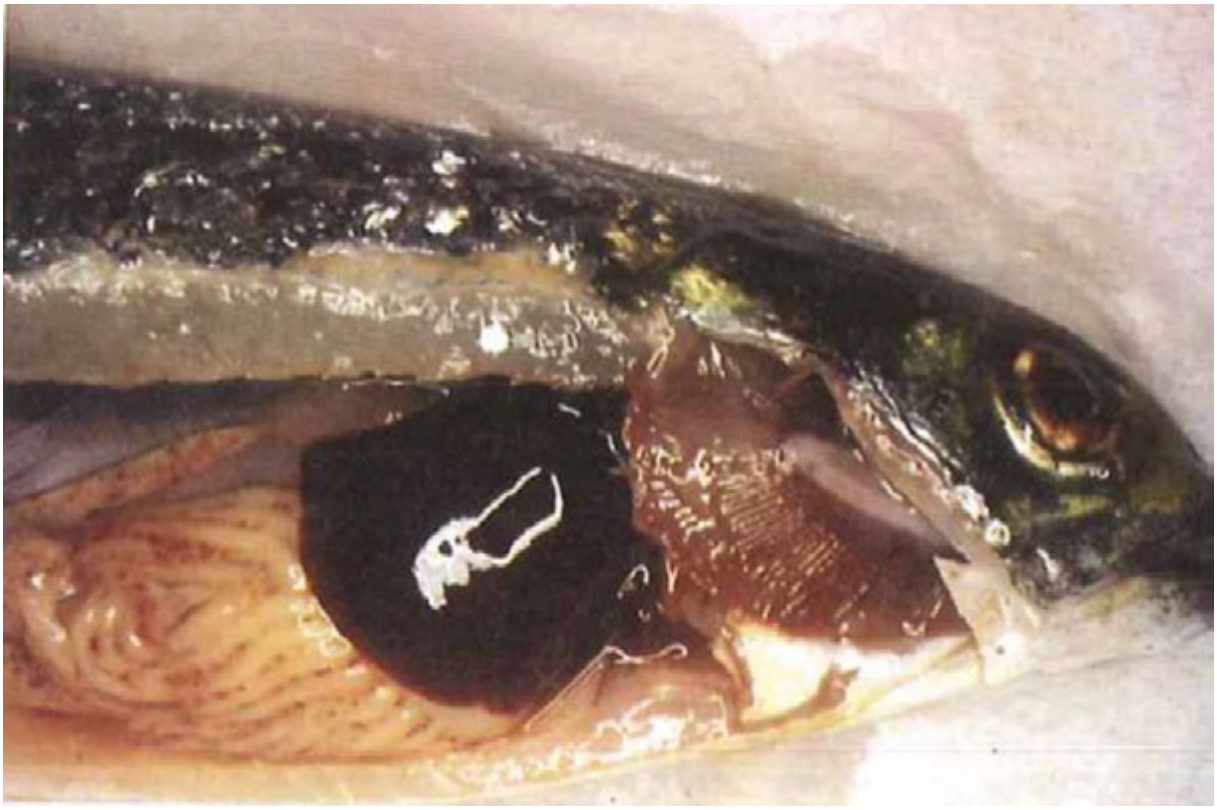

Figure 24 : Photographie d'un saumon Atlantique atteint d'Anémie Infectieuse du Saumon. Les branchies sont pâles, le foie est sombre et des pétéchies recouvrent le tissu adipeux viscéral. (Extrait de Noga 2010).



Figure 25 : Photographie d'un saumon Atlantique atteint de furonculose. Les ulcères typiques de la maladie recouvrent le corps du poisson. (Extrait de Noga 2010).

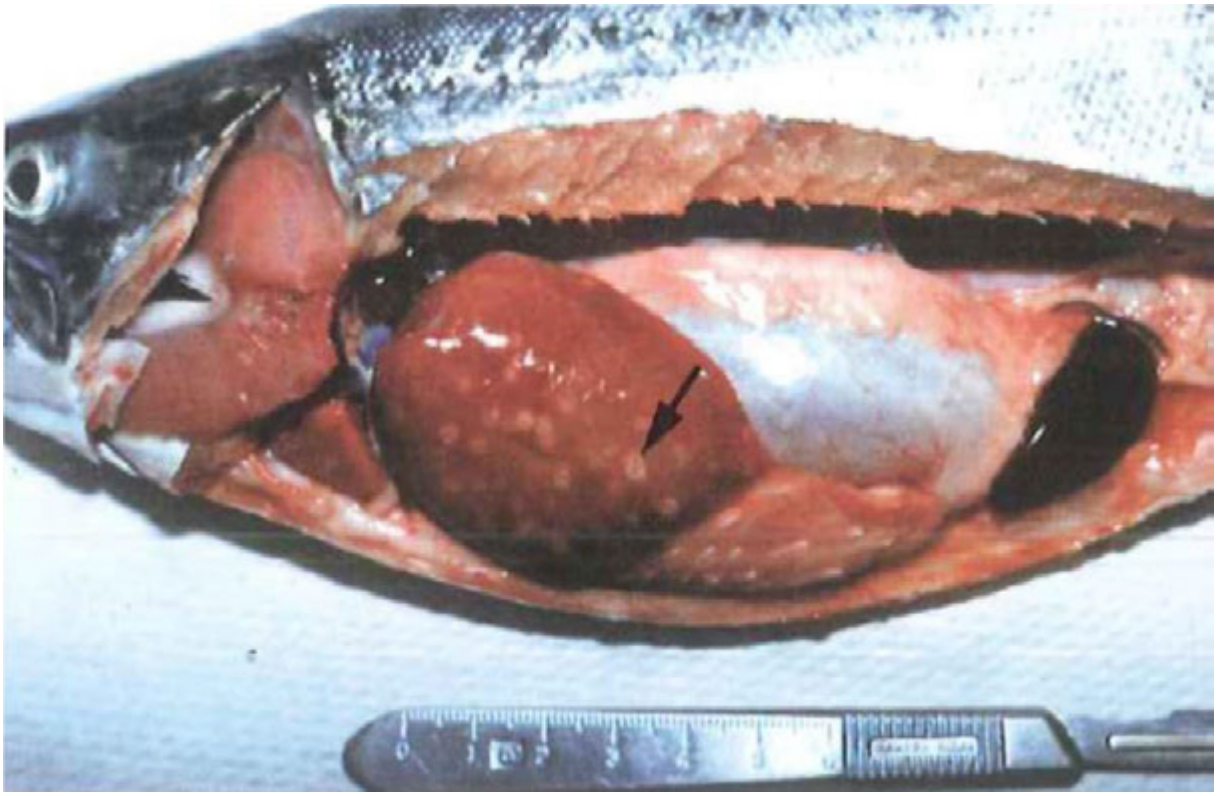

Figure 26 : Photographie d'un saumon Atlantique atteint de Piscirickettsiose. La flèche noire pointe les points blancs sur le foie, caractéristiques de la maladie. (Extrait de Noga 2010).

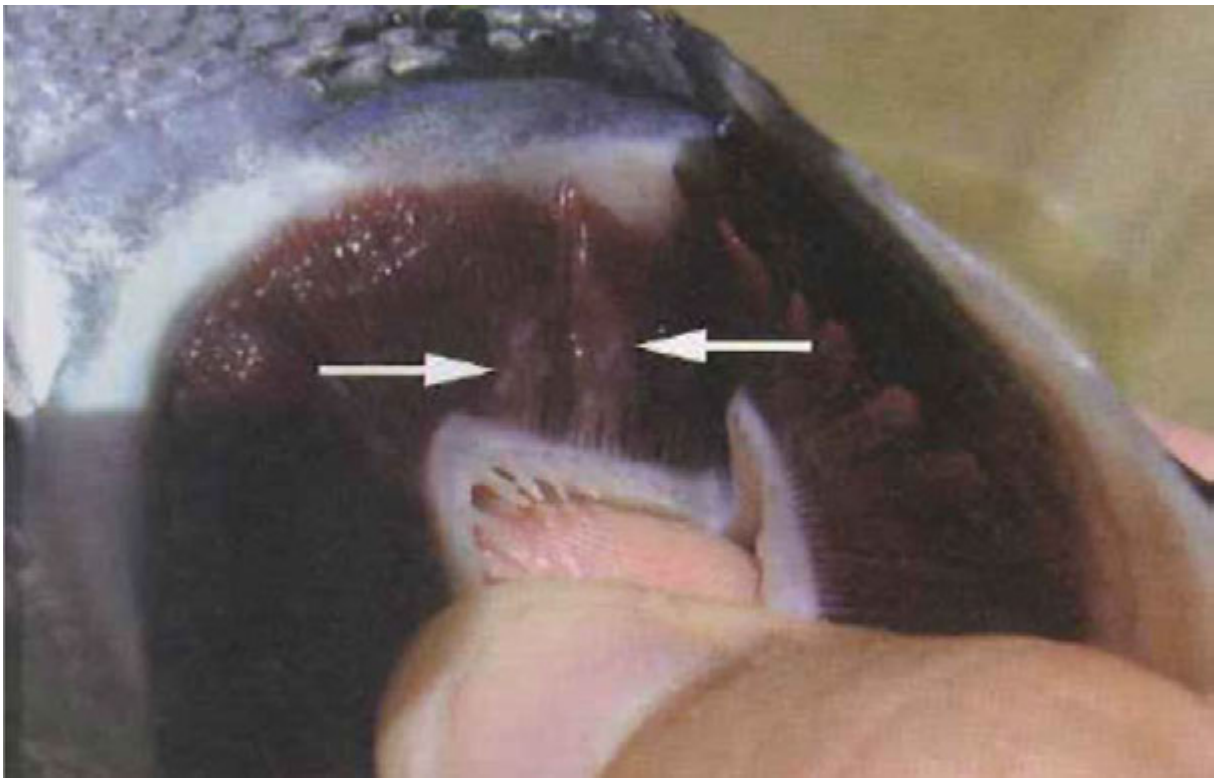

Figure 27 : Photographie d'un saumon Atlantique présentant une amibiase. Les flèches blanches pointent le tissu amibien qui se développe sur les branchies. (Extrait de Noga 2010).

Aujourd'hui, le problème majeur dans les élevages de salmonidés et surtout de saumon Atlantique, concerne les poux de mer. Les poux de mer sont des ectoparasites obligatoires du sous-embranchement *Crustacea* et de la famille *Caligidae*. En élevage du saumon Atlantique et de la truite arc-en-ciel on dénombre principalement 3 espèces : *Lepeophtheirus salmonis* (**Figure 28**), *Caligus elongatus*, et *Caligus rogercresseyi*. Ces parasites s'attachent sur le salmonidé pour se nourrir de son mucus et de sa peau, créant ainsi des lésions sur le corps du poisson (**Figure 29** et **Figure 30**). Les pertes économiques induites par ces parasites sont de l'ordre de plusieurs millions d'euros chaque année dans l'industrie du saumon (Johnson et al. 2004; Costello 2009; Liu and Bjelland 2014). Ces parasites sont des inducteurs de stress chez les saumons infestés, se traduisant en élevage par une diminution de la croissance, et une augmentation de la morbidité et de la mortalité (Pike and Wadsworth 1999).



Figure 28 : Photographie de *Lepeophtheirus salmonis* adultes mâles et femelles. Les femelles présentent de longs tubes ovigères dans lesquels se trouvent les œufs. (Extrait de Noga 2010).



Figure 29 : Photographie d'un smolt de saumon Atlantique infesté par le pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*. Les flèches noires pointent deux poux du saumon pré-adultes se nourrissant de mucus et de sang. Le tube digestif rouge des poux du saumon se voit par transparence. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).



Figure 30 : Photographie de lésions sur un smolt de saumon Atlantique infesté par le pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*. Les lésions se localisent généralement au niveau de la tête des poissons infestés. La flèche noire pointe un pou du saumon pré-adulte mâle. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

3.6. L'Abattage

En plus du transport et des manipulations nécessaires entre les cages en mer et l'unité d'abattage, les poissons peuvent subir un stress lors de la mise à mort. Les poissons sont généralement abasourdis par un choc électrique ou un coup de bâton sur la boite crânienne. Les veines branchiales des poissons étourdis sont coupées afin de confirmer la mort, puis, les poissons sont plongés dans un bain d'eau glacée pour accélérer l'exsanguination. Une manipulation trop invasive des poissons avant l'abattage ou un étourdissement mal effectué, peuvent engendrer un stress qui se répercute sur la qualité de la viande. Pour limiter ces problèmes, les poissons peuvent être abattus directement sur le côté de leur cage, sur des bateaux spécialisés. En élevage potamodrome de la truite arc-en-ciel, les poissons sont destinés à la pêche de loisir ou au repeuplement de rivière ou plan d'eau et ne sont donc pas abattus. En revanche, les truites destinées à la consommation humaine sont abattues de la même manière que les salmonidés de mer, par électrocution ou assommement, puis exsanguination.

4. Conséquences sur la production

Les conséquences du stress sur la production du saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel sont nombreuses et importantes. D'un point de vue sanitaire, les stress répétés et chroniques engendrent une baisse de l'immunité (Pickering and Pottinger 1989). Cette baisse de l'immunité se caractérise par une réduction du pourcentage de lymphocyte et, de manière générale, de l'expression des gènes codant pour les fonctions immunitaires (Espelid et al. 1996; Fast et al. 2008; Tadiso et al. 2011). La réduction d'immunoglobuline (Ig) dans l'organisme et plus particulièrement dans le mucus du poisson favorise alors les infections par les maladies. La conséquence de cette baisse de l'immunité sur le succès de la vaccination est à étudier. En effet, la vaccination engendrant un stress de douleur pour le poisson, peut avoir comme conséquence une baisse de l'activité immunitaire et donc réduire le succès de la vaccination. L'étude de Nordgreen et al. (2013) montre par exemple que l'efficacité de la vaccination est améliorée quand les saumons Atlantique sont traités avec de la morphine.

D'un point de vue comportemental, le stress diminue le comportement alimentaire et, plus généralement, l'activité locomotrice des poissons. Cette conséquence comportementale participe à la réduction de la croissance observée chez les poissons stressés. La baisse de la

croissance des poissons stressés est expliquée dans la littérature scientifique d'une part par cette réduction de la prise alimentaire et d'autre part, par la perte de l'appétit. Cette perte de l'appétit est supposée être la conséquence de l'augmentation du taux de glucose dans le sang après un événement stressant. Une diminution de l'activité métabolique engendre également une plus faible assimilation de la nourriture, et donc un indice de consommation plus élevé (McCormick et al. 1998; Gregory and Wood 1999; Basrur et al. 2010).

Les conséquences du stress sur la qualité de la viande de saumon et truite sont également importantes. Ainsi, l'étude de Sigholt et al. (1997) montre par exemple qu'un stress de manipulation juste avant l'abattage de saumon Atlantique entraine une rigidité cadavérique plus rapide, une texture de la viande moins ferme, et une odeur plus âcre. D'autres études montrent également l'effet du stress sur une diminution du pH de la viande et un changement de couleur (Erikson and Misimi 2008a). Ces conséquences sont expliquées notamment par la production d'acide lactique dans les muscles du poisson stressé avant l'abattage, augmentant alors le pH et accélérant la rigidité cadavérique (Poli et al. 2005).

OBJECTIFS DE THESE

Les conséquences du stress en élevage des salmonidés sont négatives, à la fois sur le bien-être des animaux mais aussi sur la production générale. En effet, nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, le stress influe sur les paramètres physiologiques (cortisol, système immunitaire, morbidité, mortalité, etc…) et zootechniques telles que la croissance et la qualité de la chair (couleur, odeur, texture, acidité, etc…).

Les objectifs de cette thèse étaient d'améliorer les connaissances sur le stress chez les salmonidés d'élevage et de proposer des solutions pour lutter contre ces événements inducteurs de stress. Plusieurs événements inducteurs de stress ont été étudiés dans ce travail.

Tout d'abord, je me suis intéressé aux conséquences de la prédation répétée sur le niveau de stress des poissons attaqués. En effet, depuis la parution des lois de protection des oiseaux piscivores (hérons, cormorans), les éleveurs déplorent une mortalité de plus en plus importante dans les élevages de truite arc-en-ciel en eau douce. Ce premier objectif était de savoir si cette mortalité n'est que la conséquence de la consommation directe des poissons (blessures, mise à mort directe, capture), ou si ces poissons succombaient plus tard sous l'effet des troubles induits par le stress.

Je me suis ensuite intéressé à un deuxième événement inducteur de stress et commun en conditions d'élevage : le changement d'environnement, une situation très courante dans la vie des poissons d'élevage, qui sont changés de bassin ou même de ferme d'élevage. En recréant cet événement en conditions contrôlées, j'ai étudié et proposé une méthode afin d'évaluer le bien-être de truites arc-en-ciel par la mesure et le recoupement de plusieurs paramètres physiologiques et zootechniques.

En deuxième partie de ces objectifs, je me suis intéressé à l'un des problèmes les plus important actuellement en élevage des salmonidés : l'infestation par le parasite *Lepeophtheirus salmonis*. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, le pou du saumon est un ectoparasite responsable de pertes économiques importantes. Afin d'améliorer les connaissances sur ce parasite, l'influence du stress sur le processus d'infestation a été étudiée. En effet, si les effets du parasite sur le niveau de stress des saumons infestés sont bien connus, l'influence d'un état de stress préalable à la rencontre avec le parasite, sur la sélection de l'hôte par ce dernier, n'a jamais été précisément décrite. Afin de pouvoir étudier ces interactions complexes, nous avons d'abord dû développer un test d'infestation en laboratoire. Je me suis ensuite intéressé aux conséquences du stress aigu puis du stress chronique sur cette interaction.

L'objectif le plus important de cette thèse était certainement de proposer des solutions pour lutter contre ces événements inducteurs de stress. Les moyens de lutte contre le parasite *L. salmonis* sont aujourd'hui pratiquement inefficaces, en raison du développement de mécanismes de résistance aux différents produits utilisés. Une méthode de lutte contre le parasite *L. salmonis* a donc été étudiée dans cette thèse. Cette méthode, basée sur la sémiochimie, permet d'inhiber le comportement d'attachement du parasite sur le saumon.

Afin de clarifier le mécanisme d'action de ce sémiochimique, nous avons développé une procédure permettant d'altérer le système olfactif du saumon pour préciser si l'effet observé résulte soit d'une action directe sur le copépodite de *L. salmonis* (stade infestant du parasite), soit au contraire d'une action directe sur le saumon, en modifiant certaines de ses caractéristiques promotrices de l'attachement du parasite. Si le sémiochimique agit sur le parasite, on ne devrait observer aucune différence entre les poissons témoins et les hyposmiques lors du test d'infestation. En revanche, si le sémiochimique agit sur le poisson, l'hyposmie ne devrait pas engendrer d'altération du comportement d'attachement du parasite. Les résultats de cette étude permettraient de déterminer si le sémiochimique que nous avons utilisé est un allélochimique (communication interspécifique) ou une phéromone (communication intraspécifique), mais aussi de préciser les modalités d'utilisation de ce produit, qu'il faudra appliquer sur le poisson dans le premier cas, ou au contraire diffuser dans l'eau dans le second cas.

PARTIE II : Résultats

Chapitre 1 : Stress des salmonidés d'élevage

1. Présentation de l'étude n°1

Il existe plusieurs événements inducteurs de stress en élevage des salmonidés (Ashley 2007). Parmi ceux-là, la prédation semble être un problème récurrent dénoncé par les éleveurs. Par exemple, en élevage de la truite arc-en-ciel en eau douce, les éleveurs rapportent des pourcentages de mortalité très élevés à cause de la prédation par les oiseaux piscivores (héron, cormoran, mouette, etc…) (EIFAC 1988). Toutefois, les causes de cette mortalité ne sont pas tout à fait connues. En effet, au-delà de la consommation directe de poissons par les oiseaux, le rôle du stress engendré par les attaques n'est pas à négliger. Les conséquences d'une attaque de prédateur sur le niveau de stress des salmonidés ont déjà été étudiées. Les poissons attaqués présentent un rythme cardiaque plus élevé juste après l'attaque et expriment des comportements de fuite (Johnsson et al. 2001). D'autres études ont montré une augmentation du comportement de mise à l'abri, du comportement de *freezing*, de la latence de prise alimentaire, et une diminution du comportement de *foraging* chez des salmonidés exposés à un prédateur (Brown and Smith 1998; Ylönen et al. 2007). Malgré cela, les conséquences d'attaques répétés sur le niveau de stress de salmonidés ne sont pas connues.

Cette première étude a donc pour but d'évaluer les conséquences d'attaques répétées d'un oiseau piscivore sur le niveau de stress de la truite arc-en-ciel. Pour ce faire, nous avons comparé deux groupes de truites d'élevage provenant d'une ferme subissant des attaques répétées par le héron cendré, le grand cormoran et la mouette, et déplorant une mortalité élevée. Ces deux groupes de 12 poissons ont été maintenus en laboratoire dans 4 tanks expérimentaux adaptés (2 tanks par groupe, 6 poissons par tank) (**Figure 31**). Le premier groupe subit une attaque simulée par un héron en plastique (méthode d'après Johnsson et al. 2001; Thomson et al. 2012) et le deuxième groupe témoin n'est pas attaqué. La concentration totale de cortisol plasmatique et l'index hépatosomatique ont été mesuré à 0, 1 et 3h après la simulation de l'attaque sur 2 poissons par tank et par temps (**Figure 31**).

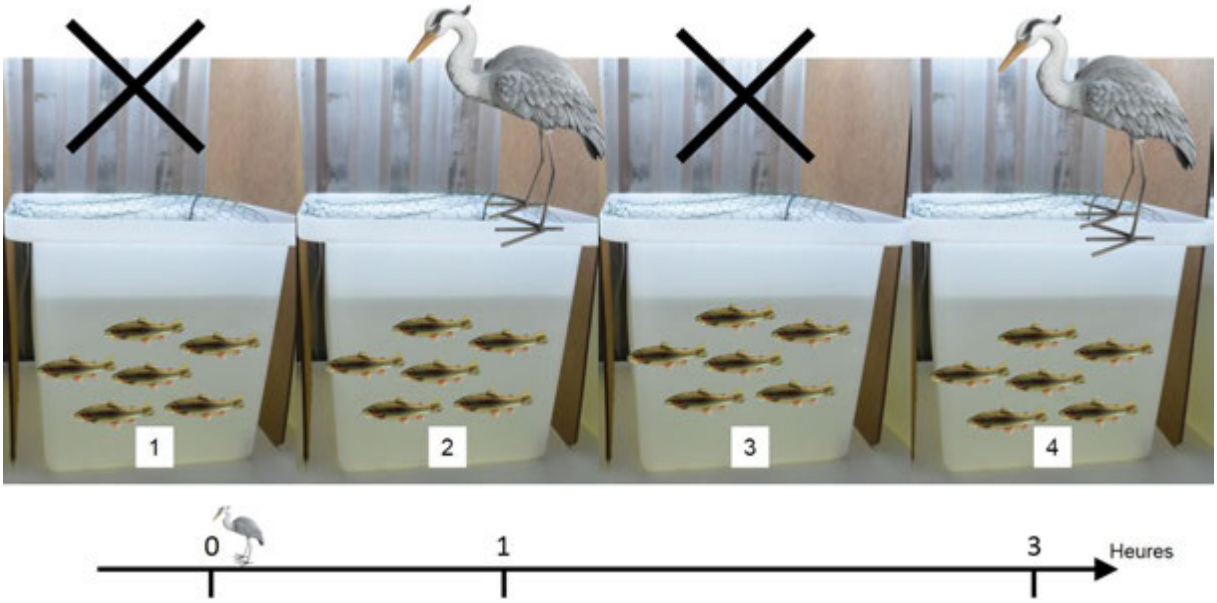

Figure 31 : Schématisation de l'étude n°1. A chaque temps de prélèvement, 2 truites par tank sont sorties de l'essai pour calculer le taux de cortisol plasmatique et l'index hépatosomatique. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

Pour la concentration totale en cortisol plasmatique et l'index hépatosomatique, aucune différence n'a été démontré entre les deux groupes et entre les différents temps.

2. Etude n°1

Présentation poster en congrès international à comité de lecture :

Delfosse C, Chabaud C, Lafont-Lecuelle C, Bienboire-Frosini C, Pageat P. 2014. **Physiological response to repeated predation by piscivorous birds in Rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*).** *The Annual Congress of the European College of Animal Welfare and Behavioural Medicine (ECAWBM)*. Apt, France.

Poster presentation IRSEA Congress 2014
Section - Animal Welfare and Ethics
Category - Research papers

Physiological response to repeated predation by piscivorous birds in Rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*)

C Delfosse, C Chabaud, C Lafont-Lecuelle, C Bienboire-Frosini, P Pageat

IRSEA Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Le Rieu Neuf, 84490 Saint-Saturnin-Lès-Apt, France
Corresponding author: c.delfosse@group-irsea.com

Farmed salmonids are subjected to numerous externals stress factors, such as predation by piscivorous birds. Following a single predator attack, fish display anti-predator behaviours and physiological stress such as an increase in heart beat rate. Despite this clear evidence, there is a lack of knowledge regarding the influence of repeated predation on physiological stress levels in the rainbow trout.

In the present study, *O. mykiss* experiencing high repeated predation by piscivorous birds (Herons, cormorants and seagulls) on an inland aquafarm were divided into two groups. The experimental group (n=2) was subjected to a predator attack simulated by a plastic heron and was compared to a control group (n=2) without predation risk. The plasmatic cortisol level and the hepatosomatic index were calculated before, 1h and 3h after the simulated attack.

There were no significant differences between the attacked and control groups in either plasmatic cortisol levels or hepatosomatic index scores prior to and following the simulated attack. Data of plasmatic cortisol rate (range from 31.47±22.39 to 66.32±17.43 $ng.ml^{-1}$) and the hepatosomatic index (range from 1.05±0.12 to 1.50±0.20) can be considered as low, reflecting an unstressed state of trouts.

Previous publications and our preliminary results suggest the presence of a habituation process regarding repeated predator attacks in salmonids. This adaptive phenomenon allows fish to cope with the predation pressure without consequences to their vital functions, such as growth and reproduction. Beyond the direct consequences of mortality and injury, predation in aquaculture does not seem to have any additional repercussions on salmonid development.

3. Conclusion de l'étude n°1

L'étude montre ici aucune différence significative entre les truites ayant subi une attaque de prédateur et les truites témoins. Ces truites provenant d'une ferme subissant les attaques répétées par les oiseaux piscivores, les résultats montrent ici une habituation au stress. Les taux de cortisol et les index hépatosomatiques mesurés sur les truites testées peuvent être considérés à un niveau basal. Il ne semble donc plus y avoir de réponse physiologique chez les truites prédatées à répétition. Ces résultats sont en accord avec une étude ayant démontré des effets similaires chez la carpe en étang. Le taux de cortisol plasmatique n'est pas significativement différent entre les carpes d'un étang sous prédation et celles d'un étang protégé des oiseaux piscivores. Ce phénomène d'habituation au stress permet à l'organisme de contrer les effets négatifs du cortisol, tout en maintenant une réponse comportementale adaptée : la fuite.

D'après cette étude, la mortalité des poissons enregistrée par les éleveurs déplorant des attaques répétées d'oiseaux piscivores, ne serait que la conséquence de la consommation directe des poissons et non pas une conséquence du stress engendré par les attaques. Il serait intéressant de développer cette étude pilote avec un plus grand nombre de sujets testés et avec d'autres prédateurs (grand brochet en élevage en rivière, phoques en élevage marin, etc…).

Si les conséquences du stress des salmonidés d'élevage sont désastreuses pour l'économie de la production, le bien-être des animaux est tout aussi important. C'est à partir d'une autre situation inductrice de stress que nous avons étudié la question.

4. Présentation de l'étude n°2

Depuis plusieurs décennies maintenant, le bien-être des animaux d'élevage est un critère primordial résultant d'une demande des consommateurs et rendu possible grâce aux avancées de la recherche scientifique dans ce domaine. L'aquaculture, s'étant développée de manière intensive ces dernières années, n'échappe pas à cette règle (Ashley 2007; Kupsala et al. 2013; Huntingford and Kadri 2014). Les paramètres de stress sont souvent utilisés dans la mesure du bien-être des animaux. Ainsi, ils permettent de desceller un bien-être amoindri ou même un mal-être. L'évaluation du bien-être des animaux est complexe et nécessite souvent la mesure de plusieurs paramètres. Le recoupement de ces différents paramètres physiologiques,

comportementaux et zootechniques permet une meilleure interprétation de l'état de bien-être de l'animal.

Il existe plusieurs situations en salmoniculture dans lesquelles le bien-être des poissons est dégradé (Ashley 2007). L'une de ces situations concerne le transfert des poissons entre les différents systèmes d'élevage (bassin, *raceways*, cage, eau douce, eau salée, etc…). Ces transferts impliquent un changement des conditions environnementales pour des poissons qui doivent s'adapter à leur nouveau milieu. La mesure de paramètres physiologiques et zootechniques connus comme étant corrélés au niveau de stress des poissons (Cortisol, glucose, catécholamines, croissance, indice de consommation, lésions, etc…), peut aider à l'évaluation de leur bien-être. Ainsi, le but de cette étude est de décrire les profils physiologiques et zootechniques de truites arc-en-ciel d'élevage durant leur processus d'adaptation à un nouvel environnement, avec comme objectif de déterminer les paramètres les plus pertinents pour évaluer leur bien-être.

A partir d'une population de truite-arc-en-ciel d'élevage, sept groupes homogènes pour le poids de six poissons sont formés et logés dans sept tanks de 60L (**Figure 32**). En ferme, les truites sont maintenues dans des conditions environnementales proches des conditions naturelles, à savoir dans des *raceways* alimentés par une rivière (de très haute qualité abritant naturellement plusieurs espèces de salmonidés : La Sorgue, L'Isle-sur-la-Sorgue, France). En laboratoire, les truites sont d'abord maintenues durant 5 jours dans un unique tank de 400L en circuit fermé puis dans les 7 tanks expérimentaux (eau minérale Volvic© filtrée et oxygénée). Les truites sont maintenues durant 10 jours dans ces tanks expérimentaux (T_0 à T_{10}). Les paramètres de stress mesurés pour chaque groupe sont le cortisol (mesuré à T_{10}) (**Figure 33**), l'index hépatosomatique ($100 \times \frac{masse\ foie\ (g)}{masse\ truite\ (g)}$, mesuré à T_{10}), la croissance ($masse\ truite\ T_{10} - masse\ truite\ T_0$), la consommation alimentaire (mesurée chaque jour entre T_0 et T_{10}) et l'indice de consommation ($\frac{Croissance\ (g)}{consommation\ alimentaire\ totale\ (g)}$). Une analyse multivariée (Analyse en Composantes Principales) est alors effectuée pour dessiner le profil physiologique et zootechnique de notre échantillon de population, et ainsi déterminer les corrélations entre ces paramètres.

D'après le cercle des corrélations obtenu, cortisol, croissance, prise alimentaire et indice de consommation sont fortement corrélés entre eux. L'index hépatosomatique n'est corrélé à aucun de ces paramètres.



Figure 32 : Photographie des tanks expérimentaux utilisés dans l'étude n°2. Chaque tank, contenant 6 truites arc-en-ciel, est rempli d'eau minérale (Volvic®) continuellement filtrée et oxygénée. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

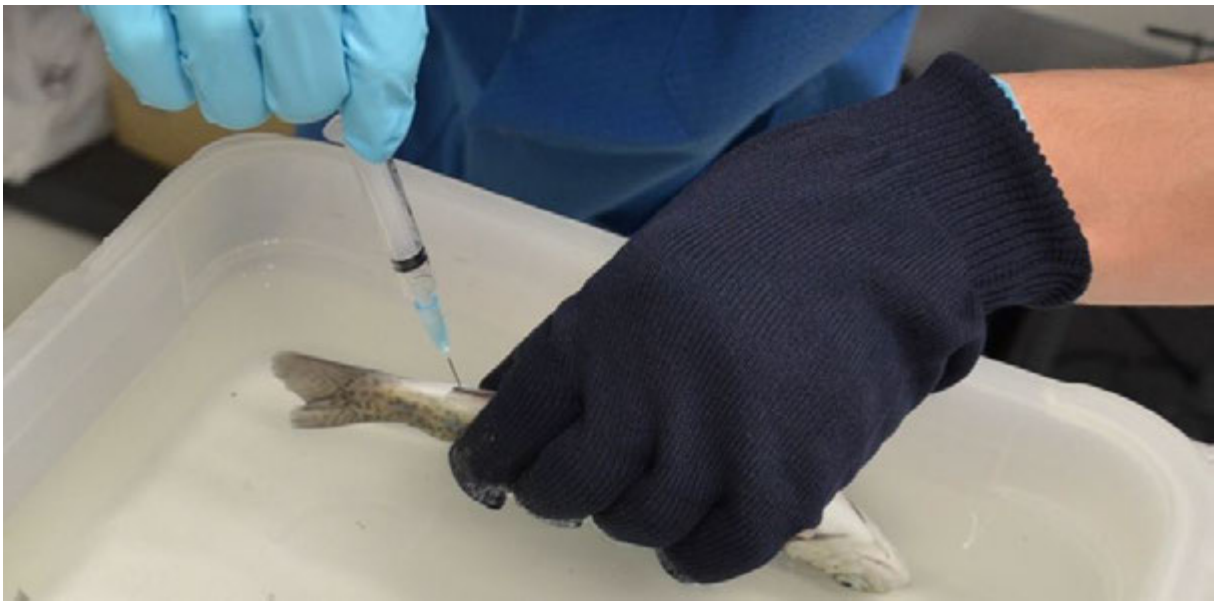

Figure 33 : Photographie d'une prise de sang sur une truite arc-en-ciel. La prise de sang est effectuée dans la veine caudale du poisson. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

5. Etude n°2

Article publié :

Delfosse C, Bienboire-Frosini C, Chabaud C, Lafont-Lecuelle C, Cozzi A, Pageat P. 2016. **Using physiological and zootechnical profiles to evaluate welfare in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under stressful conditions.** *Aquaculture International*, 24(5), 1449-1457.

Author's personal copy

Aquacult Int
DOI 10.1007/s10499-016-0004-2

Using physiological and zootechnical profiles to evaluate welfare in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under stressful conditions

Cyril Delfosse[1] · Cécile Bienboire-Frosini[1] · Camille Chabaud[1] · Céline Lafont-Lecuelle[1] · Alessandro Cozzi[1] · Patrick Pageat[1]

Received: 28 August 2015 / Accepted: 9 April 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract The welfare of farmed animals, and more recently of farmed fish, is a growing concern in current society. Changes in living conditions represent one of the most stressful situations in fish production. It is crucial to develop tools to evaluate welfare in farmed fish throughout the various situations observed during the production cycle. The present work aims to select relevant parameters in order to evaluate the welfare of trout, by describing the physiological and zootechnical profiles of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) populations during adaptation to a new environment. Ten days after transferring seven groups of farmed trout to a laboratory setting, a principal component analysis was performed on five parameters: plasma cortisol level (PCL), hepatosomatic index (HI), growth (G), food intake (FI) and food conversion ratio (FCR). PCL and FCR were positively correlated and were both negatively correlated with FI and G. FI and G were positively correlated. HI was not correlated with any other parameter. PCL was considered as being at basal levels. Descriptive statistics and the principal component analysis suggest measuring PCL, G, FI and FCR to be a relevant strategy for evaluating the welfare of trout when adapting to a new environment. The study demonstrates the relevance of this approach in evaluating specific profiles related to the welfare of farmed animals.

Keywords Animal welfare · Cortisol level · Growth performances · Principal component analysis · Rainbow trout

Abbreviations

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FI	Food intake
FCR	Food conversion ratio
G	Growth

✉ Cyril Delfosse
c.delfosse@group-irsea.com

[1] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology (IRSEA), Route du Chêne, Quartier Salignan, 84400 Apt, France

Published online: 16 April 2016

Author's personal copy

HI	Hepatosomatic index
PCA	Principal component analysis
PCL	Plasmatic cortisol level

Introduction

Modern society has become increasingly concerned about welfare issues in farmed animals, and aquaculture is no exception to the rule (Ashley 2007; Kupsala et al. 2013; Braithwaite and Ebbesson 2014; Huntingford and Kadri 2014). Evaluating the welfare of farmed animals has proved difficult (Broom and Johnson 1993; Broom 2007; Ashley 2007; Mormède et al. 2007), but many authors have agreed upon a common strategy, which consists of studying several parameters to evaluate animal welfare (Broom and Fraser 2007; Mormède et al. 2007; Broom 2008; Vannier et al. 2014). These parameters include physiology, behaviour and the zootechnical performance. While studying behaviour in aquaculture is both time-consuming and technically difficult to implement, physiological and zootechnical parameters are easy to sample and often already measured by farmers during the production cycle (Ashley 2007). Moreover, physiological and zootechnical parameters are interrelated, particularly when it comes to the metabolic chain involved in the stress response (Mormède et al. 2007; Martinez-Porchas et al. 2009). Farmed salmonids are subjected to several stressful situations during the production cycle (Ashley 2007), including changes in living conditions. Changes in rearing units are required in order to maintain appropriate stocking density during fish growth (FAO 2004–2016, 2005–2016; IFREMER 2006). The issues raised here also spill over into research environments when fish are either moved from other captive housing or caught and brought into captivity from the wild, because transferring fish to new facilities or from wild conditions to experiment tanks in the laboratory for scientific research represents another potential source of stress (Jenkins et al. 2014). All forms of transfer from one environment to another can be considered as stressful situations that may compromise fish welfare.

One of the primary ways fish respond to acute stress is through the release of cortisol by the interrenal cells in the circulatory system (Mommsen et al. 1999). This glucocorticoid hormone triggers neoglucogenesis, resulting in the release of glucose from the liver (Mommsen et al. 1999). The increase in free energy in the organism allows the fish to cope with the stressful event (Iwama et al. 2005). Permanently high cortisol levels can induce several metabolic impairments, such as a decrease in growth performance (Barton et al. 1987; McCormick et al. 1998; Gregory and Wood 1999; Fevolden et al. 2002; Basrur et al. 2010), immune suppression (Fast et al. 2008), a decrease in liver weight (Barton et al. 1987; Basrur et al. 2010) and an increase in mortality (Pickering and Pottinger 1989; Gregory and Wood 1999; Gilmour et al. 2005). As these different changes to physiology are likely to reflect changes to the welfare status of the fish, examining the interactions between these physiological and zootechnical parameters will help to determine the metabolic profiles of fish during stressful situations.

The aim of the study was to describe the physiological and zootechnical profiles of farmed rainbow trout during the process of adaptation to a new environment, with the goal of determining relevant tools to evaluate trout welfare.

Author's personal copy

Materials and methods

Holding conditions

This study was conducted under the approval of IRSEA's Ethical Committee (no. 125) and in accordance with the European Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals. The number of subjects involved in the study was determined in accordance with the Statistical Service and the Ethical Committee of the IRSEA.

The rainbow trout involved in this study were obtained from a fish farm fed by the Sorgue River (L'Isle-sur-la-Sorgue, France). The Sorgue has high water quality and naturally hosts several salmonid species (Syndicat Mixte du Bassin des Sorgues 2006). At the trout farm, fish of similar size were kept in a 5.5 × 40-m raceway that were up to 0.8 m deep. The rearing density and water flow were maintained at approximately 15 kg m^{-3} and 25 l s^{-1}, respectively. Due to its proximity to the river's source, water temperature remained fairly stable year-round, with approximately 12 °C in winter and 16 °C in summer. Fish were fed at 1 % of their body mass with commercial dry pellet (Sarb Gheerbrant©, Netherlands).

In the laboratory, 100 rainbow trout (30 weeks, 79.1 ± 1.9 g) obtained from the farm in March 2013 were kept in a single 400-litre holding tank (100 × 50 × 80 cm, density: 20 kg m^{-3}). The tank was supplied with recirculated (1000 l h^{-1}), filtered and oxygenated (>90 %) freshwater (Volvic®, France). Fish were fed once a day at 1 % of their body mass with commercial dry pellet (Sarb Gheerbrant©, Netherlands). The light–dark cycle was set to 12 h of artificial light (6500 K) followed by 12 h of darkness. The experiment began 5 days after the introduction of the trout in the holding tank.

Experimental method

On the first day of the experiment (D_0), 42 fish were retrieved from the holding tank, weighed and randomly introduced into seven experimental tanks (six fish per tank). The seven experimental tanks (35 × 50 × 45 cm) were supplied with recirculated, filtered and oxygenated freshwater (60 l). The water flow, the oxygenation and the photoperiod were 800 l h^{-1}, >90 % and 12:12 h, respectively.

During the 9 days (D_1–D_9) of the experiment, fish were fed twice a day (1000 and 1600 h). Before food distribution, each tank was cleaned using an aqua vacuum cleaner to remove all faeces and other debris. Each group was then manually fed with commercial dry pellets (3.5 mm, Sarb Gheerbrant©, Netherlands). A sufficient quantity of pellets was delivered in order to ensure that each fish was more than satiated (>3 % of their body mass). After 15 min, unconsumed wet pellets were removed from each tank using a landing net, drained and weighed. Filtration systems were stopped during food distribution.

On the last day (D_{10}), each group of six trout was anaesthetized one by one (clove oil, 100 mg l^{-1}). A blood sample was taken from the caudal vein using a 2.5-ml syringe and a 25 × 0.6-mm needle from each trout and was transferred to a 4-ml heparinized tube stored on ice before centrifugation. Each trout was then weighed and euthanized by brain destruction. The liver of each trout was removed and weighed using a precision scale (400 × 0.005 g).

Author's personal copy

Plasma sampling

Plasma was separated by centrifugation of blood samples (3000 × g for 15 min) at 4 °C, removed and aliquoted into 1.5-ml microcentrifuge tubes. Samples were stored at −18 °C prior to subsequent analysis. Plasma cortisol levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), with a sensitivity of 56.72 pg ml^{-1} according to the manufacturer's indications. Although the cortisol molecule is identical in all species, a validation of the ELISA kit was necessary because of putative interferences in the assay (matrix effect) due to the variable composition of plasma from different species, as highlighted by Sink et al. (2008). The samples used in the present study were then prepared according to the validated procedure and read at 405 nm in a microplate reader (ELx800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments). Blank-corrected data were converted into concentrations using Gen5 data reduction software (BioTek Instruments) with a four-parameter logistic curve-fitting program. Values were multiplied by their dilution factor to obtain actual plasma cortisol concentration and expressed in ng ml^{-1}.

Parameters

Plasma cortisol levels (PCLs) were measured for each fish in the experimental group at D_{10}. Hepatosomatic index was calculated as follows: HI = 100 × (liver mass/final body mass). Growth (G) was calculated using the initial and final experimental tank biomass. Total food intake (FI) was measured by calculating the total daily food consumption for each experimental tank. The food conversion ratio (FCR) was calculated using the growth and the food intake (FCR = FI/G) of each tank.

Statistical analysis

Data were collected from field sheets in Excel files. As indicated earlier, the experimental unit was corresponded to the tank. Means were computed for the six trout contained in each tank (42 individuals in $n = 7$ tanks). A principal component analysis (PCA) was performed in order to investigate correlations between G, FI, FCR, PCL and HI from this sample population of 42 farmed rainbow trout. As variables are on different scales, correlation matrix was employed in order to standardize the data. Data analyses were carried out using STATISTICA 10.0 software.

Table 1 Descriptive statistics of the plasma cortisol level (PCL), hepatosomatic index (HI), growth (G), food intake (FI) and food conversion ratio (FCR) measured in seven tanks of six farmed rainbow trout during adaptation to laboratory conditions (42 individuals in $n = 7$ tanks)

	Minimum	Maximum	Mean	Median	SE
PCL (ng ml^{-1})	0.6	17.2	3.8	0.9	2.3
HI	1.66	1.96	1.77	1.75	0.04
G (g)	17.2	53.5	34.3	30.0	5.6
FI (g)	30.2	52.7	44.9	45.9	2.9
FCR	0.9	2.3	1.5	1.5	0.2

Author's personal copy

Results

Each group demonstrated feeding behaviour and positive growth during the 10 experimental days, and no mortality was reported. Descriptive statistics of the measured parameters (PCL, G, FI, FCR and HI) are presented in Table 1. Concerning the projection of the data, the PCA described 83 % of total inertia using two axes. The horizontal axis explained 63.65 % of total inertia and was defined by four parameters: FCR, PCL, FI and G with respective contributions of 0.23, 0.17, 0.29 and 0.29 (Fig. 1; Table 2). The vertical axis was described by HI with a contribution of 0.92 (Fig. 1; Table 2). Thus, PCL and FCR were positively correlated and were both negatively correlated with FI and G. FI and G were positively correlated. Being on the vertical axis, HI was not correlated with any other parameter (Fig. 1).

Discussion

The aim of the experiment was to investigate the physiological and zootechnical profile of farmed rainbow trout living laboratory conditions in order to isolate relevant parameters for evaluating welfare in this species. The multivariate analysis served as a useful tool to study the association between parameters in the population sample. Results of the analysis indicate that plasma cortisol level, food intake, growth and food conversion ratio are

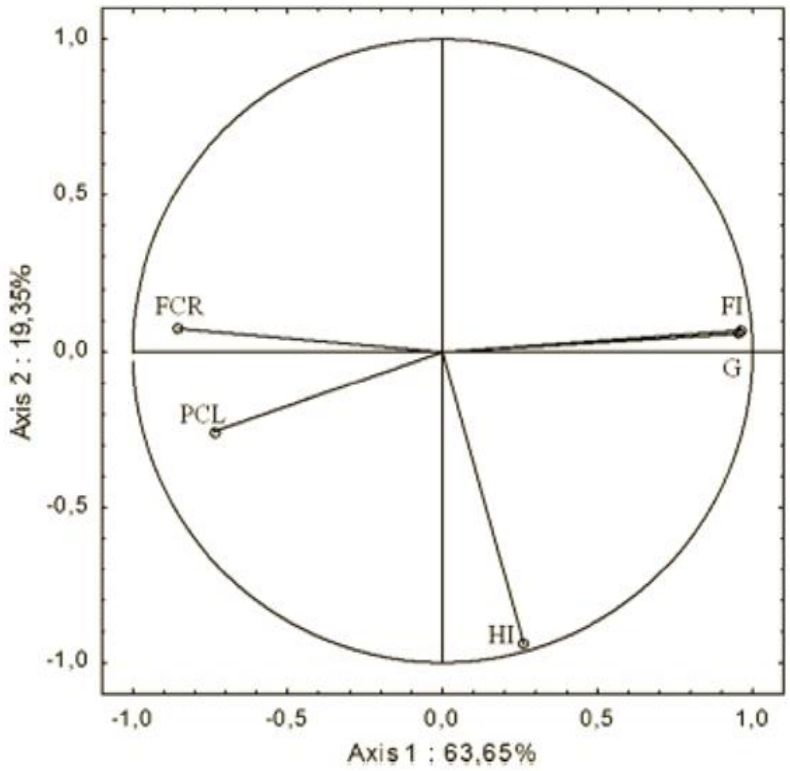

Fig. 1 Circle of correlations of the principal component analysis applied on food conversion ratio (FCR), plasma cortisol level (PCL), food intake (FI), growth (G) and hepatosomatic index (HI) measured in seven tanks of six farmed rainbow trout during adaptation to laboratory conditions. 83 % of the total inertia is described by using two axes (42 individuals in $n = 7$ tanks)

Author's personal copy

Table 2 Contribution of variables to the axis of the principal components analysis applied on plasma cortisol level (PCL), hepatosomatic index (HI), growth (G), food intake (FI) and food conversion ratio (FCR) measured in farmed rainbow trout during adaptation to laboratory conditions

	Axis 1	Axis 2
PCL	0.171*	0.068
HI	0.022	0.918*
G	0.285*	0.003
FI	0.293*	0.005
FCR	0.229*	0.006

* Represents the higher value of contribution of the variables for the creation of axis

relevant parameters for evaluating the welfare of farmed trout when adapting to a new environment. Indeed, the PCA performed in this study showed a negative correlation between total plasma cortisol level and growth. The effect of cortisol on growth is a controversial question in salmonids (Van Weerd and Komen 1998). Many authors have found that continuously high cortisol levels induce a decrease in growth in salmonids (Gregory and Wood 1999; Jentoft et al. 2005). However, other authors have shown growth rate to be independent of cortisol levels in the case of repeated daily stress (Barton et al. 1987). In this study, cortisol level is negatively correlated with the growth rate of rainbow trout. Indeed, plasma cortisol level was negatively correlated with food intake and positively correlated with food conversion ratio. These correlations have already been demonstrated in numerous studies (Gregory and Wood 1999; Jentoft et al. 2005). Cortisol appears to impair metabolic functions, such as food assimilation, followed by behavioural functions, particularly through a reduction in food intake (Gregory and Wood 1999; Folkedal et al. 2012). Like many salmonids, rainbow trout are predators (Begout Anras and Lagardere 2004) and need moving "prey" to induce feeding behaviour (Begout Anras and Lagardere 2004). In farm conditions, trout display this feeding behaviour only while pellets are falling in the water column (Begout Anras and Lagardere 2004). Once the pellet is immobile down to the bottom of the tank, the trout will not catch it anymore. The trout thus need to be attentive during this time interval in order to induce feeding behaviour. Cortisol appears to influence the trout's capacity for attention and may thus induce a decrease in food intake. This cognitive ability impairment was demonstrated by the study of Folkedal et al. (2012) in which stressed *Atlantic salmon* reduced their food anticipatory behaviour compare to unstressed fish. Previous research has suggested that cortisol may also induce the release of glucose into circulating blood, thus reducing the fish's appetite and food intake (Gregory and Wood 1999). Food intake is thus an important parameter because it sheds light on metabolic function and indirectly on behaviour. The correlation between cortisol level and food conversion ratio is also well known in salmonids (Gregory and Wood 1999; Gilmour et al. 2005; Basrur et al. 2010). Indeed, permanently high cortisol levels seem to affect digestive efficiency, particularly by reducing the capacity to digest lipids (Gilmour et al. 2005). Cortisol levels influence the growth of trout by impairing food intake and food conversion ratio.

Hepatosomatic index was not associated with any other parameter. This finding appears to contradict evidence from several other studies. In Barton et al. (1987), hepatosomatic index was significantly reduced after repeated daily stress during a 10-week period and in rainbow trout fed with cortisol. Basrur et al. (2010) also found a decrease in hepatosomatic

Author's personal copy

index after 64 days of repeated crowding. In the present study, the 10-day experimental period was not sufficient to induce a decrease in hepatosomatic index, as found in the two aforementioned studies. It appears that hepatosomatic index was probably not sufficient for assessing welfare in farmed trout undergoing adaptation to a new environment. Moreover, from a practical point of view, hepatosomatic index is not suitable for evaluating welfare in living fish.

The total plasma cortisol concentration in the present study (3.8 ± 2.3 ng ml^{-1}) may be considered as the basal level for rainbow trout (Pickering and Pottinger 1989; Martinez-Porchas et al. 2009). Cortisol is released after a stressful event and allows the organism to cope with the situation by releasing energy, particularly through the release of glucose from the liver (Mommsen et al. 1999). In the absence of stress, plasma cortisol is kept at a baseline concentration, usually inferior to 25 ng ml^{-1} (Pickering and Pottinger 1989; Martinez-Porchas et al. 2009). Many studies also report basal cortisol concentration in the case of chronic stress (Mormède et al. 2007). In this study, the experimentation period began 5 days after the arrival of the trout in the laboratories to avoid any potential influence of the stress after transport (Barton and Peter 1982). The fish were not subjected to any stressful handling during these 5 days in order to not interfere with the goal of the study. Rainbow trout transferred from farm to laboratory conditions required an adaptation period, which may be considered as a stressful situation, as suggested by Rance et al. (1982). These transfers imply changes in water quality, the stocking density and the substrate of the rearing unit. Because the plasma cortisol concentration of the trout was at a basal level, it is difficult to conclude whether the trout were experiencing chronic stress or were totally adapted to their new environment. Plasma cortisol level is thus not a relevant tool for assessing welfare in farmed trout when measured alone. Results do, however, demonstrate that the welfare of farmed trout in stressful conditions may be successfully evaluated by measuring plasma cortisol levels with other parameters such as growth performance. These combinations of parameters are of particular interest because blood samples are easy to perform and zootechnical performance is already measured by farmers.

Conclusions

The present study demonstrates that the combination of physiological (cortisol level) and zootechnical (growth, food intake and food conversion ratio) parameters represents a relevant approach for assessing the welfare of farmed rainbow trout when adapting to a new environment. Generally, a combination of parameters needs to be monitored to accurately assess welfare. In further studies, it may be interesting to include other physiological or zootechnical parameters known to be good indicators of chronic stress, such as haematocrit, lymphocyte percentage and damage to fins. This study confirms the validity of examining correlations between several parameters through multivariate analysis as an optimal strategy for the measurement of welfare in farmed animals.

Acknowledgments Rainbow trout were kindly provided by the farmer D. Meyer who manages the fish farm. We would like to thank E. Landen, a professional translator, and Dr. M. Mengoli for reviewing the manuscript. We are also grateful to IRSEA's Ethical Committee for their comments on the protocol.

Author's personal copy

References

Ashley PJ (2007) Fish welfare: current issues in aquaculture. Appl Anim Behav Sci 104:199–235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001

Barton BA, Peter RE (1982) Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. J Fish Biol 20:39–51. doi:10.1111/j.1095-8649.1982.tb03893.x

Barton BA, Schreck CB, Barton LD (1987) Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. Dis Aquat Org 2:173–185

Basrur TV, Longland R, Wilkinson RJ (2010) Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol Biochem 36:445–450. doi:10.1007/s10695-009-9314-x

Begout Anras M, Lagardere J (2004) Domestication et comportement chez les poissons téléostéens. INRA Prod Anim 17:211–215

Braithwaite VA, Ebbesson LOE (2014) Pain and stress responses in farmed fish. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 33:245–253

Broom DM (2007) Welfare in relation to feelings, stress and health. Rev Electron Vet 8:207–222

Broom DM (2008) Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. Annu Rev of Biomed Sci 10:79–90. doi:10.5016/1806-8774.2008.v10pT79

Broom DM, Fraser AF (2007) Domestic animal behaviour and welfare. CAB International, Cambridge

Broom DM, Johnson KG (1993) Stress and animal welfare. CAB International, Dordrecht

FAO (2004–2016) Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. *Salmo salar*. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. Text by Jones M In: Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO [en ligne]. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/fr

FAO (2005–2016) Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. *Oncorhynchus mykiss*. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. Text by Cowx IG In: Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO [en ligne]. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/fr

Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LOB (2008) Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. Fish Shellfish Immunol 24:194–204. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.009

Fevolden S-E, Røed KH, Fjalestad KT (2002) Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. Aquaculture 205:61–75. doi:10.1016/S0044-8486(01)00660-3

Folkedal O, Stien LH, Torgersen T et al (2012) Food anticipatory behaviour as an indicator of stress response and recovery in Atlantic salmon post-smolt after exposure to acute temperature fluctuation. Physiol Behav 105:350–356. doi:10.1016/j.physbeh.2011.08.008

Gilmour KM, Dibattista JD, Thomas JB (2005) Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. Integr Comp Biol 45:263–273. doi:10.1093/icb/45.2.263

Gregory TR, Wood CM (1999) The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. Physiol Biochem Zool PBZ 72:286–295. doi:10.1086/316673

Huntingford FA, Kadri S (2014) Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 33:233–244

IFREMER (2006) Saumon d'Atlantique. In: La découverte des poissons et de leur élevage

Iwama G, Afonso LOB, Vijayan M (2005) Stress in fishes. In: Evans D, Claiborne J (eds) The physiology of fishes. Boca raton, pp 320–42

Jenkins JA, Bart HL, Bowker JD et al (2014) Guidelines for the use of fishes in research. American Fisheries Society, Maryland

Jentoft S, Aastveit AH, Torjesen PA, Andersen O (2005) Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 141:353–358. doi:10.1016/j.cbpb.2005.06.006

Kupsala S, Jokinen P, Vinnari M (2013) Who cares about farmed fish? Citizen perceptions of the welfare and the mental abilities of fish. J Agric Environ Ethics 26:119–135. doi:10.1007/s10806-011-9369-4

Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR, Ramos-Enriquez R (2009) Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? Am J Aquat Sci 4:158–178

McCormick S, Shrimpton J, Carey J et al (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 168:221–235. doi:10.1016/S0044-8486(98)00351-2

Author's personal copy

Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev Fish Biol Fish 9:211–268

Mormède P, Andanson S, Aupérin B et al (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiol Behav 92:317–339. doi:10.1016/j.physbeh.2006.12.003

Pickering AD, Pottinger TG (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiol Biochem 7:253–258. doi:10.1007/BF00004714

Rance T, Baker BI, Webley G (1982) Variations in plasma cortisol concentrations over a 24-hour period in the rainbow trout Salmo gairdneri. Gen Comp Endocrinol 48:269–274

Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA (2008) Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish Physiol Biochem 34:95–101. doi:10.1007/s10695-007-9150-9

Syndicat Mixte du Bassin des Sorgues (2006) Etude Hydrologique des Sorgues - Compte rendu de prélèvement - Décembre 2006. Barjols

Van Weerd JH, Komen J (1998) The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 120:107–112. doi:10.1016/S1095-6433(98)10017-X

Vannier P, Michel V, Keeling LJ (2014) Science-based management of livestock welfare in intensive systems: looking to the future. Sci Tech Rev Off Int Epizoot 33:153–160

6. Conclusion de l'étude n°2

Dans nos conditions d'expérimentation, il semblerait que les meilleurs paramètres pour évaluer le bien-être des truites en adaptation à un nouvel environnement soient le cortisol, la croissance, l'indice de consommation et la prise alimentaire. Ces paramètres physiologiques et zootechniques sont particulièrement intéressants car la prise de sang peut être facilement réalisable et les performances de croissances sont déjà collectées par les éleveurs. La comparaison des données avant et après le transfert des poissons dans leur nouvel environnement permettrait alors à l'éleveur d'évaluer le bien-être de ses poissons et ainsi mesurer le coût de ces événements perturbateurs.

Le bien-être animal ne devrait être mesuré précisément qu'à partir d'indicateur du bien-être, les paramètres de stress n'interprétant qu'un état de mal-être. Chez les mammifères par exemple, l'ocytocine est une hormone qui favorise les interactions sociales et sera utilisée comme marqueur du bien-être (Broom 2007; Ishak et al. 2011). Chez les poissons, l'intérêt pour le bien-être en aquaculture est plus récent que pour les élevages terrestres. Ainsi, peu de paramètres de bien-être ont été étudiés. Il serait alors intéressant de développer ces études sur des paramètres de bien-être positif des salmonidés d'élevage.

L'amélioration du bien-être des poissons est importante pour l'éleveur qui veut éviter au maximum les situations inductrices de stress. Nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, les conséquences du stress sur la physiologie de l'animal et, a fortiori sur ses performances zootechnique, sont négatives ; notamment le stress chronique qui affaiblit le système immunitaire des poissons et les rend plus vulnérables aux pathologies.

Chapitre 2 : Stress et pathologie des salmonidés d'élevage : le cas du pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*

Lepeophtheirus salmonis est un ectoparasite marin obligatoire des salmonidés et plus particulièrement du saumon Atlantique. Le cycle de vie de *L. salmonis* se compose de 8 stades : 2 stades larvaires libres (nauplius I & II), 1 stade infestant (copépodite) et 5 stades parasitiques (chalimus I & II, pré-adulte I & II, et adulte) (**Figure 34**) (Hamre et al. 2013). *L. salmonis* est certainement le parasite qui cause le plus de problème dans la production de saumon Atlantique de l'hémisphère Nord (Johnson et al. 2004; Costello 2006; Torrissen et al. 2013; Liu and Bjelland 2014). Si l'effet de ce parasitisme sur les niveaux de stress des saumons est bien connu (Bowers et al. 2000), l'inverse à longtemps était supposé sans avoir été démontré. En effet, le stress peut provoquer un affaiblissement du système immunitaire, qui rend à terme l'organisme plus sensible aux infections. Qu'en est-il du parasitisme ? Les saumons stressés sont-ils plus infestés que des saumons non-stressés ?

Pour répondre à ces questions nous nous sommes intéressés au stade le plus critique du cycle de vie du parasite : le stade infestant. Le copépodite nage librement dans la colonne d'eau et dispose de réserves lipidiques dans lesquelles il puise pour vivre (Pike and Wadsworth 1999). Il dispose donc d'un temps limité pour trouver un hôte sur lequel s'attacher. La détection du poisson par le parasite est déclenchée par les vibrations de l'eau créées par le poisson (Pike and Wadsworth 1999), mais également par des sémiochimiques émis par le mucus (Mordue Luntz and Birkett 2009). Une fois attaché sur le corps d'un poisson, le copépodite analyse le mucus pour déterminer si le poisson est un bon hôte. Le copépodite développe alors un filament frontal lui permettant de s'ancrer définitivement sur le corps de son hôte. Il se nourrit alors de son mucus, sa peau et son sang pour continuer son développement (Pike and Wadsworth 1999).

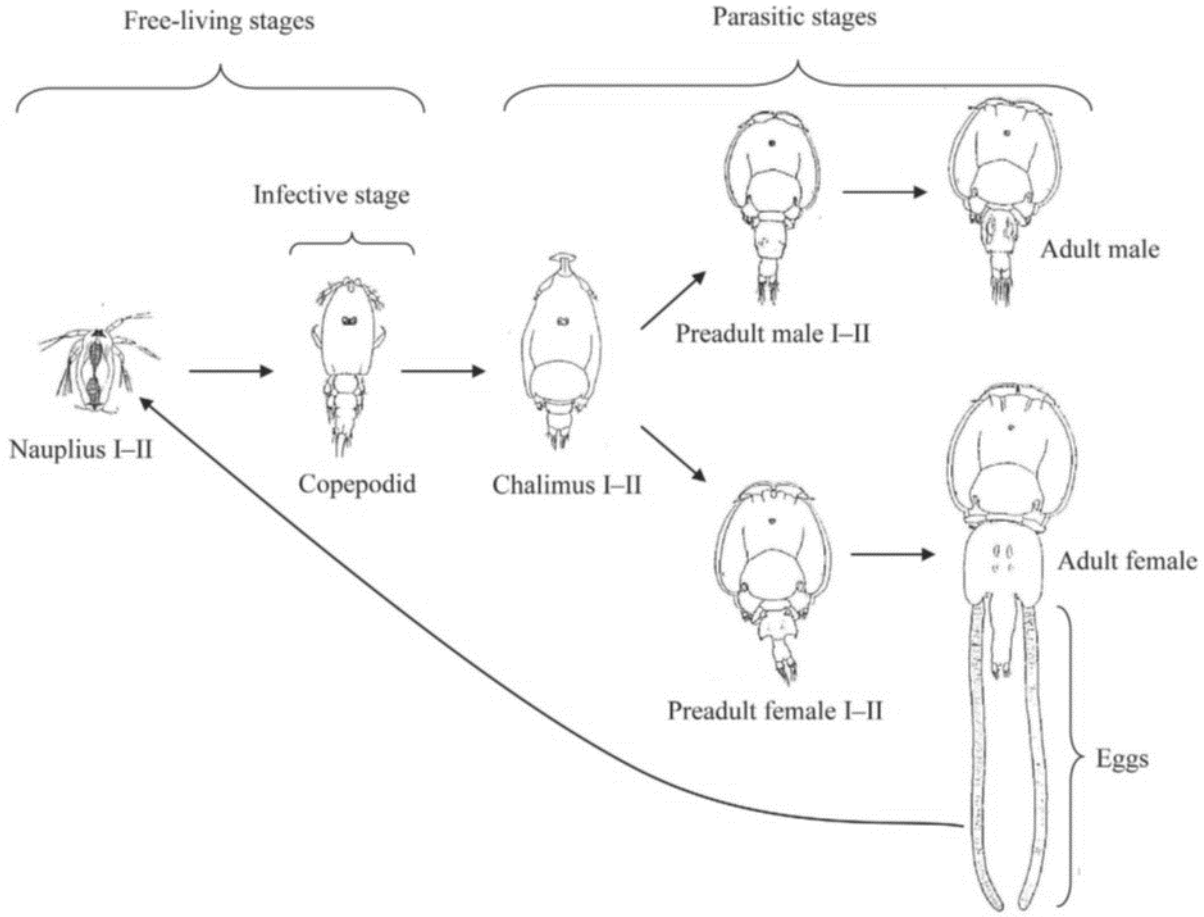

Figure 34 : Schéma représentant le cycle de vie de l'ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis* (Extrait de Igboeli et al. 2014).

Afin d'étudier ce comportement d'infestation en laboratoire, nous avons, dans un premier temps, créé un test réunissant les conditions nécessaires à la réalisation de cette interaction entre le parasite et son hôte. Puis à partir de ce test, nous avons étudié l'effet du stress aigu puis du stress chronique sur l'attractivité des saumons pour le parasite.

1. Présentation de l'étude n°3

Cette étude a pour objectif de valider un test *in vivo* développé en laboratoire afin de déterminer l'attractivité d'un saumon pour *L. salmonis* en comptant le nombre de copépodite attachés sur le saumon en fin de test. En résumé, pour chaque réplique, un smolt de saumon Atlantique est baigné dans un cristallisoir avec 60 copépodites pendant 45 min. Le saumon est ensuite euthanasié et l'ensemble de son corps est raclé pour détacher les copépodites. Le nombre de copépodites attachés sur chaque smolt peut ainsi être mesuré.

Dans la première partie de cette étude, 82 smolts sont testés pour évaluer l'effet de plusieurs paramètres sur le résultat final : la température de l'eau, le manipulateur, la surface du corps du smolt. Dans la deuxième partie, 14 smolts sont passés dans le test afin de déterminer le coefficient de corrélation entre le nombre de copépodites attachés sur le corps du smolt et le nombre de copépodites retrouvés dans les branchies. En effet, des copépodites peuvent être respirés par le saumon et s'attacher dans les branchies. Cette infestation passive se solde tout de même par un attachement permanent des parasites dans les branchies puis une migration vers la surface du corps au stade chalimus II.

Dans cette étude, il n'y a pas de différence significative entre les deux manipulateurs pour le nombre de copépodites attachés. Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de copépodites attachés et la surface du corps du poisson. Il y a un effet significatif de la température de l'eau sur le nombre de copépodites attachés avec plus de copépodites aux températures hautes. La deuxième partie de l'étude nous apprend qu'il n'y a pas de corrélation significative entre le nombre de copépodites sur le corps et dans les branchies.

2. Etude n°3

Article soumis pour publication dans *Journal of Fish Diseases*, le 05/10/2016 :

Delfosse C, Lafont-Lecuelle C, Barthélémy H, Chabaud C, Teruel E, Bienboire-Frosini C, Pageat P. **A novel *in vivo* test system for studying the hooking behaviour of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) copepodids on Atlantic salmon, *Salmo salar* L.**

A novel *in vivo* test system for studying the hooking behavior of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) copepodids on Atlantic salmon, *Salmo salar* L.

Authors

Cyril Delfosse[1,2*], Céline Lafont-Lecuelle[1], Héloïse Barthélémy[1], Camille Chabaud[1], Eva Teruel[1], Cécile Bienboire-Frosini[1], Patrick Pageat[1,2]

Location

[1] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology (IRSEA) Route du Chêne, Quartier Salignan 84400 Apt, France

[2] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology – Aquaculture Research Centre (IRSEA-ARC) Daugstad 6392 Vikebukt, Norway

Correspondence

c.delfosse@group-irsea.com

Short running title

Test of *L. salmonis* copepodids hooking on salmon

Abstract

The study of the interaction between the copepodid (infestation stage of *Lepeophtheirus salmonis*) and the Atlantic salmon could be used to develop treatments to prevent infestation. A bioassay was designed to evaluate the influence of different factors on the attractiveness of salmon for copepodids. A salmon was bathed in a device with 60 copepodids during 65 min. The salmon's body was scrubbed above a plastic bag and the content was filtered to count the

number of hooked parasites. This procedure was tested at different water temperatures, for different body surfaces, and by two operators. The correlation between the number of hooked copepodids on the body and in the gill chambers, was also investigated. The temperature significantly influenced the number of hooked copepodids ($p < 0.05$). No correlation was found between the body surface and the number of hooked parasites ($p = 0.65$). No difference was found between the two operators ($p = 0.86$). There was no correlation between the number of copepodids on the body and in the gill chambers ($p = 0.50$). This bioassay was used to successfully measure the attractiveness of salmon for copepodids, making it an interesting tool to screen putative treatments designed to prevent the infestation.

Key words

Atlantic salmon, *Lepeophtheirus salmonis*, copepodid, attractiveness, hooking behavior

Introduction

The sea louse *Lepeophtheirus salmonis* is a crustacean ectoparasite that feeds on many salmonids and more specifically on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. (Pike and Wadsworth 1999; Tully and Nolan 2002; Boxaspen 2006). In salmon production, sea lice are responsible for significant costs, inducing financial loss to the industrial economy in main producer countries, such as Norway and Chile (Johnson et al. 2004; Costello 2009; Liu and Bjelland 2014). The life cycle of *L. salmonis* is composed of 8 stages: 2 free-swimming stages (nauplius I & II), 1 infestation stage (copepodid) and 5 parasitic stages (chalimus I & II, pre-adult I & II and adult) (Hamre et al. 2013). Regarding the life cycle, the most critical stage is the copepodid, where the parasite has to settle on a host to survive. The parasite moves then from a free-living to an attached stage. Copepodids are able to detect vibrations in the water created by the fish swimming (Heuch and Karlsen 1997). Upon detection of these signals, the

copepodid propels to the fish and analyses the mucus to determine whether the fish is a suitable host (Pike and Wadsworth 1999). Some authors suggest that this hooking behavior is also triggered by the detection of semiochemicals from the fish (Mordue Luntz and Birkett 2009). Two days after the hooking on a suitable host, the copepodid starts to produce a frontal filament to settle permanently on the fish (Gonzalez-Alanis 2000).

At present, the most used solutions to fight the infestation are pharmaceutical products like avermectins, pyrethroids, organophosphates, chitin synthesis inhibitors and hydrogen peroxide (Aaen et al. 2015). However, *L. salmonis* has developed resistance to many of these products and only some of them are still used in the salmon industry (Aaen et al. 2015). The resistance and the toxicity of these products has led researchers to begin developing alternative methods to fight against the parasite (Raynard et al. 2002; Treasurer 2002; Erikson and Misimi 2008a; Lien et al. 2014). Among these alternative methods, the use of semiochemicals to repel or to attract the parasite into a trap appears to be a promising approach (Ingvarsdóttir et al. 2002). By studying the communication between *L. salmonis* and its hosts, some studies have been able to isolate molecules acting in the host-parasite interaction (Ingvarsdóttir et al. 2002; Bailey et al. 2006; Mordue Luntz and Birkett 2009; Hastie et al. 2013). Regarding the hooking behavior of the copepodid, it could be interesting to study the molecules making the fish a suitable host for the parasite. This is why it was important to develop a bioassay to evaluate the attractiveness of Atlantic salmon for copepodids. Such a test could be used to screen different treatments designed to prevent the hooking behavior of the copepodid and so the infestation.

The aim of this study was to create a bioassay in order to assess the number of copepodids hooking on the fish. Operator effect, body surface of the tested fish and water temperature were included as factors in this bioassay. A second experiment was then performed to evaluate the influence of the copepodids in the gill chambers.

Materials and Methods

Experimental animals

This study was conducted under the approval of the Ethical Committee of IRSEA (n°125), and in accordance with the European Directive 2010/63/UE for the protection of laboratory animals. Atlantic salmon were transferred from a farm (SALMAR®, Vikebukt, Norway) three weeks before the beginning of each experiment directly from freshwater to seawater in the laboratory (i.e. smoltification) in order to prevent any natural parasitism. Salmon smolts were kept in 180-liter holding tanks (maximal density = 20 $kg.m^{-3}$) continuously supplied with filtered seawater (5 $l\ min^{-1}$) pumped from Tresfjorden (62°32'25.5"N 7°08'18.1"E, Vikebukt, Norway). Salmon were reared in continuous light and fed daily *ad libitum* with commercial dry pellets (Skretting AS©, Norway).

L. salmonis copepodids (Ilab©, Norway) were obtained 2 days after the nauplius II / copepodid transformation and used for the experiments during the first week. The parasites were held in a net-bucket system continuously supplied with filtered seawater (0.1 $l\ min^{-1}$) under continuous light.

Design of the bioassay

The setup of the experiment is shown in Figure 1. First, the fish was bathed in a 3.5L-flat beaker during 10 min. Then, the fish was manually transferred into a second 3.5L-flat beaker which was supplied with 3.5 l of seawater and was equipped with a valve that allowed 0.875 l of the content to be emptied over a period of 10 minutes. Ten minutes later, the valve was turned off and 0.875 l of seawater was added into the flat beaker. Previously counted under a stereoscopic microscope (Figure 2), 60 *L. salmonis* copepodids were injected into the flat beaker. Five minutes after the introduction of copepodids, the valve was turned on. The flat

beaker was supplied with 0.875 l of seawater a total of 4 times at 10 min intervals in order to maintain a good oxygen level in the water. Then, 45 min after the introduction of the copepodids, 2 ml of anaesthetic (Benzoak®, lethal dose) were injected into the flat beaker. The fish body was then placed and stored in a plastic bag. The entire body of the fish, from the front of the head down to the tail, was scrubbed with a spoon, and rinsed above the plastic bag. In order to harvest all of the hooked copepodids, the procedure was carried out 3 times on each fish (front of the fish + pectoral and dorsal fins / rinse / back of the fish + pelvic, adipose, caudal and anal fins / rinse / entire body + all fins / rinse). The content of the plastic bag was then filtered and the number of copepodids was counted using a magnifying glass.

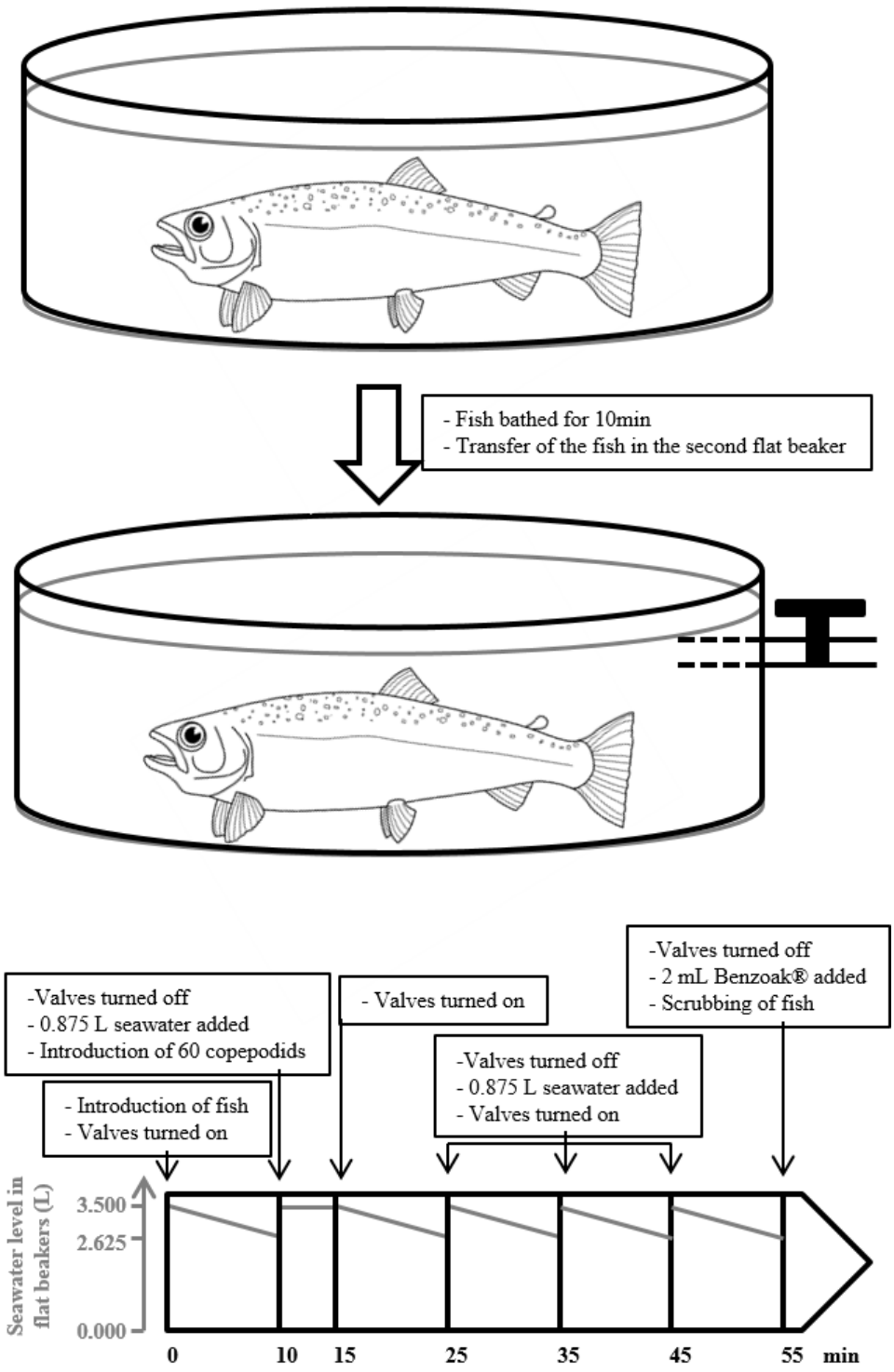

Figure 1 Chronology of the bioassay to evaluate the attractiveness of Atlantic salmon smolt to *L. salmonis* copepodids. Fish is bathed in a flat beaker during 10min and then transferred to a second flat beaker equipped with a valve for 55min.

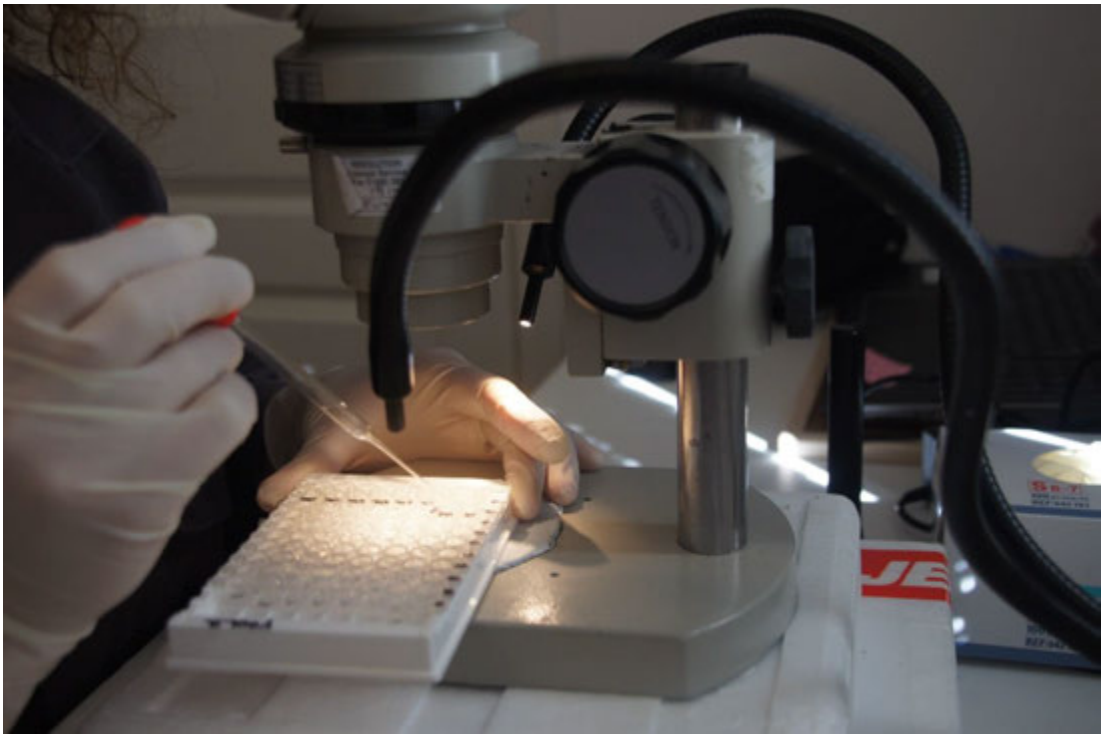

Figure 2 Picture showing the counting of parasites. *L. salmonis* copepodids were counted under stereoscopic microscope using a clean ELISA plate.

Experiment 1

For this first experiment, a total of 82 Atlantic salmon smolts (60 to 153g, Mean ± SD = 101 ± 18) were tested using the previously described bioassay. The number of hooked copepodids was compared between operator A (n = 54) and operator B (n = 28). The influence of the water temperature in the flat beaker on the number of hooked copepodids was also investigated at 6.1 °C (n = 8), 9.2 °C (n = 8), 10.3 °C (n = 8), 12.3 °C (n = 12) and 13.8 °C (n = 46). Then, the influence of the body surface of the fish (n = 82) on the number of hooked copepodids was examined by studying the correlation between the two parameters. The body surface (S) of each fish was calculated from the body mass (W) by using the equation $S = 14.53W^{0.6044}$ (Frederick et al. 2014).

Experiment 2

In this second experiment, 14 Atlantic salmon smolts were used to investigate the hooking behaviour of copepodids in the gill chamber (bioassay at 12.0 °C). To do so, the gill chambers of each fish were dissected and observed under a stereoscopic microscope at the end of the bioassay. The correlation between the number of hooked copepodids on the fish body and the number of copepodids in the gills was calculated in order to determine whether this secondary hooking could bias the final data.

Statistical analysis

Data was analysed using SAS 9.4 software (2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The significance threshold was conventionally set at 5%.

In experiment 1, in order to compare the number of copepodids counted by each operator, datasets from the two operators were tested for evidence of departures from the assumption of normality using residual diagnostic plots and Shapiro-Wilk test for normality. The assumption of homoscedasticity was verified with a Fisher test. Comparisons between copepodid counts of the two operators were carried out using a Student t test.

To assess the effect of water temperature on copepodid hooking, the assumption of homogeneity of variances between groups of water temperature was verified using the Levene test. Comparisons were carried out using a one-way ANOVA model. Normality of residuals of the model was checked by observing residual diagnostic plots and Shapiro-Wilk test for normality. Post-hoc multiple means comparisons were carried out with the help of the Tukey test and the Kramer adjustment.

As the data for the number of copepodids hooked did not follow a normal model, the Spearman rank-order correlation coefficient was computed and tested in order to explore the correlation between the body surface and the number of hooked copepodids in experiment 1

and the correlation between the number of copepodids found on the body versus gills in experiment 2.

Results

Experiment 1

Regarding the operator effect, no significant difference (Student t test, *t-value* = 0.17, DF = 80, $p = 0.86$) was found between the operators A (Mean ± SEM = 21.1 ± 0.6) and B (Mean ± SEM = 20.9 ± 0.9) (Figure 3). The bioassay highlighted significant differences between in the number of hooked copepodids according to water temperature (One-way ANOVA, *F-value* = 6.68, DF = 81, $p < 0.001$) (Figure 4). Smolts presented significantly more hooked copepodids at a higher water temperature (13.8 °C, mean ± SEM = 24.6 ± 1.3) compared to smolts at a lower temperature (6.1 °C, mean ± SEM = 18.6 ± 0.7) (Tukey test, $p = 0.011$). The correlation between body surface and the number of hooked copepodids was not significant (Spearman coefficient correlation, $\rho = 0.051$, $p = 0.65$) (Figure 5).

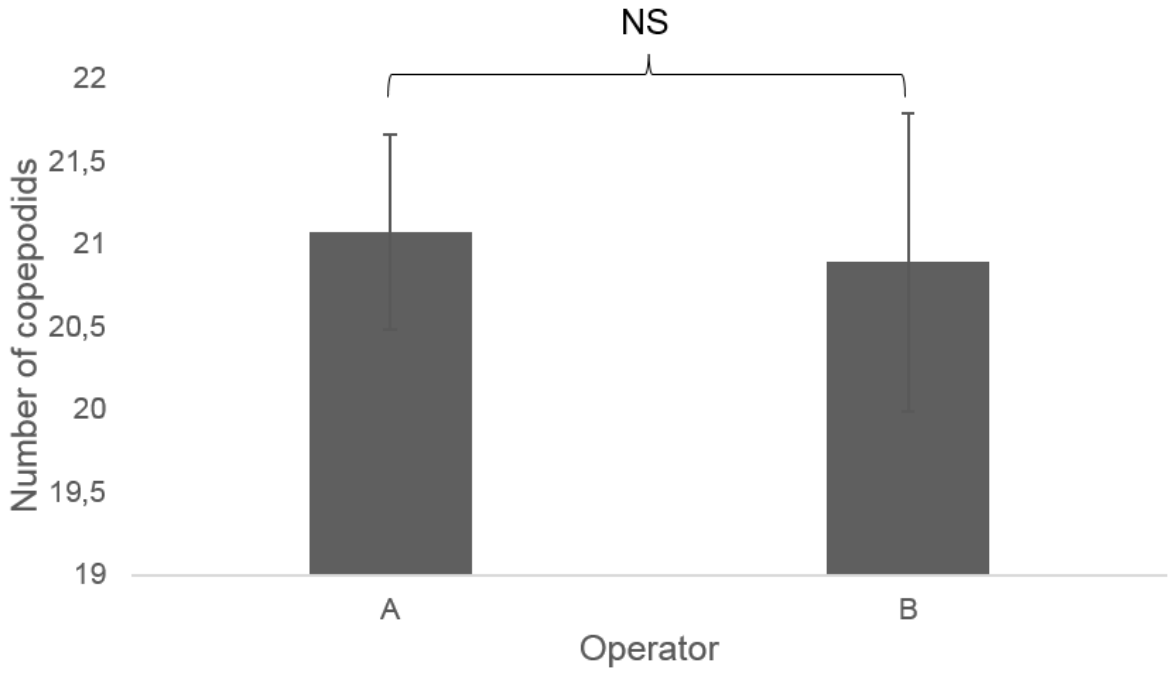

Figure 3 Mean ± SEM of the number of hooked copepodids for the operators A ($n = 54$) and B ($n = 28$).

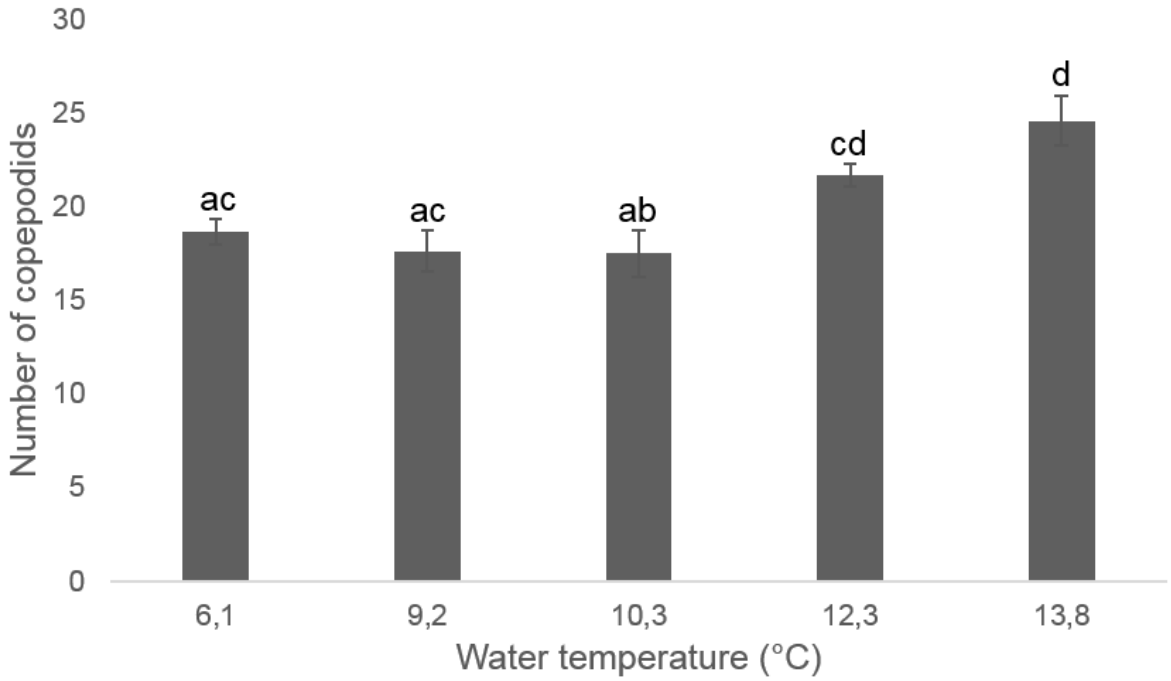

Figure 4 Mean ± SEM of the number of hooked copepodids for the water temperatures 6.1 °C (n = 8), 9.2 °C (n = 8), 10.3 °C (n = 8), 12.3 °C (n = 12) and 13.8 °C (n = 46). Different lowercase letters indicate significant differences (Tukey test, $p < 0.05$) between water temperature groups.

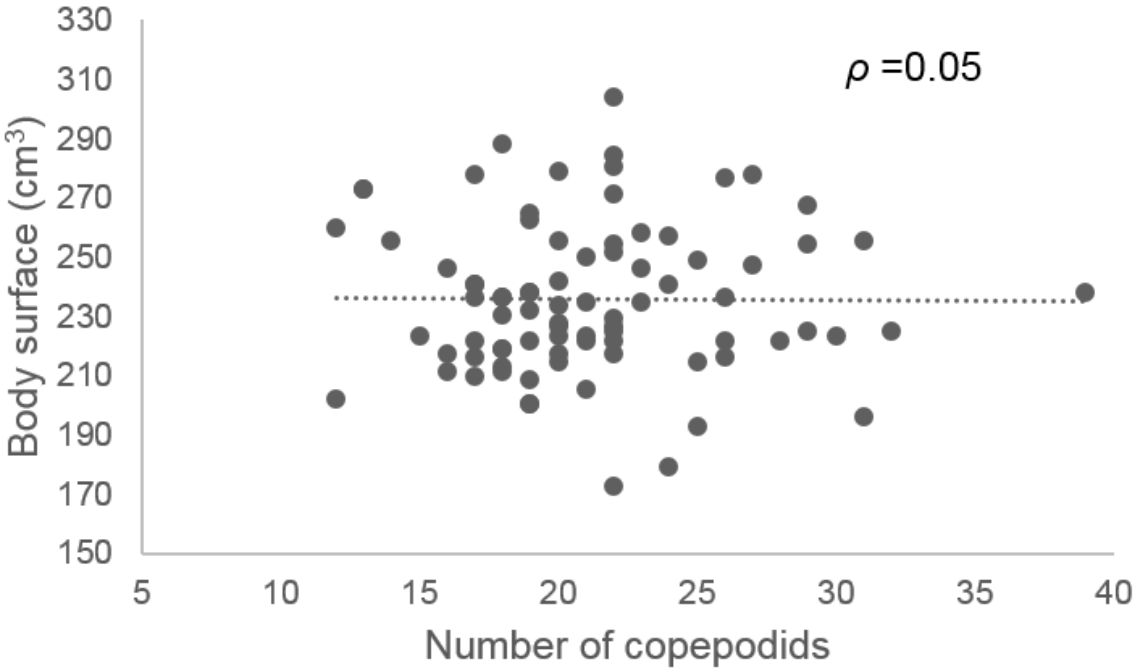

Figure 5 Scatter plot (n = 82) representing the number of hooked copepodids according to the body surface area of Atlantic salmon smolts.

Experiment 2

Descriptive data on the number of hooked copepodids on the body versus the gill chambers are presented in Table 1. There was no significant correlation between the number of hooked copepodids on the body and in the gill chambers (Spearman coefficient correlation, ρ = -0.198, $p = 0.50$) (Figure 6).

Table 1 Descriptive statistics of the number of hooked copepodids on body and in gill chambers (n = 14).

	Minimum	**Maximum**	**Mean**	**Median**	**Standard-error**
Cop. on body	17	30	20.8	21	0.9
Cop. in gills	0	7	3.3	3.5	0.6

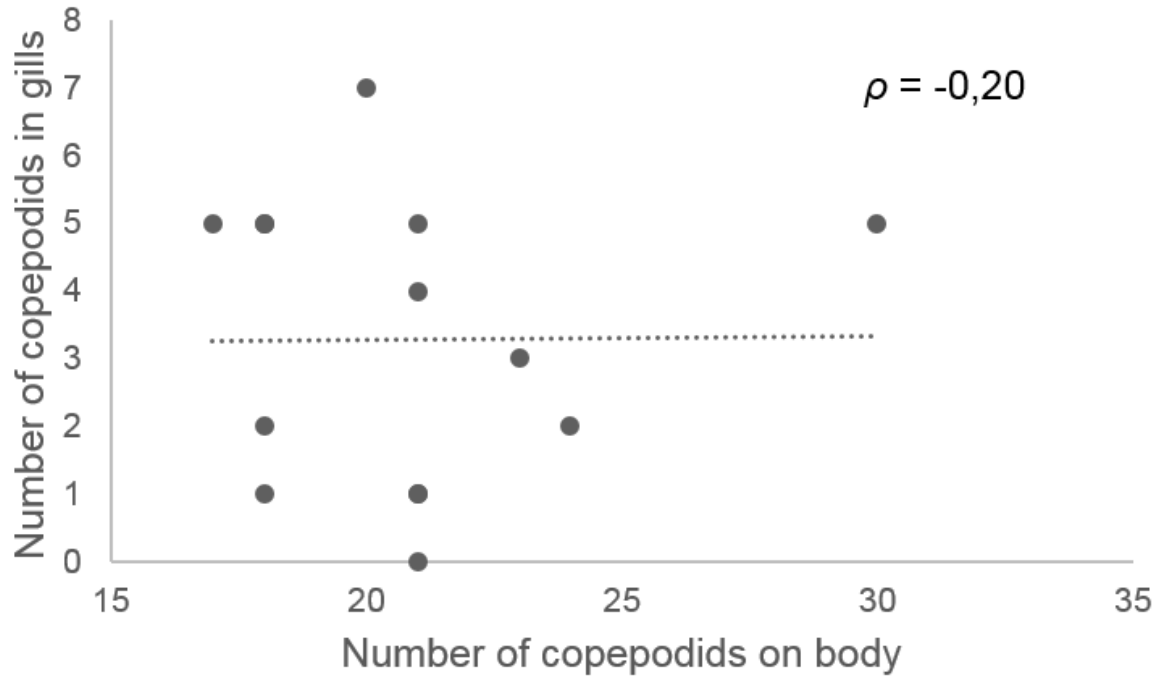

Figure 6 Scatter plot (n = 14) representing the number of copepodids hooked on body according to the number of copepodids hooked in gill chambers of Atlantic salmon smolts.

Discussion

The new bioassay developed for the experiment shows promise as a tool for evaluating hooking behaviour of *L. salmonis* copepodids on Atlantic salmon. The *in vivo* test allows copepodids to hook to salmon. However, it should be noted that some factors in the bioassay may influence the test quality.

The results of the bioassay do not appear to be influenced by the operator since no significant difference was found between the copepodid counts of the two operators applying the bioassay. During the test, scrubbing the fish body is certainly the most critical step affecting the final number of hooked copepodids found on each fish. The description of this manipulation in the protocol was clear enough to be applied by the two operators. The three-phase scrubbing (front area, back area, entire body) appears to be effective in removing all copepodids from the salmon smolt. Designing a protocol which can be carried out by any operator is essential to the feasibility of the bioassay.

Moreover, temperature was shown to have a significant influence on the hooking behaviour of the parasite: the higher the water temperature, the higher the number of hooked copepodids. Other studies have also demonstrated that the settlement of *L. salmonis* copepodids on Atlantic salmon is higher at ≈ 12 °C than ≈7 °C (Tucker et al. 2000). In the present study, this significant difference also occurred between ≈ 10 °C and ≈ 12°C. The reasons for the increased hooking behaviour of *L. salmonis* copepodids at higher temperature are not well known, but water temperature certainly has a direct effect on the metabolic rate of copepodids and thus affects the activity of the parasite (Tucker et al. 2000).

Salmon body surface area does not seem to influence the number of copepodids able to hook to it. In the range of fish mass tested, no correlation was found between the number of hooked copepodids and the body surface area of the salmon. Other studies describe a positive correlation between body weight and lice burden (Glover et al. 2004; Gjerde et al. 2011). On the contrary, the study of Kolstad, Heuch, Gjerde, Gjedrem & Salte (2005) describes no high

correlation between the body weight of salmons and lice burden. In the present study, the result could be explained by copepodids' preference for certain areas of the body and especially the dorsal and pectoral fins (Bron et al. 1991). The surface of these areas remain nearly unchanged for the range of fish masses tested, suggesting that the total surface area of the fish does not influence the number of hooked copepodids. It could be interesting to compare a larger range of masses to verify this hypothesis (fish between 50 and 300g for example) using the bioassay.

The second experiment demonstrates that even if the hooking of copepodids in the gill chambers may influence the final data, the number of copepodids in the gills is not correlated with the number of hooked copepodids on the body. This infestation is independent of regular host-parasite interactions, the copepodid being fortuitously inhaled by the fish (Johnson and Albright 1991). This passive uptake of copepodids into the gill chambers results in the development of chalimus (Johnson and Albright 1991). The parasite then migrates outside the gill chamber to settle onto the fins or the body surface (Johnson and Albright 1991). However, it has previously been suggested that copepodid hooking on gills is an artefact of tank conditions (Bron et al. 1991; Tully and Nolan 2002). According to study results, the probability of the copepodids being inhaled by the fish is independent of the number of copepodids hooking to the fish. Thus, the number of copepodids settling in the gill chamber is approximately the same for each fish and does not influence the final number of hooked copepodids on the body. Therefore, the number of hooked copepodids in the gill can be isolated from the final data with the goal of specifically assessing the actual and regular hooking behaviour of *L. salmonis* copepodids, in various conditions.

This bioassay can be used to successfully evaluate the hooking behaviour of *L.* salmonis copepodids on Atlantic salmon, making it an interesting tool to screen several putative semiochemicals contributing to the communication between the parasite and the host. In this

case, solutions and controls would need to be tested at the same water temperature to avoid any bias in the bioassay. A part from testing candidate semiochemicals, the bioassay can also be used to investigate the influence of the physiological state of the host on copepodid hooking behavior. This bioassay might be applicable to other species of sea lice (*Caligus elongatus*, *Caligus rogercresseyi*, *Argulus japonicus*) as well as, other species of fish (*Oncorhynchus mykiss*, *Scophthalmus maximus*).

In conclusion, the bioassay provides an efficient and simple test for investigating the hooking behavior of the parasite *L. salmonis* on Atlantic salmon, and for subsequently screening candidate semiochemicals involved in the host-parasite interaction, or any treatment aiming to prevent the infestation.

Acknowledgements

We would like to thank B-V. Løvik and E-M. Sætre for their technical help in maintaining the fish and sea lice. We would like to thank E. Landen, a professional translator, Dr. M. Mengoli and Dr. P. Asproni for reviewing the manuscript. We are also grateful to IRSEA's Ethical Committee for their comments and the approval of the protocol.

References

Aaen S.M., Helgesen K.O., Bakke M.J., Kaur K. & Horsberg T.E. (2015) Drug resistance in sea lice: A threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology* **31**, 72–81.

Bailey R.J.E., Birkett M.A., Ingvarsdóttir A., Luntz A.J.M., Mordue W., Shea B.O., Pickett J.A. & Wadhams L.J. (2006) The role of semiochemicals in host location and non-host avoidance by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) copepodids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**, 448–456.

Boxaspen K. (2006) A review of the biology and genetics of sea lice. *ICES Journal of Marine Science* **63**, 1304–1316.

Bron J.E., Sommerville C., Jones M. & Rae G.H. (1991) The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis. *Journal of Zoology* **224**, 201–212.

Costello M.J. (2009) The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of fish diseases* **32**, 115–118.

Erikson U. & Misimi E. (2008) Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. *Journal of food science* **73**, C50–9.

Frederick C.A., Brady D. & Bricknell I.R. (2014) Determining the surface area of Atlantic salmon, Salmo salar. In: *The 10th International Sea Lice Conference*. p. 140. Portland.

Gjerde B., Ødegård J. & Thorland I. (2011) Estimates of genetic variation in the susceptibility of Atlantic salmon (Salmo salar) to the salmon louse Lepeophtheirus salmonis. *Aquaculture* **314**, 66–72.

Glover K.A., Nilsen F. & Skaala O. (2004) Individual variation in sea lice (Lepeophtheirus salmonis) infection on Atlantic salmon (Salmo salar). *Aquaculture* **241**, 701–709.

Gonzalez-Alanis P. (2000) Frontal Filament Morphogenesis in the Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis.

Hamre L.A., Eichner C., Caipang C.M.A., Dalvin S.T., Bron J.E., Nilsen F., Boxshall G. & Skern-Mauritzen R. (2013) The Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLOS ONE* **8**, 1–9.

Hastie L.C., Wallace C., Birkett M. a., Douglas a., Jones O., Mordue (Luntz) a. J., Ritchie G., Pickett J. a., Webster J.L. & Bowman a. S. (2013) Prevalence and infection intensity of sea lice (Lepeophtheirus salmonis) on Atlantic salmon (Salmo salar) host is reduced by the non-host compound 2-aminoacetophenone. *Aquaculture* **410-411**, 179–183.

Heuch P. a & Karlsen H.E. (1997) Detection of infrasonic water oscillations by copepodids of Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligida). *Journal of Plankton Research* **19**, 735–747.

Ingvarsdóttir A., Birkett M. a, Duce I., Genna R.L., Mordue W., Pickett J. a, Wadhams L.J. & Mordue a J. (2002) Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. *Pest management science* **58**, 537–45.

Johnson S.C. & Albright L.J. (1991) Development, Growth, and Survival of Lepeophtheirus Salmonis (Copepoda: Caligidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **71**, 425.

Johnson S.C., Treasurer J.W., Bravo S. & Nagasawa K. (2004) A Review of the Impact of Parasitic Copepods on Marine Aquaculture. *Zoological Studies* **43**, 229–243.

Kolstad K., Heuch P.A., Gjerde B., Gjedrem T. & Salte R. (2005) Genetic variation in resistance of Atlantic salmon (Salmo salar) to the salmon louse Lepeophtheirus salmonis. *Aquaculture* **247**, 145–151.

Lien A.M., Volent Z., Jensen Ø., Lader P. & Sunde L.M. (2014) Shielding skirt for prevention of salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) infestation on Atlantic salmon (Salmo salar L.) in cages - A scaled model experimental study on net and skirt deformation, total mooring load, and currents. *Aquacultural Engineering* **58**, 1–10.

Liu Y. & Bjelland H.V. (2014) Estimating costs of sea lice control strategy in Norway. *Preventive Veterinary Medicine* **117**, 469–477.

Mordue Luntz a J. & Birkett M. a (2009) A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, Lepeophtheirus salmonis (Caligidae: Copepoda). *Journal of fish diseases* **32**, 3–13.

Pike A.W. & Wadsworth S.L. (1999) Sealice on salmonids: their biology and control. *Advances in parasitology* **44**, 233–337.

Raynard R.S., Bricknell I.R., Billingsley P.F., Nisbet A.J., Vigneau A. & Sommerville C. (2002) Development of vaccines against sea lice. *Pest management science* **58**, 569–75.

Treasurer J.W. (2002) A review of potential pathogens of sea lice and the application of cleaner fish in biological control. *Pest management science* **58**, 546–58.

Tucker C.S., Sommerville C. & Wootten R. (2000) The effect of temperature and salinity on the settlement and survival of copepodids of Lepeophtheirus salmonis (Kroyer, 1837) on Atlantic salmon, Salmo salar L. *Journal of Fish Diseases* **23**, 309–320.

Tully O. & Nolan D.T. (2002) A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae). *Parasitology* **124 Suppl**, S165–82.

3. Conclusion de l'étude n°3

Ce test *in vivo* permet l'étude du comportement d'attachement des copépodites de *L. salmonis* sur le saumon Atlantique. L'attractivité du saumon pour le parasite est ainsi évaluée par le nombre de copépodites attachés sur le corps du poisson en fin de test. Ce test va permettre d'étudier différentes situations pouvant augmenter ou au contraire réduire cette attractivité du saumon pour le parasite (sémiochimique, état physiologique du saumon, parasiticide, etc…).

Conformément à nos objectifs, ce test va nous permettre de tester des saumons en état de stress aigu ou chronique sur leur attractivité pour le parasite *L. salmonis*.

4. Présentation de l'étude n°4

Durant le cycle de production des saumons en eau salée, les poissons sont soumis à des manipulations, notamment lors des contrôles et traitements des parasites (Ashley 2007; Norwegian Institute of Public Health 2014). A partir de cette situation, le but de cette étude est de présenter l'effet d'un stress aigu généré par une manipulation des saumons sur le taux de parasitisme par *Lepeophtheirus salmonis*. Plus précisément, nous nous intéressons ici à l'attractivité des saumons manipulés pour les copépodites (stade infestant du parasite) de *Lepeophtheirus salmonis*.

L'étude est réalisée à partir de smolts de saumon Atlantique transférés en eau salé un mois avant le début de l'expérience. Les smolts sont allotés en 16 groupes de 4 poissons et logés dans des tanks de 30L continuellement alimentés en eau salée directement pompée dans le fjord (Tresfjorden, Vikebukt, Norvège). Les poissons de 8 groupes sur 16 sont capturés avec une épuisette et mis hors de l'eau durant 15 s. Le taux total de cortisol plasmatique est mesuré sur 4 groupes (2 manipulés et 2 témoins) 1h après la manipulation. Pour les autres groupes (6 manipulés et 6 témoins), 120 copépodites de *Lepeophtheirus salmonis* sont ajoutés dans chaque tank, 30 min après la manipulation. 60 min après l'introduction des copépodites, le nombre de parasites attachés sur les poissons est mesuré pour chaque tank.

Comme attendu, 1h après la manipulation, un pic du taux de cortisol est mesuré chez les saumons. L'étude montre également un nombre de parasites attachés significativement plus élevé chez les saumons manipulés que chez les saumons témoins.

5. Etude n°4 :

Article à soumettre pour publication dans *Aquaculture* :

Delfosse C, Pageat P, Lafont-Lecuelle C, Cozzi A, Bienboire-Frosini C. **Handling procedures make Atlantic salmon (*Salmo salar*) more attractive to *Lepeophtheirus salmonis* copepodids.**

Handling procedures make Atlantic salmon (*Salmo salar*) more attractive to *Lepeophtheirus salmonis* copepodids

Authors

Cyril Delfosse[ab], Patrick Pageat[ab], Céline Lafont-Lecuelle[a], Alessandro Cozzi[a], Cécile Bienboire-Frosini[a]

Location

[a] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology (IRSEA) Route du Chêne, Quartier Salignan 84400 Apt, France

[b] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology – Aquaculture Research Centre (IRSEA-ARC) Daugstad 6392 Vikebukt, Norway

Correspondence

Cyril Delfosse; Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology (IRSEA) Route du Chêne, Quartier Salignan 84400 Apt, France; Tel.: +33 4 90 75 06 15; Fax: +33 (0)4 90 05 84 47 ; E-mail address: c.delfosse@group-irsea.com

Running title

Handling increases attractiveness to ectoparasite in salmon

Abstract

Lepeophtheirus salmonis is a crustacean ectoparasite present in several salmonids capable of causing severe damage to Atlantic salmon production. During the production cycle, salmons are sometimes handled and took out the water, be it for the transportation of smolts to sea-

farm or for treatments against sea lice. These handling procedures are denounced as being stressful to the fish, but their effect on the parasitic infestation has never been studied. The purpose of the present work was thus to study the effect of handling procedures on the tendency of Atlantic salmon to attract *L. salmonis* copepodids. A group of handled salmon (maintained 15 seconds out of the water) was compared to a control group based on cortisol level and the number of *L. salmonis* that subsequently became attached. Handled salmon showed significantly higher total plasma cortisol levels ($p < 0.001$) and higher numbers of attached copepodids ($p = 0.01$) than control salmon. Even if the role of cortisol in this mechanism requires further clarification, the study demonstrates that handled salmon are more attractive to *L. salmonis*. This finding is denounced here as paradoxical, given that most of the current treatments against the parasite used in the salmon industry require these handlings.

Key-words

attractiveness; cortisol; handling; infestation behavior; sea lice; stress.

Key findings

Handled salmon are more attractive to *Lepeophtheirus salmonis* copepodids; handling procedures are common in salmon production; the higher cortisol levels in handled salmons could play a role in the attractiveness to sea lice.

Introduction

Lepeophtheirus salmonis is a crustacean caligid ectoparasite found in many salmonids and belonging to the group commonly named "sea lice," which contains all the caligid ectoparasites of fish (Pike and Wadsworth 1999; Tully and Nolan 2002; Boxaspen 2006). The

life cycle of *L. salmonis* is composed of 8 stages: 2 free-swimming stages (Nauplius I & II), 1 infestation stage (Copepodid) and 5 parasitic stages (Chalimus I & II, Pre-adult I & II and Adult) (Hamre et al. 2013). In salmon production, sea lice are responsible for significant costs, inducing financial loss to the industrial economy in the main producer countries, like Norway and Chile (Johnson et al. 2004; Costello 2009; Torrissen et al. 2013; Liu and Bjelland 2014). Indeed, sea louse infestations may cause a reduction in growth rate and increase mortality and secondary infections in Atlantic salmon (Pike and Wadsworth 1999; Johnson et al. 2004).

On many occasions, sea-farmed salmons are brought to be handled and taken out the water to perform the usual fish maintenance. Treatment against sea lice (mostly peroxide hydrogen treatment), controls of the sea lice number of fish and transportation of the smolts to the sea-farm are some examples (Johnson et al. 2004; Ashley 2007; Torrissen et al. 2013; Norwegian Institute of Public Health 2014). These handling procedures have already been demonstrated to be stressful situations resulting in an activation of the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal axis (i.e. cortisol level increase) (Sigholt et al. 1997; Fast et al. 2008; Erikson and Misimi 2008b; Merkin et al. 2010). However, the consequences of these handling procedures on host-parasite interactions have never been studied. This host-parasite interaction is mostly important during the infestation phase. The copepodid's infestation behavior is triggered by both physical and chemical stimuli (Mordue Luntz and Birkett 2009). Some of the semiochemicals released by the mucus of fish have already been demonstrated to be involved in host recognition (Ingvarsdóttir et al. 2002; Bailey et al. 2006; Pino-Marambio et al. 2007; Mordue Luntz and Birkett 2009; Delfosse and Pageat 2014; Pageat and Delfosse 2014). The aim of the study was thus to measure the attractiveness of Atlantic salmon subjected to a handling procedure, to the *L. salmonis* copepodid. To carry out the experiment, a group of

handled salmon was compared to a control group based on the number of attached copepodids and on cortisol levels to investigate the impact of the stressful handling procedure.

Materials and Methods

Experimental animals

This study was conducted under the approval of the Ethical Committee of IRSEA (n°125), and in accordance with the European Directive 2010/63/UE for the protection of laboratory animals. Atlantic salmon were obtained in a farm (SALMAR®, Vikebukt, Norway) three weeks before the beginning of the experiment and were transferred directly from freshwater to seawater in the laboratory (i.e. smoltification). Smolts were kept in a single 180-liter holding tank continuously supplied with filtered seawater (10 l min^{-1}, 8 °C) pumped from Tresfjorden (62°32'25.5"N 7°08'18.1"E, Vikebukt, Norway). Salmon were reared under conditions of continuous light and fed ad libitum with commercial dry pellets (Skretting AS©, Norway). L. salmonis copepodids (Ilab©, Norway) were held in a net-bucket system continuously supplied with filtered seawater (0.1 l min^{-1}, 8 °C) and under continuous light.

Handling-related stress induction

At T_0, 64 Atlantic salmon smolts (94.1±1.9 g) from the holding tank were introduced into 16 tanks (50 x 50 x 12 cm^3) (4 fish per tank). Each tank was continuously supplied with seawater (5 l min^{-1}, 8 °C, continuous light). At T_1, 20 h after the transfer, the 4 fish from 8 tanks were captured using a landing net and removed from the water for 15 s, as described by Fast et al. (2008). The fish from the other tanks were not handled.

Total plasma cortisol level measurement

Thus, 60 min after the handling procedure, the 16 fish from four tanks (2 handled tanks and 2 control tanks) were transferred into a bath of lethal anesthetic (0.66 ml l^{-1} Benzoak®). A blood sample was taken from the caudal vein of the fish using a 2.5 ml-syringe and a 23G x 1'' needle. The blood was transferred to a 4 ml-heparinized tube and stored in ice before centrifugation. Plasma was separated by centrifugation of blood samples (2500 x g for 15 min) at 4 °C, removed and aliquoted into 1.5 ml microcentrifuge tubes. Samples were stored at -18 °C prior to subsequent analysis. Total plasma cortisol levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), according to the manufacturer's indications, with a sensitivity of 56.72 pg ml^{-1}. Although the cortisol molecule is identical in all species, a validation of this ELISA kit was necessary because of putative interferences in the assay (matrix effect) due to the variable composition of plasmas from different species, as highlighted by Sink et al. (2008) for fish plasmas. The results of these tests (mean CV % = 4.8 %; mean % recovery = 102 %) were satisfactory (European Medicines Agency 2011), thus indicating the absence of a matrix effect and validating the use of this ELISA kit for assaying cortisol in salmon plasmas.

The samples from the present study were then prepared according to the validated procedure (working dilution 1:25) and read at 405 nm in a microplate reader (ELx800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments). Blank-corrected data were converted into concentrations with Gen5 data reduction software (Biotek Instruments) using a four-parameter logistic curve-fitting program. Values were multiplied by their dilution factor to obtain actual total plasma cortisol concentration and expressed in ng ml^{-1}.

Infestation test

In the same time, 30 min after the handling procedure, 1440 copepodids *L. salmonis* were introduced in the 12 other tanks (6 handled and 6 controls, 120 copepodids per tank).

Copepodids were accurately counted under binocular magnifier by sharing them in the wells of an ELISA plate using Pasteur pipettes. Then, 60 min after that infestation procedure, the fish from the 12 infested tanks were transferred to a bath of lethal anesthetic (0.66 ml l^{-1} Benzoak®). The body of each fish was scrubbed above a plastic bag. The content of the bag was then filtered to count the number of copepodids attached to each fish using a magnifying glass.

Statistical analysis

In this study, the experimental unit corresponds to the fish for the cortisol measurement and to the tank for the infestation test, the number of attached copepodids being dependent among fish in the same tank. Means number of attached copepodids were computed for the four salmon contained in each tank regarding the infestation test. Data was analyzed using 9.4 SAS software (2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The comparison of plasma cortisol concentrations and number of attached copepodids between handled and control groups was carried out using a Wilcoxon Two-Sample Test in SAS 9.4 software. The significance threshold was conventionally set at 5%.

Results

Results from the total plasma cortisol levels and the number of attached copepodids obtained from the two treatment groups are indicated in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. In handled salmon, the mean total plasma cortisol concentration was 195.62±21.95 ng ml^{-1}, compared to 33.23±9.72 ng ml^{-1} for the control group. The Wilcoxon two-sample test showed that total plasma cortisol concentration was statistically higher in handled subjects (median = 190.7) than in control subjects (median = 33.5) ($p < 0.001$).

The number of attached copepodids in handled-fish tanks was 9.42±0.65 and 7.08±0.35 in control-fish tanks. The number of attached copepodids was thus statistically higher in handled-fish tanks (median = 9.5) than in control tanks (median = 7.1) ($p = 0.01$).

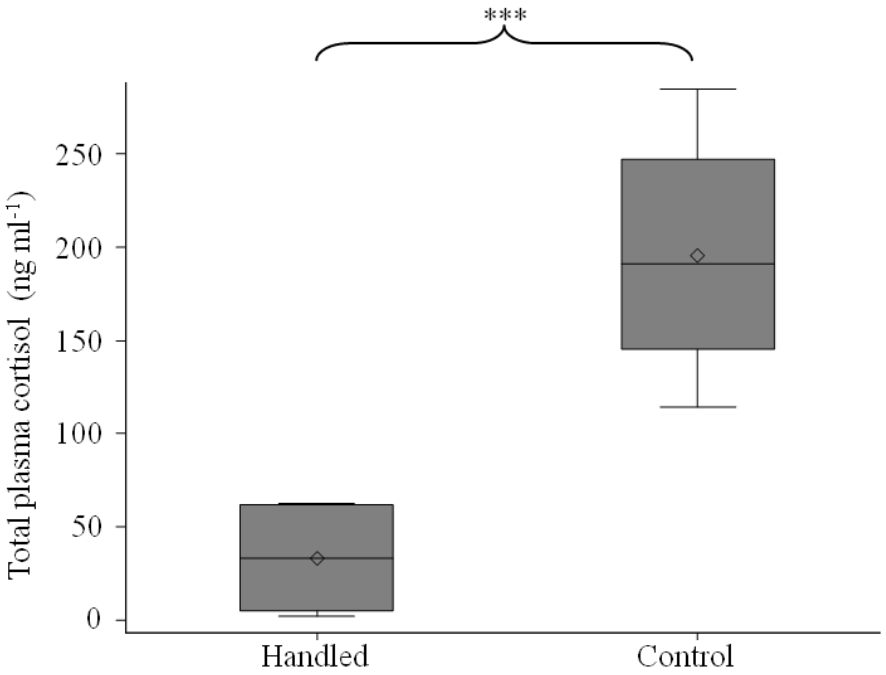

Figure 1: Boxplot of total plasma cortisol concentration of Atlantic salmon subjected to a handling procedure and controls. (***) indicates statistically significant differences between the two groups ($Z = 3.31$, $p < 0.001$; $n = 8$).

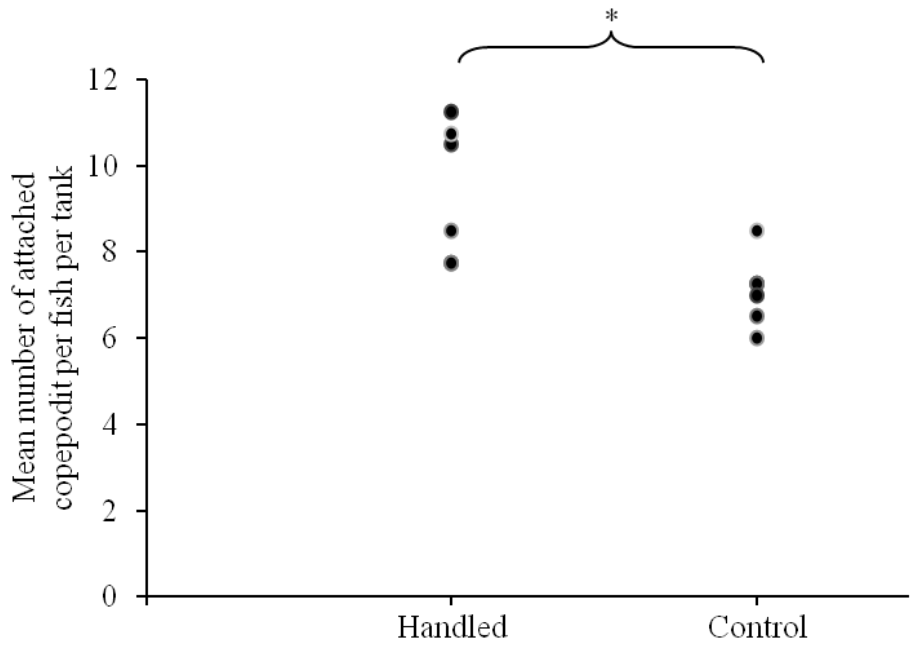

Figure 2: Scatterplot of the number of attached *L. salmonis* copepodid per fish and per tank in the handled and control Atlantic salmon groups. (*) indicates statistically significant differences between the two groups ($Z = 2.41$; $p = 0.02$; $n = 6$).

Discussion

This study appears to be the first to examine the effect of handling procedures on the tendency of the *L. salmonis* copepodid to attach to Atlantic salmon. The results showed that handled salmon subjected to a typical infestation presented a higher number of attached *L. salmonis* copepodids, compared to unhandled control salmons. This is problematic as handling procedures are common during the production cycle of Atlantic salmon, and especially in the control procedures (treatments and counts) of the parasite *L. salmonis* (Pike and Wadsworth 1999; Shao 2001; Burridge et al. 2010).

In the present study, all the smolts came directly from freshwater and were transferred and reared in filtered seawater in the laboratory to avoid infestation by *L. salmonis* coming from outside the experiment. The mean number of attached copepodids per fish (approximately 30% of introduced copepodids) can be considered to be consistent with other studies carried out under these conditions (Delfosse and Pageat 2014; Pageat and Delfosse 2014).

Among the mechanisms driving handled salmon to be more sensitive to parasitism, the elevation of total plasma cortisol may play a role by modifying the release of semiochemicals from the salmon's mucus. Indeed, in a preliminary experiment which aimed to confirm the effect of handling procedures on cortisol level, handled salmon presented higher total plasma cortisol level than controls. The handling procedure used in this study was performed by Fast et al. (2008) to study the physiological response of Atlantic salmon after an acute stress. In the present study, as in Fast et al. (2008), handled salmons experienced an acute stress and presented higher total plasma cortisol levels than control smolts, 1 h after the handling procedure. A previous study showed that handled salmon with higher plasma cortisol levels present changes in mucus composition, and especially in mucus proteins as a consequence of an increase in protease activity (Easy and Ross 2010). This supports the idea that *L. salmonis* copepodids more readily attach to salmon because of this change in mucus composition and particularly the release of semiochemicals.

The hypothesis of this study supports the idea that stressed fish are more attractive to ectoparasites, and the results demonstrate this effect in the case of an acute stress. Mackinnon (1998) has suggested that Atlantic salmon under chronic stress are more likely to be infested by *L. salmonis*. In further studies, it could be of interest to investigate the influence of chronic stress in Atlantic salmon on the infesting behavior of *L. salmonis* copepodids.

Another cause driving handled salmons to be more attractive to copepodids might be the abrasions due to netting. Handling procedures may induce the loss of scales and mucus in salmons. Handled salmon could thus be more attractive to parasites because of this deterioration of the natural barriers and the putative alteration of the mucus semiochemicals involved in modulating the interaction with the copepodid. In further studies, it may be of interest to analyze the mucus composition and measure the quality of the scales' appearance in handled and unhandled smolts to verify these hypotheses.

This study shows that handling procedures influence the attractiveness of Atlantic salmon to *L. salmonis* copepodids and investigates the increase of plasma cortisol as one possible etiology. Even if the exact mechanisms are not well known, handled salmon did present a higher number of attached *L. salmonis* copepodids than controls. This finding is denounced here as paradoxical given that most of the current treatments against the parasite used in the salmon industry require such handling. The present study supports the idea that innovative treatments to fight *L. salmonis* must be applied without handling the fish, as recently suggested by the authors (Pageat and Delfosse, 2014), using treatments based on semiochemistry.

Acknowledgements

Thank you to B.V. Løvik and L. Clavier for their technical help during the trial. We would like to thank E. Landen, a professional translator, and Dr. P. Asproni for reviewing the manuscript. We are also grateful to IRSEA's Ethical Committee for their comments on the protocol.

Financial Support

This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors.

References

Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science 104, 199–235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001

Bailey, R.J.E., Birkett, M.A., Ingvarsdóttir, A., Luntz, A.J.M., Mordue, W., Shea, B.O., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., 2006. The role of semiochemicals in host location and non-host avoidance by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) copepodids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 63, 448–456. doi:10.1139/F05-231

Boxaspen, K., 2006. A review of the biology and genetics of sea lice. ICES Journal of Marine Science 63, 1304–1316. doi:10.1016/j.icesjms.2006.04.017

Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 306, 7–23. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.05.020

Costello, M.J., 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. Journal of fish diseases 32, 115–8. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x

Delfosse, C., Pageat, P., 2014. Evidence of the effect of S.C.A.I.S (Sealice Copepodid Attachment Inhibiting Semiochemical) on the infesting behavior of Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results, in: Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference. Portland, p. 27.

Easy, R.H., Ross, N.W., 2010. Changes in Atlantic salmon Salmo salar mucus components following short- and long-term handling stress. Journal of fish biology 77, 1616–31. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02796.x

Erikson, U., Misimi, E., 2008. Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. Journal of food science 73, C50–9. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00617.x

European Medicines Agency, 2011. Guideline on bioanalytical method validation. London.

Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C., Afonso, L.O.B., 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (Salmo salar Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. Fish & shellfish immunology 24, 194–204. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.009

Hamre, L.A., Eichner, C., Caipang, C.M.A., Dalvin, S.T., Bron, J.E., Nilsen, F., Boxshall, G., Skern-Mauritzen, R., 2013. The Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. PLoS ONE 8, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0073539

Ingvarsdóttir, A., Birkett, M. a, Duce, I., Genna, R.L., Mordue, W., Pickett, J. a, Wadhams, L.J., Mordue, a J., 2002. Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. Pest management science 58, 537–45. doi:10.1002/ps.510

Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., 2004. A Review of the Impact of Parasitic Copepods on Marine Aquaculture. Zoological Studies 43, 229–243.

Liu, Y., Bjelland, H.V., 2014. Estimating costs of sea lice control strategy in Norway. Preventive Veterinary Medicine 117, 469–477. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.08.018

Mackinnon, B.M., 1998. Host factors important in sea lice infections. Journal of Marine Science 55, 188–192.

Merkin, G. V., Roth, B., Gjerstad, C., Dahl-Paulsen, E., Nortvedt, R., 2010. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed

rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture 309, 231–235. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.08.025

Mordue Luntz, a J., Birkett, M. a, 2009. A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, Lepeophtheirus salmonis (Caligidae: Copepoda). Journal of fish diseases 32, 3–13. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.01004.x

Norwegian Institute of Public Health, 2014. Increased use of medicines in Norwegian fish farming.

Pageat, P., Delfosse, C., 2014. Effects of a salmon semiochemical on the infestation by Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results, in: Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference. Portland, p. 26.

Pike, A.W., Wadsworth, S.L., 1999. Sealice on salmonids: their biology and control. Advances in parasitology 44, 233–337.

Pino-Marambio, J., Mordue (Luntz), a. J., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, a., Quiroz, a., 2007. Behavioural studies of host, non-host and mate location by the Sea Louse, Caligus rogercresseyi Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). Aquaculture 271, 70–76. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.025

Shao, Z.J., 2001. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. Advanced drug delivery reviews 50, 229–43.

Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T.S., Seland, A., 1997. Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (Salmo Salar). Statistics 62, 898–905.

Sink, T.D., Lochmann, R.T., Fecteau, K.A., 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish physiology and biochemistry 34, 95–101. doi:10.1007/s10695-007-9150-9

Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, a., Skilbrei, O.T., Nilsen, F., Horsberg, T.E., Jackson, D., 2013. Salmon lice - impact on wild salmonids and salmon aquaculture. Journal of Fish Diseases 36, 171–194. doi:10.1111/jfd.12061

Tully, O., Nolan, D.T., 2002. A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae). Parasitology 124 Suppl, S165–82.

6. Conclusion de l'étude n°4

Notre étude montre ici clairement que les saumons soumis à un stress de manipulation sont plus attractifs pour les parasites *Lepeophtheirus salmonis* que les saumons témoins. Le taux de cortisol étant également plus élevé pour ces saumons manipulés, on pourrait supposer son implication dans cette augmentation de l'attractivité. Il n'est toutefois pas à exclure l'effet de la perte d'écailles et de mucus des saumons manipulés qui pourraient également favoriser cette attractivité. L'étude démontre ici une situation paradoxale de l'élevage où les saumons manipulés pour les traiter contre *L. salmonis* sont plus attractifs pour ce parasite dans l'heure suivante.

7. Présentation de l'étude n°5

Le but de cette étude est d'évaluer l'attractivité de saumons Atlantique en situation de stress chronique pour le parasite *Lepeophtheirus salmonis*.

Les smolts de saumon Atlantique sont séparés en 2 groupes de 16 poissons et logés dans des tanks de 180 L continuellement alimentés avec l'eau du Fjord (Tresfjorden, Vikebukt, Norvège). Dans l'un des 2 tanks, un dispositif permet de confiner les poissons dans le fond du tank sans accès à la surface (sauf 2 fois 1 h par jour) afin de générer un stress chronique. 5 jours après, le taux total de cortisol plasmatique, le pourcentage de lymphocyte, le pourcentage de neutrophile et le ratio neutrophiles/lymphocytes sont mesurés à partir de 8 smolts de chaque tank (confiné et témoin). Les 8 autres poissons de chaque tank sont alors soumis un par un dans un test d'infestation standardisé (décrit dans l'étude n°3) à la fin duquel le nombre de copépodites attachés par poisson est noté.

Comme attendu, le confinement a engendré un état de stress chronique chez nos poissons, caractérisé par un taux de cortisol au niveau basal, une lymphopénie et une neutrophilie. En revanche, le nombre de copépodites attachés sur les saumons confinés et témoins est similaire.

8. Etude n°5 :

Article à soumettre pour publication dans *Aquaculture* :

Delfosse C, Bienboire-Frosini C, Lafont-Lecuelle C, Asproni P, Chabaud C, Cozzi A, Pageat P. **Are chronically stressed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) more attractive to the copepodid of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)?**

Are chronically stressed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) more attractive to the copepodid of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)?

Authors

Cyril Delfosse[ab], Cécile Bienboire-Frosini[a], Céline Lafont-Lecuelle[a], Pietro Asproni[a], Camille Chabaud[a], Alessandro Cozzi[a], Patrick Pageat[ab]

Location

[a] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology (IRSEA) Route du Chêne, Quartier Salignan 84400 Apt, France

[b] Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology – Aquaculture Research Centre (IRSEA-ARC) Daugstad 6392 Vikebukt, Norway

Correspondence

Cyril Delfosse; Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology (IRSEA) Route du Chêne, Quartier Salignan 84400 Apt, France; Tel.: +33 4 90 75 06 15; Fax: +33 (0)4 90 05 84 47 ; E-mail address: c.delfosse@group-irsea.com

Running title

Chronic stress and attractiveness to salmon sea louse

Abstract

Many events during salmon production can be considered as stressful and induce a chronic stress state in fish. *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) is an ectoparasite capable of causing severe damage to Atlantic salmon production. The aim of this study was to examine the

influence of chronic stress on the attractiveness of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to the *Lepeophtheirus salmonis* copepodid during a standardized infestation test. To carry out the experiment, a group of chronically confined salmon (n=8) was compared to a control group (n=8) based on the number of attached copepodids, cortisol level, neutrophil%, lymphocyte% and neutrophil/lymphocyte ratio. The cortisol level was not significantly different between the two groups (p>0.05). The neutrophil% was significantly higher (p=0.0013) and the lymphocyte% significantly lower (p=0.0013) in chronically confined salmon when compared to control subjects. However, the number of attached copepodids did not vary between chronically confined and control salmon (p>0.05). Thus, while the experimental salmon showed clear signs of chronic stress (immune depression), this had no bearing on their attractiveness to copepodids when compared with control salmon. To further clarify these results, it may be of interest to measure infestation rates by counting the number of transformed chalimus, the next stage of development.

Key-words

Atlantic salmon; attractiveness; chronic stress; copepodid; lymphocyte; sea louse

Introduction

The sea louse *Lepeophtheirus salmonis* is a crustacean ectoparasite found in many salmonids and more specifically in Atlantic salmon (Pike and Wadsworth 1999; Tully and Nolan 2002; Boxaspen 2006). The life cycle of *Lepeophtheirus salmonis* is composed of 8 stages: 2 free-swimming stages (Nauplius I & II), 1 infestation stage (Copepodid) and 5 parasitic stages (Chalimus I & II, Pre-adult I & II and Adult) (Hamre et al. 2013). In salmon production, sea lice are responsible for significant costs, inducing financial loss to the industrial economy in the main producer countries, like Norway and Chile (Johnson et al. 2004; Costello 2009; Liu

and Bjelland 2014). Sea louse infestations may cause a reduction in growth rate and an increase in mortality and secondary infections in Atlantic salmon (Pike and Wadsworth 1999; Johnson et al. 2004).

During rearing, fish are subjected to numerous external stress factors such as transport, vaccination, disease and predation (Ashley 2007). One of the primary responses to acute stress in fish is the release of cortisol in the circulatory system by the interrenal cells (Mommsen et al. 1999). This glucocorticoïd hormone triggers neoglucogenesis, resulting in the release of glucose from the liver (Mommsen et al. 1999). The glucose increases free energy in the organism, and allows the fish to cope with the stressful event (Iwama et al. 2005). Chronic stress, like social interactions (Gilmour et al. 2005), stocking density (Turnbull et al. 2005) and parasitism (Torrissen et al. 2013), may induce several forms of metabolic impairment, such as a decrease in growth performance (Fevolden *et al* 2002, Basrur *et al* 2010, Gregory & Wood 1999, Barton *et al* 1987, McCormick *et al* 1998), immune suppression (Fast *et al* 2008), a decrease in liver weight (Barton *et al* 1987, Basrur *et al* 2010), or an increase in mortality (Pickering & Pottinger 1989, Gregory & Wood 1999, Gilmour *et al* 2005). Because chronic stress alters a large number of physiological parameters, it may be of interest to examine its influence on the infestation of Atlantic salmon by the sea louse *Lepeophtheirus salmonis*.

The aim of this study was to measure the impact of chronic stress on the attractiveness of Atlantic salmon to the *L. salmonis* copepodid. To carry out the experiment, a group of salmons was continuously exposed to a standardized stress paradigm (confinement); the group was then compared to a control group during a standardized infestation test. The degree of stress experienced by the fish during the program was evaluated by measuring certain blood parameters (cortisol, neutrophil and lymphocyte) and the attractiveness of the fish was evaluated by counting the number of attached copepodids following the infestation test.

Materials and Methods

Experimental animals

This study was conducted under the approval of the Ethical Committee of IRSEA (n°125), and in accordance with the European Directive 2010/63/UE for the protection of laboratory animals. Atlantic salmon were transferred from a farm (SALMAR®, Vikebukt, Norway) three weeks before the beginning of the experiment and were transferred directly from freshwater to seawater in the laboratory (i.e. smoltification). Salmon smolts were kept in two 180-liter holding tanks (16 smolts per tank) continuously supplied with filtered seawater (5 l min^{-1}, 9.5 °C) pumped from Tresfjorden (62°32'25.5"N 7°08'18.1"E, Vikebukt, Norway). Salmon were reared in continuous light and fed ad libitum with commercial dry pellets (Skretting AS©, Norway).

L. salmonis copepodids (Ilab©, Norway) were held in a net-bucket system continuously supplied with filtered seawater (0.1 l min^{-1}, 8 °C) under continuous light.

Stress paradigm

The stress paradigm was applied in one of the two holding tanks. The 16 Atlantic salmon smolts from this tank were chronically confined by restraining their space and by continuously preventing them from rising to the surface (and filling their air bladder). The fish were allowed to surface for only 2 hours per day (randomly 1 h in the morning and 1 h in the afternoon). This procedure was applied for 5 days (from D_0 to D_4).

Blood parameter measurement

On D_5, 8 smolts from each tank were removed and introduced in a lethal bath of anaesthetic (Benzoak®, 0.7 ml l^{-1}). A blood sample was performed in the caudal vein of each fish. A drop

of blood was used to make a blood smear; the rest of the blood was injected into heparinised tubes and stored at 4 °C before centrifugation. Total plasma cortisol level, lymphocyte percentage, neutrophil percentage and neutrophil/lymphocyte ratio were measured in each of the samples.

Plasma was separated by centrifugation (2500 x g for 12 min) at 4 °C, removed and aliquoted into 1.5 ml microcentrifuge tubes. Samples were stored at -18 °C prior to subsequent analysis. Total plasma cortisol levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), according to the manufacturer's indications, with a sensitivity of 56.72 pg ml^{-1}. Although the cortisol molecule is identical in all species, a validation of this ELISA kit was necessary because of putative interferences in the assay (matrix effect) due to the variable composition of plasmas from different species, as highlighted by Sink et al. (2008) for fish plasmas. The results (mean CV % = 4.8 %; mean % recovery = 102 %) were satisfactory (European Medicines Agency 2011), thus indicating the absence of a matrix effect and validating the use of this ELISA kit for assaying cortisol in salmon plasmas.

The samples from the present study were then prepared according to the validated procedure (working dilution 1:25) and read at 405 nm in a microplate reader (ELx800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments). Blank-corrected data were converted into concentrations using the Gen5 data reduction software (Biotek Instruments) utilizing a four-parameter logistic curve-fitting program. Values were multiplied by their dilution factor to obtain actual total plasma cortisol concentration and expressed in ng ml^{-1}.

Blood smears were stained with a commercial May-Grunwald and Giemsa kit (RAL 555 KIT, RAL Diagnostics, Martillac, France) and each blood smear was read by two blinded operators. In each sample, a total of 100 cellules (lymphocytes and neutrophils) were read.

Lymphocyte percentage, neutrophil percentage and the neutrophil/lymphocyte ratio were calculating by taking the mean value of the two operators' measurement.

Infestation test

The salmon involved in the infestation test were different from the salmon used for blood samples but came from the same holding tanks. The infestation test was performed in flat beakers (3.5 l, Ø 23 cm) (**Figure 1**). The beakers were supplied with 3.5 l of seawater and were equipped with valves that allowed 0.875 l of the contents to be emptied over 10 min. At D_5, right after the blood sampling, 8 Atlantic salmon smolts (137.8±10.6 g) from each of the holding tanks were placed into the 16 flat beakers, and the beaker valves were turned on. Ten minutes later, the valves were turned off and 0.875 l of seawater was added into each flat beaker. Previously counted under a binocular microscope, 60 *Lepeophtheirus salmonis* copepodids were injected into each flat beaker. Five minutes after the introduction of copepodids, the valves were turned on. The flat beakers were supplied with 0.875 l of seawater a total of 4 times at 10 min intervals. Then, 55 min after the introduction of fish in the test and 45 min after the introduction of copepodids, 2 ml of anaesthetic (Benzoak®, lethal dose) were injected into each flat beaker. Fish were then kept in a plastic bag. The whole body of each fish, from the front of the head down to the tail, was scrubbed with a spoon, and rinsed above the plastic bag. In order to harvest the totality of the attached copepodids, this manipulation was repeated 3 times for each fish. The content of the plastic bag was then filtered and the number of copepodids was counted.

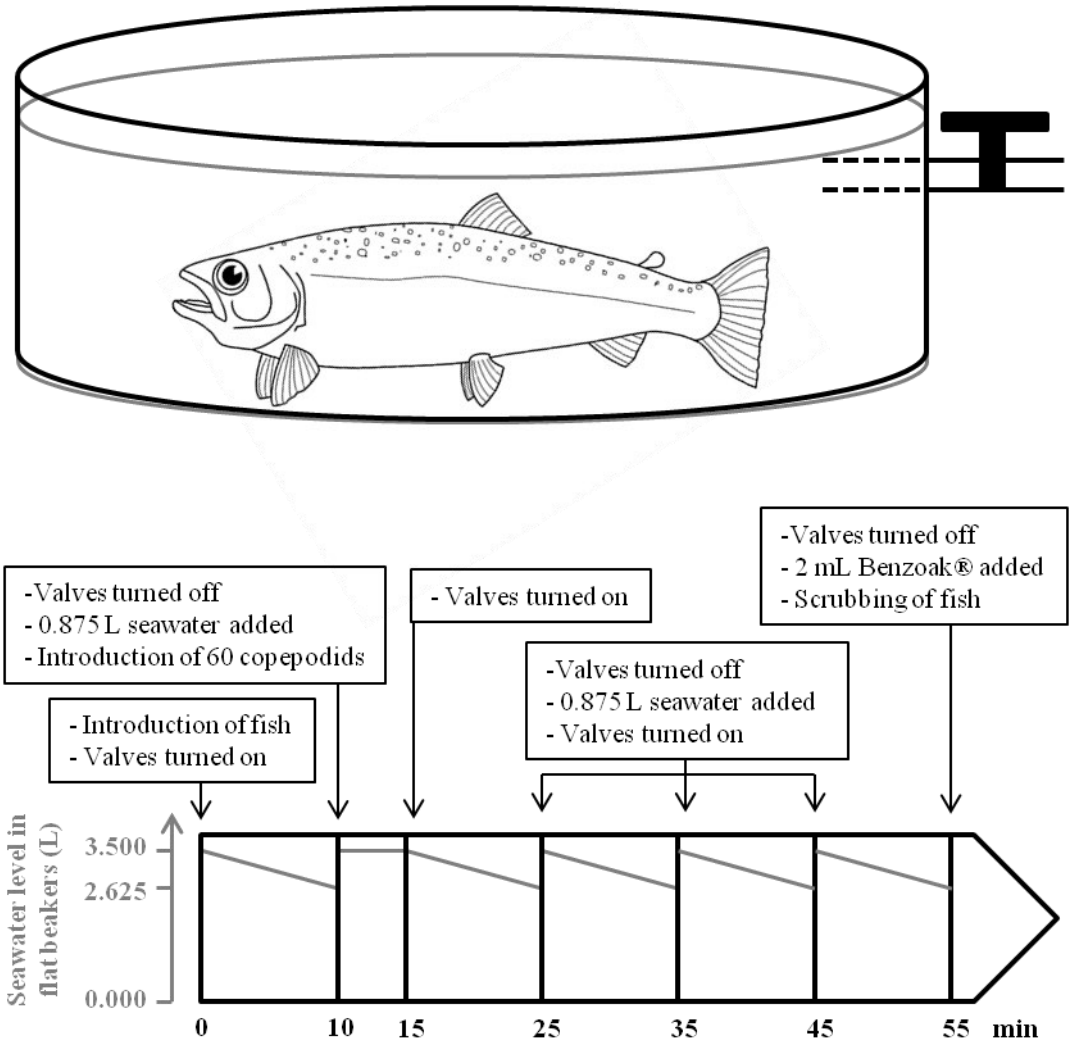

Figure 1: Chronology of the standardized infestation test applied in 16 flat beakers (n = 8).

Statistical analysis

Data were analyzed using SAS 9.4 software (2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All data were tested for evidence of departures from the assumption of normality using residual diagnostic plots and the *univariate* procedure in SAS. The assumption of homoscedasticity was verified with a Fisher test available in the *ttest* procedure of SAS. Comparisons were made between chronically confined and control salmon for all the parameters measured using a Wilcoxon two-sample test and *npar1way* procedure or using a

Student t test and the *ttest* procedure according to normality and homoscedasticity. The significance threshold was conventionally set at 5%.

Results

Regarding the physiological parameters, the results of the comparison between chronically confined and control salmon are indicated in **Table I** and **Figure 2**. In confined salmon, the mean total plasma cortisol concentration was 13.69±6.83 ng ml^{-1}, compared to 5.99±1.51 ng ml^{-1} for the control group. The Wilcoxon two-sample test showed no statistical difference in total plasma cortisol concentration between confined subjects (median = 4.89) and control subjects (median = 4.24) (p = 0.71). Regarding the blood components, the mean neutrophil/lymphocyte ratio was 0.29±0.03 for the confined salmons and 0.17±0.01 for the control subjects. The ratio was statistically higher in the chronically confined group than in the control one (**Table I**). The results also showed that the lymphocyte% was significantly lower, and the neutrophil% significantly higher, in the chronically confined salmon than in control subjects (**Table I**).

For the infestation test, the mean number of attached copepodids was 12.7±1.8 for the chronically confined salmons compared to 11.6±1.4 for the control salmon. The Student t test showed no significant difference between the two groups for the number of attached copepodids (p = 0.6283) (**Figure 3**).

Table I: Mean±SE or Median of blood parameters measured in chronically confined and control Atlantic salmons (n = 8).

	Chronically confined	Control	Statistic value	*DF*	*p-value*
Lymphocyte%	77.55±1.69	85.10±0.82	$\|t\|$ = 4.01	14	0.0013
Neutrophil%	22.45±1.69	14.90±0.82	$\|t\|$ = 4.01	14	0.0013
H/L	Med = 0.26	Med = 0.18	$\|Z\|$ = 3.20	-	0.0014

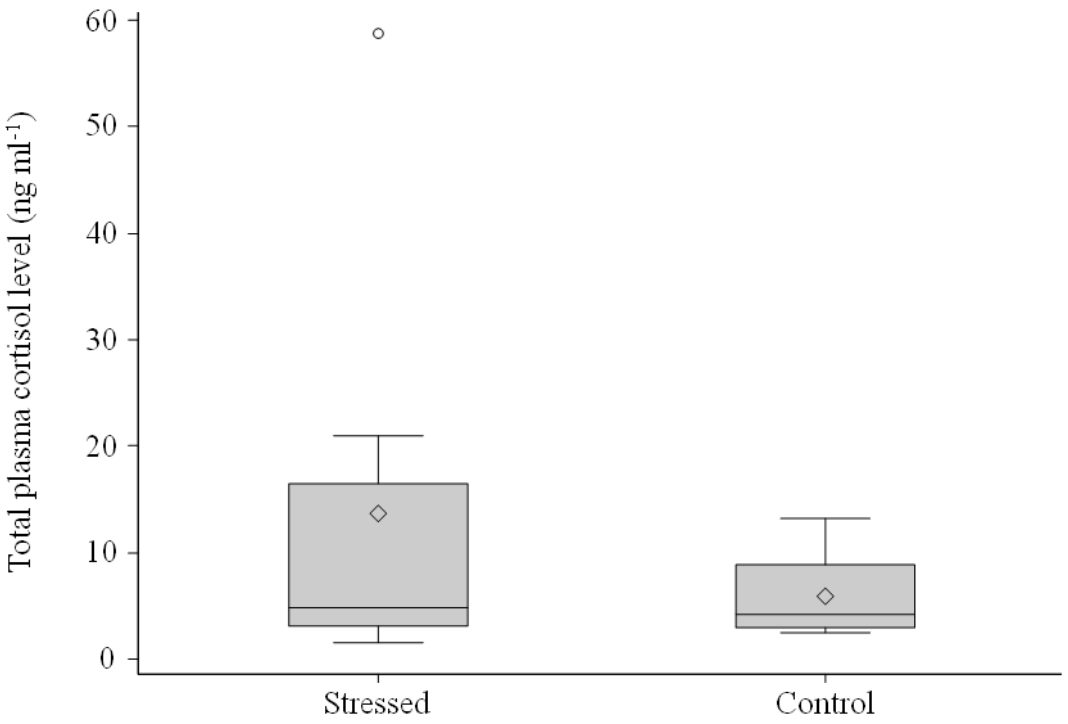

Figure 2: Boxplot of the total plasma cortisol level of chronically confined and control Atlantic salmons. No significant difference was observed between the 2 groups ($|Z| = 0.3676$; $p = 0.7132$; n =8).

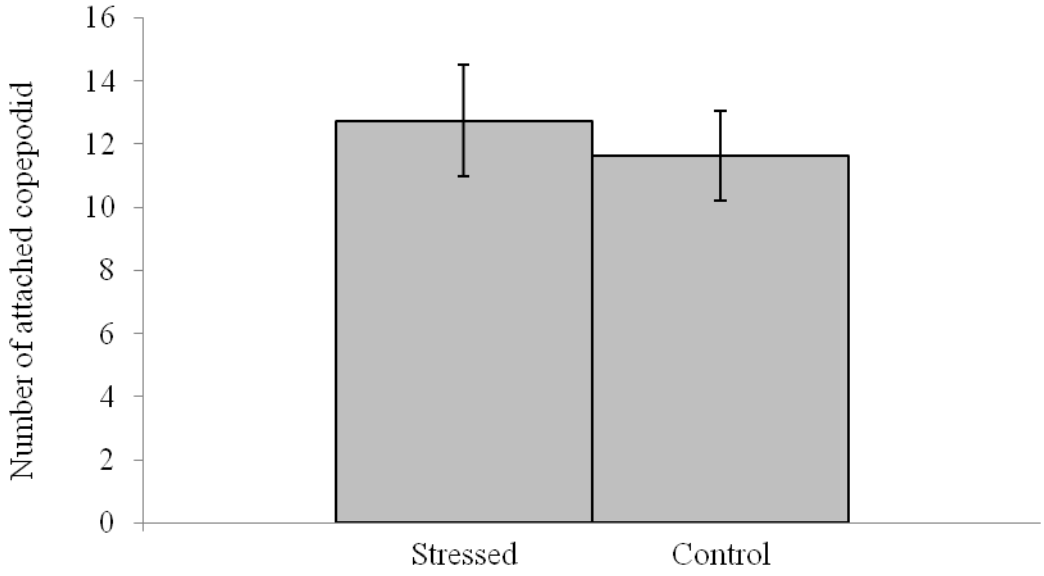

Figure 3: Mean±SE of the number of attached copepodid of chronically confined and control Atlantic salmons. No significant difference was observed between the 2 groups ($|t| = 0.49$; $p = 0.6283$; n =8).

Discussion

This study appears to be the first to describe the influence of chronic stress in Atlantic salmon hosts on their attractiveness to *L. salmonis*. The number of attached *Lepeophtheirus salmonis* copepodid was the same between chronically confined Atlantic salmon and control subjects. Thus, the chronic stress state of salmon did not seem to change the attractiveness to the ectoparasite. The copepodid's attachment behavior is triggered by both physical and chemical stimuli (Mordue Luntz and Birkett 2009). Some of the semiochemicals released by the mucus of fish have already been demonstrated to be involved in host recognition (Ingvarsdóttir et al. 2002; Bailey et al. 2006; Pino-Marambio et al. 2007; Mordue Luntz and Birkett 2009; Delfosse and Pageat 2014; Pageat and Delfosse 2014). The results of this study indicate that these semiochemicals are not altered by the stress state of the salmon.

In this study, determining the chronic stress state of the salmon was crucial and several physiological parameters were measured to assess it. Total plasma cortisol level was not significantly different between chronically confined and control salmon, and can be

considered as being at a basal level (< 15 ng ml^{-1}, Martinez-Porchas *et al.*, 2009). Moreover, in the case of chronic stress, many studies demonstrate that plasma cortisol level returns to the basal level after a few days due to a decrease in the ACTH-sensitivity of the interrenal tissue or the habituation of the organism to that condition (Mommsen et al. 1999; Mormède et al. 2007; Martinez-Porchas et al. 2009). Thus, the measurement of plasma cortisol alone is not a reliable parameter in determining the chronic stress state of fish (Mormède et al. 2007). While the results of this study suggest a chronic stress state, further parameters should to be studied.

Neutrophils and lymphocytes were counted to determine the neutrophil%, the lymphocyte% and the neutrophil/lymphocyte ratio. Chronically confined salmon presented a higher neutrophil/lymphocyte ratio than control subjects. This increase was due to both a significant increase in neutrophil% and a significant decrease in lymphocyte%. The reduction of lymphocyte% during acute or chronic stress is well known in fish (Barton et al. 1987; Espelid et al. 1996; Barcellos et al. 2004; Frazer 2009; Whelan 2010). Indeed, the circulating corticosteroids are directly associated with an increase in neutrophils and a reduction of lymphocytes (Davis et al. 2008). As explained in Davis *et al.* (2008), this neutrophilia associated with lymphopenia during stress is mainly due to a redistribution of lymphocytes and neutrophils in different body compartments. Results confirm the chronic stress state of the fish in this study.

In regards to lymphopenia, the reduction could lead to a decreased immune response to environmental pathogens. In this study, the mean number of attached copepodids was the same between lymphopenic salmon and control subjects. The immunity status of fish does not seem to influence the first steps of the infestation behavior of the copepodids: recognition and attachment. To further our understanding of the role of immunity, it may of interest to assess immune system function in the mucus and skin of salmon, by measuring IgM antibodies or evaluating immune cell distribution (Hatten et al. 2001; Tadiso et al. 2011). Further studies

could also lead to a better understanding of the factors influencing the infestation success of sea lice (permanent attachment and chalimus development success) in chronically stressed and control salmon.

In conclusion, the chronically confined salmon in this study were characterized by lymphopenia and a neutrophilia compared to control subjects. These differences in immune function did not influence the recognition and attachment of the *Lepeophtheirus salmonis* copepodids on salmon, the mean number of attached copepodids did not vary significantly between chronically confined and control salmon. In order to confirm these results, further studies should measure immune activity directly in the mucus and skin, while infestation success should be assessed by counting the number of transformed chalimus.

Acknowledgements

Thank you to B-V. Løvik and E-M. Sætre for their technical help during the trial. We would like to thank E. Landen, a professional translator, and Dr. M. Mengoli for reviewing the manuscript. We are also grateful to IRSEA's Ethical Committee for their comments on the protocol.

References

Ashley P.J. (2007) Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science 104, 199–235.

Bailey R.J.E., Birkett M.A., Ingvarsdóttir A., Luntz A.J.M., Mordue W., Shea B.O., Pickett J.A. & Wadhams L.J. (2006) The role of semiochemicals in host location and non-host avoidance by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) copepodids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 63, 448–456.

Barcellos L.J.G., Kreutz L.C., De Souza C., Rodrigues L.B., Fioreze I., Quevedo R.M., Cericato L., Soso A.B., Fagundes M., Conrad J., Lacerda L.D.A. & Terra S. (2004) Hematological changes in jundiá (Rhamdia quelen Quoy and Gaimard Pimelodidae)

after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture 237, 229–236.

Barton B.A., Schreck C.B. & Barton L.D. (1987) Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms 2, 173–185.

Basrur T. V, Longland R. & Wilkinson R.J. (2010) Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (Salmo salar). Fish physiology and biochemistry 36, 445–50.

Boxaspen K. (2006) A review of the biology and genetics of sea lice. ICES Journal of Marine Science 63, 1304–1316.

Costello M.J. (2009) The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. Journal of fish diseases 32, 115–8.

Davis A.K., Maney D.L. & Maerz J.C. (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. Functional Ecology 22, 760–772.

Delfosse C. & Pageat P. (2014) Evidence of the effect of S.C.A.I.S (Sealice Copepodid Attachment Inhibiting Semiochemical) on the infesting behavior of Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results. In: Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference. p. 27. Portland.

Espelid S., Løkken G.B., Steiro K. & Bøgwald J. (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (Salmo salar L.). Fish and Shellfish Immunology 6, 95–110.

European Medicines Agency (2011) Guideline on bioanalytical method validation. London.

Fast M.D., Hosoya S., Johnson S.C. & Afonso L.O.B. (2008) Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (Salmo salar Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. Fish & shellfish immunology 24, 194–204.

Fevolden S.-E., Røed K.H. & Fjalestad K.T. (2002) Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. Aquaculture 205, 61–75.

Frazer L.N. (2009) Sea-cage aquaculture, sea lice, and declines of wild fish. Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology 23, 599–607.

Gilmour K.M., Dibattista J.D. & Thomas J.B. (2005) Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. Integrative and comparative biology 45, 263–73.

Gregory T.R. & Wood C.M. (1999) The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. Physiological and biochemical zoology : PBZ 72, 286–95.

Hamre L.A., Eichner C., Caipang C.M.A., Dalvin S.T., Bron J.E., Nilsen F., Boxshall G. & Skern-Mauritzen R. (2013) The Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. PLoS ONE 8, 1–9.

Hatten F., Fredriksen A., Hordvik I. & Endresen C. (2001) Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, Salmo salar. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. Fish & shellfish immunology 11, 257–268.

Ingvarsdóttir A., Birkett M. a, Duce I., Genna R.L., Mordue W., Pickett J. a, Wadhams L.J. & Mordue a J. (2002) Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. Pest management science 58, 537–45.

Iwama G., Afonso L.O.B. & Vijayan M. (2005) Stress in Fishes. In: The physiology of fishes, Boca raton. (ed. by D. Evans & J. Claiborne), pp. 320–42.

Johnson S.C., Treasurer J.W., Bravo S. & Nagasawa K. (2004) A Review of the Impact of Parasitic Copepods on Marine Aquaculture. Zoological Studies 43, 229–243.

Liu Y. & Bjelland H.V. (2014) Estimating costs of sea lice control strategy in Norway. Preventive Veterinary Medicine 117, 469–477.

Martinez-Porchas M., Martinez-Cordova L.R. & Ramos-Enriquez R. (2009) Cortisol and Glucose : Reliable indicators of fish stress ? American Journal of Aquatic Sciences 4, 158–178.

McCormick S.., Shrimpton J.., Carey J.., O'Dea M.., Sloan K.., Moriyama S. & Björnsson B.T. (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 168, 221–235.

Mommsen T.P., Vijayan M.M. & Moon T.W. (1999) Cortisol in teleosts : dynamics , mechanisms of action , and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9, 211–268.

Mordue Luntz a J. & Birkett M. a (2009) A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, Lepeophtheirus salmonis (Caligidae: Copepoda). Journal of fish diseases 32, 3–13.

Mormède P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., van Reenen C.G., Richard S. & Veissier I. (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & behavior 92, 317–39.

Pageat P. & Delfosse C. (2014) Effects of a salmon semiochemical on the infestation by Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results. In: Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference. p. 26. Portland.

Pickering A.D. & Pottinger T.G. (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish physiology and biochemistry 7, 253–8.

Pike A.W. & Wadsworth S.L. (1999) Sealice on salmonids: their biology and control. Advances in parasitology 44, 233–337.

Pino-Marambio J., Mordue (Luntz) a. J., Birkett M., Carvajal J., Asencio G., Mellado a. & Quiroz a. (2007) Behavioural studies of host, non-host and mate location by the Sea Louse, Caligus rogercresseyi Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). Aquaculture 271, 70–76.

Sink T.D., Lochmann R.T. & Fecteau K.A. (2008) Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish physiology and biochemistry 34, 95–101.

Tadiso T.M., Krasnov A., Skugor S., Afanasyev S., Hordvik I. & Nilsen F. (2011) Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. BMC genomics 12, 141.

Torrissen O., Jones S., Asche F., Guttormsen a., Skilbrei O.T., Nilsen F., Horsberg T.E. & Jackson D. (2013) Salmon lice - impact on wild salmonids and salmon aquaculture. Journal of Fish Diseases 36, 171–194.

Tully O. & Nolan D.T. (2002) A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae). Parasitology 124 Suppl, S165–82.

Turnbull J., Bell A., Adams C., Bron J. & Huntingford F. (2005) Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. Aquaculture 243, 121–132.

Whelan P.K. (2010) A Review of the Impacts of the Salmon Louse, Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837) on Wild Salmonids. Atlantic Salmon Trust.

9. Conclusion de l’étude n°5

L’attractivité des saumons pour les parasites est donc la même, que ces saumons soient stressés chroniquement ou pas. Comme pour l’étude précédente, nous n’avons mesuré ici que l’attractivité des saumons pour *Lepeophtheirus salmonis* et il serait intéressant dans une prochaine étude de vérifier si ce phénomène est similaire jusqu'à l’implantation permanente des chalimus sur le saumon. Il serait également intéressant de mesurer l’activité immunitaire dans la peau et le mucus des saumons, ces tissus étant directement impliqués dans l’attractivité pour l’ectoparasite.

Chapitre 3 : Méthode de contrôle d'un inducteur de stress : lutte contre le pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*

1. Présentation de l'étude n°6

Concernant le parasite *Lepeophtheirus salmonis*, la plupart des traitements existant à l'heure actuelle sont extrêmement couteux, nocifs pour l'environnement, et bien souvent inefficaces (Shao 2001). En effet, l'utilisation de biocides en salmoniculture a conduit à sélectionner des parasites de plus en plus résistants pour ces produits (Denholm et al. 2002). Aujourd'hui, des méthodes alternatives sont en cours de développement pour lutter plus efficacement contre le parasite et de manière plus saine pour l'environnement (Lien et al. 2014). Parmi ces nouvelles approches, la sémiochimie semble prometteuse (Ingvarsdóttir et al. 2002). Basée sur la communication naturelle entre le parasite et son hôte, l'approche sémiochimique s'intéresse à l'identification des molécules responsables de cette communication conduisant le parasite à détecter et s'attacher sur son hôte. Le but de cette présente étude est donc d'identifier ces molécules responsables de l'attachement ou, au contraire du non-attachement, du parasite *Lepeophtheirus salmonis* sur le saumon Atlantique. Pour ce faire, des prélèvements de mucus de plusieurs groupes de poissons sont analysés et comparés. Du mucus de truites-arc-en-ciel et de saumons Atlantique sont prélevés. Ces poissons étaient soit infestés, soit non-infestés dans des enclos infestés ou non-infestés dans des enclos non-infestés. Les mucus de ces 6 groupes de poissons sont analysés par double Chromatographie en phase Gazeuse – Spectrométrie de Masse (GCxGC-MS) et comparés pour isoler les molécules responsables de ces différences observées entre les groupes. De ces analyses, sept compositions de molécules sont sélectionnées. Ces sept solutions sont alors expérimentées dans le test d'infestation mis au point en laboratoire, avec quatre répliques pour chaque solution (n = 4, phase de screening).

Le groupe contrôle présente un nombre de copépodites attachés relativement constant (21,2 ± 3,8). Parmi les 7 solutions testées dans ce screening, une seule présente un nombre de

copépodites attachés plus faible (8,0 ± 2,8). Cette solution est alors nommée S.C.A.I.S pour *Sealice Copepodits Attachment Inhibiting Semiochemical*.

La deuxième partie de cette étude cherche à valider l'efficacité de la SCAIS grâce au test d'infestation contre un groupe contrôle positif (solvant de la SCAIS seul) et un groupe contrôle négatif (la morue de l'Atlantique *Gadus morhua*, non-hôte pour *Lepeophtheirus salmonis*). Le groupe *SCAIS* (n = 16), le groupe *placebo* (n = 14) et le groupe *morue* (n = 7) sont comparés pour le nombre de copépodites de *Lepeophtheirus salmonis* attachés sur le corps. Le groupe *Placebo* présente 20,8 ± 3,4 copépodites contre 6,3 ± 2,6 pour le groupe *SCAIS*. Le groupe *morue* étant à 4,7 ± 2,3 copépodites.

2. Etude n°6 :

Deux présentations orales en congrès international à comité de lecture :

Pageat P, Delfosse C. 2014. **EFFECTS OF A SALMON SEMIOCHEMICAL ON THE INFESTATION BY *Lepeophtheirus salmonis* COPEPODITS IN SALMON SMOLTS. PRELIMINARY RESULTS.** *The 10th International Sea Lice Conference.* Portland (Maine), USA.

Delfosse C, Pageat P. 2014. **EVIDENCE OF THE EFFECT OF S.C.A.I.S. (SEALICE COPEPODITS ATTACHMENT INHIBITING SEMIOCHEMICAL) ON THE INFESTING BEHAVIOR OF *Lepeophtheirus salmonis* COPEPODITS IN SALMON SMOLTS. PRELIMINARY RESULTS.** *The 10th International Sea Lice Conference.* Portland (Maine), USA.

Oral

EFFECTS OF A SALMON SEMIOCHEMICAL ON THE INFESTATION BY *Lepeophtheirus salmonis* COPEPODITS IN SALMON SMOLTS. PRELIMINARY RESULTS.

P. Pageat and C. Delfosse

Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Saint-Saturnin-Lès-Apt, France.

The purpose of this study is to assess the existence of semiochemicals inhibiting the attachment of copepodits on salmons.

The identification of putative copepodit attachment inhibitors, was managed by analyzing the cutaneous mucus obtained from farmed salmons and rainbow trouts. Three groups of fishes were defined: infested fishes, non-infested fishes obtained from infested pens, and non-infested fishes obtained from non-infested farms. The mucus was analyzed by GC-GC-MS method: 7 putative compositions were identified.

The assessment of the effects of the compositions was tested thanks to a standardized infestation test. Smolts obtained from farms, were treated with a 6ppm solution of the tested composition, for 10 min, and then continuously bathed with a 3ppm solution during the whole test. A reference group was used for each composition, and was treated with a solution of the solvent (ethyl-alcohol) following the same protocol. During the test, they were exposed to 60 copepodits for 45 min., they were then anesthesized and euthanized. All the surface of their body was then scrubbed to get the mucus and the copepodits. This material was filtered and the copepodits were counted. The gills were dissected to count the copepodits attached on it.

The reference groups were infested by 21.2±3.8 copepodits on the body; 3±1.8 on gills. Between the tested compositions, one only (encoded SCAIS) was showing a significantly lower infestation on the body with 8±2.8 copepodits; there was no difference regarding the infestation on gills.

This semiochemical appears as a promising product for further development of infestation inhibitors.

Oral

EVIDENCE OF THE EFFECT OF S.C.A.I.S. (SEALICE COPEPODITS ATTACHMENT INHIBITING SEMIOCHEMICAL) ON THE INFESTING BEHAVIOR OF *Lepeophtheirus salmonis* COPEPODITS IN SALMON SMOLTS. PRELIMINARY RESULTS.

C. Delfosse and P. Pageat

Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Saint-Saturnin-Lès-Apt, France.

The S.C.A.I.S. was identified from our previous studies. The purpose of this paper is to present the validation of this semiochemical during a standardized infestation test, with a positive reference group (non treated salmons) and negative group (cods *Gadus morhua*).

Smolts obtained from farms, were treated with a 6ppm SCAIS solution, for 10 min, and then continuously bathed with a 3ppm solution during the whole test. The control group was treated with the solvent (ethyl-alcohol) following the same protocol. The cods, of a weight comparable with the smolts, were obtained from local fishers. During the test, all fishes were exposed to 60 copepodits for 45 min., they were then euthanized (Benzoak®). All the surface of their body was scrubbed to get the mucus; this material was filtered and the copepodits counted. The gills were dissected to count the copepodits attached on it. Data were analyzed by using ANOVA one parametric factor.

The control salmons (n=14) were infested by 20.8±3.4 copepodits on the body; 3.3±2.1 on gills. The SCAIS salmons (n=16) were showing a significantly lower infestation on the body with 6.3±2.6 copepodits, and the cods (n=7) had 4.7±2.3 copepodits. There was no significant difference between SCAIS salmons and cods. There was no difference regarding the infestation on gills between the 3 groups.

This semiochemical appears to inhibit the stable attachment on salmons, leading to a copepodit infestation comparable to non-host fish species. Further study should assess if the copepodits attached in such context, remain attached and become chalimus.

3. Conclusion de l'étude n°6

Ces études prouvent bien l'efficacité de la SCAIS comme inhibiteur de l'attachement des copépodites de *Lepeophtheirus salmonis* sur l'hôte *Salmo salar*. Ces expériences démontrent également que les copépodites s'attachent sur des poissons non-hôtes comme dans l'étude de Pert et al. (2009). Ainsi, l'efficacité de la SCAIS semble comparable à l'infestation d'un poisson non-hôte pour le parasite. Si l'efficacité de la SCAIS est ici prouvée, les mécanismes d'action de ce sémiochimique ne sont pas connus. S'agit-il d'une allomone (sémiochimique bénéfique pour le saumon émetteur) ? S'agit-il d'une phéromone du saumon Atlantique (sémiochimique intra-spécifique) ? Une fois détectée par le saumon, la phéromone engendrerait une cascade de réactions protégeant le saumon des copépodites de *L. salmonis*.

4. Présentation de l'étude n°7

Pour répondre à ces questions, la comparaison de saumon anosmique à des saumons non-anosmiques pourrait être intéressante. Une telle étude permettrait de comprendre les mécanismes d'action de la SCAIS, à savoir si ce sémiochimique est une allomone (capté par le parasite et bénéfique pour le saumon) ou une phéromone de saumon. Selon ces hypothèses, les résultats attendus seraient une efficacité de la SCAIS chez les saumons anosmiques dans le cas d'une allomone et une inefficacité dans le cas d'une phéromone. Mais avant de pouvoir mettre au point un tel essai, il est crucial de développer une méthode afin de rendre anosmique des saumons. Une technique utilisée en recherche au XXème siècle consistait à cautériser directement l'épithélium olfactif des poissons. La procédure était réalisée en introduisant une boucle de fil de fer chauffée à blanc dans les narines du poisson. Dans un souci à la fois de bien-être des animaux de laboratoire, mais également afin de limiter le stress engendré par la procédure, il serait intéressant de développer une méthode moins invasive. Nous l'avons vu, le stress peut influencer l'attractivité des saumons pour le parasite. Si nous voulons donc connaitre l'influence de l'anosmie sur l'efficacité de la SCAIS, il faut limiter l'induction de stress par la procédure d'anosmie pour ne pas biaiser les résultats.

Le but de cette nouvelle étude exploratoire est de comparer des saumons présentant une altération du système olfactif à des saumons témoins, traités avec la SCAIS ou le placebo, sur le nombre de copépodites attachés.

Pour ce faire, nous avons comparé 4 groupes de saumons sur le test d'infestation :

- 8 smolts sans altération du système olfactif (**Figure 35**) et traités au placebo (NAOSS Placebo)
- 8 smolts sans altération du système olfactif et traités à la SCAIS (NAOSS SCAIS)
- 8 smolts avec altération du système olfactif et traités au placebo (AOSS Placebo)
- 8 smolts avec altération du système olfactif et traités à la SCAIS (AOSS SCAIS)

A la fin du test d'infestation, une prise de sang est réalisée pour évaluer le niveau de stress de chaque poisson, et le nez est prélevé pour faire une analyse histologique du système olfactif.

La comparaison des deux groupes AOSS et NAOSS montre que les saumons traités au sulfate de zinc présentent plus de lésions (14/16 saumons) que les saumons témoins (2/15). Parmi ces poissons lésés, l'un d'eux présente une dégénération totale du tissu olfactif.

Cette étude exploratoire montre également que les NAOSS SCAIS ont significativement moins de copépodites attachés que les trois autres groupes (1 significativité et 2 tendances).

Le taux de cortisol plasmatique et le ratio N/L ne sont significativement pas différents entre les 4 groupes.



Figure 35 : Photographie de la procédure d'altération du système olfactif sur un smolt de saumon Atlantique. Une solution de sulfate de zinc et procaïne est injectée à raison de 0,5 ml dans chaque narine du poisson. (Photo Cyril Delfosse, ©IRSEA).

5. Etude n° 7

Rapport d'étude interne à l'IRSEA

Efficacy of SCAIS as inhibitor of infestation behavior of *Lepeophtheirus salmonis* copepodid in Atlantic salmons (*Salmo salar*) with altered olfactory system

IRSEA

Quartier Salignan, Route du Chêne

84400 Apt – France

Tel : 04.90.75.57.00

Fax : 04.90.05.84.47

Department: Semiochemicals' Identification and Analogs' Design

Scientists in charge: Cyril DELFOSSE & Patrick PAGEAT

Confidential – Reproduction forbidden

Contents

PROTOCOL OF THE STUDY 3
- A) Title of the Study: 3
- B) Aims of the Study: 3
- C) Quality Insurance: 3
- D) State of the Art: 3
- E) Research Centre and Researchers: 3
- F) Scheme of the study and experimental design: 3
- G) Treatments: 4
- H) Animals: 4
- I) Inclusion criteria: 4
- J) Non-inclusion criteria: 4
- K) Exclusion criteria: 4
- L) Material: 4
- M) Detailed unfolding of the study: 5
- N) Parameters 7
- O) Unexpected events: 8
- P) Data collection: 8
- Q) Management of missing or aberrant data: 8
- R) Statistical analysis: 8

RESULTS 9
- A) Atypical values and missing data 9
- B) Descriptive statistics 9
- C) Body mass 10
- D) Lesion 10
- E) Lesion score 11
- F) Number of copepodids 14
- G) Cortisol 14
- H) N/L ratio 15

DISCUSSION 15

CONCLUSION 16

REFERENCES 16

Confidential – Reproduction forbidden

PROTOCOL OF THE STUDY

A) Title of the Study:

Efficacy of SCAIS as inhibitor of infestation behavior of *Lepeophtheirus salmonis* copepodid in Atlantic salmons (*Salmo salar*) with altered olfactory system.

B) Aims of the Study:

To compare the number of attached copepodids between 4 groups of salmons to investigate the mechanisms of action of the SCAIS: smolts with altered olfactory system (AOSS) and treated with placebo, AOSS treated with SCAIS, non-altered olfactory system smolts (NAOSS) treated with placebo, NAOSS treated with SCAIS.

C) Quality Insurance:

In the spirit of "good laboratory practice", all the data will be certified as exact by the study director.

D) State of the Art:

- SCAIS had proved its efficacy in inhibition of the infestation behaviour of *Lepeophtheirus salmonis* copepodid in Atlantic salmon, in a standardized test (Delfosse and Pageat, 2014; Pageat and Delfosse, 2014).
- Testing on salmons with altered olfactory system will bring some information regarding the mechanisms of action of the SCAIS.

E) Research Centre and Researchers:

IRSEA-ARC
Daugstad
6392 Vikebukt
Norway
Tel.: +47 48 88 23 00
Fax : +47 71 18 30 19
E-mail: bvl@alsco.no

Researchers: Cyril DELFOSSE (c.delfosse@group-irsea.com) & Patrick PAGEAT (p.pageat@group-irsea.com)

F) Scheme of the study and experimental design:

It is a superiority study under parallel groups, against placebo. The number of attached copepodids is compared between 4 groups to investigate the mechanisms of action of the SCAIS: 8 AOSS treated with placebo, 8 AOSS treated with SCAIS, 8 NAOSS treated with placebo, 8 NAOSS treated with SCAIS. (n=8). The homogeneity of the 4 groups will be verified by the comparison of the body mass of smolts. The total plasmatic cortisol level and the Neutrophil/Lymphocyte ratio will be compare between the 4 groups to evaluate the stress level of tested subjects.

Confidential – Reproduction forbidden

G) Treatments:

Treatment:

- SCAIS at 2% in ethanol
- Alteration of the olfactory system

Placebo:

- Ethanol
- No handling (no alteration of the olfactory system)

Application of the treatment:

- SCAIS directly injected in seawater as solution at 2%, at 6 ppm and then 3ppm.
- 0.5 ml of zinc sulphate/procaine solution (1.5% zinc sulphate + 3% procaine in physiological saline) in each nostril. Injected by using a Ø 0.45mm x 12mm needle. the needle is cut to remove the point, and curved.

H) Animals:

Species: Atlantic salmon (*Salmo salar*)
Number: 32
Stage: Smolt
Weight: around 90 g
Origin: SALMAR® Daugstad 6392 Vikebukt, Norway

Species: *Lepeophtheirus salmonis*
Number: 1920
Stage: Copepodid
Origin: Ilab® Bergen, Norway

I) Inclusion criteria:

- Smolts: Body weight between 50 and 150 g
- Copepodids: Active swim

J) Non-inclusion criteria:

- Smolts: disease, loss of scales, fin damages, cataract, abnormal swim
- Copepodids: Immobile even after stimulus

K) Exclusion criteria:

- Smolts: swim on the back during the experiment

L) Material:

- 50 mL (x2), 250 mL (x2), 1 L (x8), 2 L (x4) beakers

Confidential – Reproduction forbidden

- Used ELISA plates (x2)
- Binocular microscope & cold light
- Pasteur pipettes & rubber teats
- 2 L flat beakers (x4)
- 3.5 L flat beakers equipped with valve (x4) + 30 x 30 cm glass boards (x4)
- Tent of experimentation (x1)
- Landing net (x2)
- 2,5 ml Syringes & 0.9 mm needles + 0.045 mm needles
- Benzoak®
- Plastic bag
- Weighing scale (precision 0.1 g)
- Surgical pliers
- Filter
- Magnifying glass

M) Detailed unfolding of the study:

4 groups are tested:

- NAOSS treated with placebo
- NAOSS treated with SCAIS
- AOSS treated with placebo
- AOSS treated with placebo

The test is realized by 8 rounds of 4 fish (8 of each group). For each round, 4 fish are tested (1 of each group).

Alteration of the olfactory system was performed on smolt the day before each round (24h before the test).

At each round, 4 fish (1 of each group) are caught in their respective holding tanks and introduced in four 2-liter flat beakers supplied with 1.75 l of seawater treated at 6 ppm of SCAIS (SCAIS or placebo, 0.52 ml of solution in 1.75 l of seawater). The 4 fish are bathed in this solution during 10min.

Confidential – Reproduction forbidden

After that, fish are transferred in 4 other devices: 3,5-liter flat beaker supplied with 3.5 l of seawater treated at 3 ppm (SCAIS or placebo, 0.52 ml in 3.5 l of seawater). These flat beakers are equipped with a valve able to empty the flat beaker of 0.875 l in 10 min. When fish are introduced in these flat beakers, the valves are turn on. Ten minutes after, the flat beakers are each supplied with 0.875 l of their respective solution (SCAIS or placebo seawater at 3 ppm). Ten minute after (20min after introduction of fish), valves are turn off and 60 copepodits per fish are injected in each flat beaker. Five minutes after (25min after introduction of fish), valves are turn on. Ten minutes after (35min after introduction of fish), each flat beaker is supplied with its respective treatment. Ten minutes after (45min after introduction of fish), each flat beaker is supplied with its respective treatment. Ten minutes after (55min after introduction of fish), each flat beaker is supplied with its respective treatment. After that, 2 ml of Benzoak® are injected in each flat beaker in order to kill fish by overdose of anesthetic product. When fish are dead, fish are introduced in a plastic bag (see code).

For each plastic bag, the fish is hold thanks to surgical pliers introduced in the gills chamber. Fish is scrubbed in 3 times (top of the fish, rinsed, bottom of the fish, rinsed, whole fish, rinsed). The fish is removed from the bag and weighed. A blood sample is performed in the caudal vein of the fish. 2 blood smears are performed and the rest of the blood is injected in a heparinized tub for subsequent analysis. The nose of the fish is cut and stored in formaldehyde solution for subsequent histological analysis.

The plastic bag is then emptied above a filter and the number of copepodit is directly counted on the filter thanks to a magnifying glass.

The process is repeated for the 3 other fish.

The process is repeated for the 7 other rounds

Codes:

Salmons are noted as: Round (from 1 to 8), Position (L, CL, CR or R)

Confidential – Reproduction forbidden

Program:

Round	Left	Central Left	Central Right	Right
1	NAOSS/Placebo Code: 1L	NAOSS/SCAIS Code: 1CL	AOSS/SCAIS Code: 1CR	AOSS/Placebo Code: 1R
2	NAOSS/SCAIS Code: 2L	NAOSS/Placebo Code: 2CL	AOSS/Placebo Code: 2CR	AOSS/SCAIS Code: 2R
3	AOSS/SCAIS Code: 3L	AOSS/Placebo Code: 3CL	NAOSS/SCAIS Code: 3CR	NAOSS/Placebo Code: 3R
4	AOSS/Placebo Code: 4L	AOSS/SCAIS Code: 4CL	NAOSS/Placebo Code: 4CR	NAOSS/SCAIS Code: 4R
5	NAOSS/Placebo Code: 5L	NAOSS/SCAIS Code: 5CL	AOSS/SCAIS Code: 5CR	AOSS/Placebo Code: 5R
6	NAOSS/SCAIS Code: 6L	AOSS/SCAIS Code: 6CL	AOSS/Placebo Code: 6CR	NAOSS/Placebo Code: 6R
7	AOSS/SCAIS Code: 7L	AOSS/Placebo Code: 7CL	NAOSS/Placebo Code: 7CR	NAOSS/SCAIS Code: 7R
8	AOSS/Placebo Code: 8L	NAOSS/Placebo Code: 8CL	NAOSS/SCAIS Code: 8CR	AOSS/SCAIS Code: 8R

N) Parameters

Body Weight:

Body mass of the smolt (in gramme)

Number of copepodid attached:

Directly count after the infestation test on each fish

Total Plasma Cortisol Level ($ng.ml^{-1}$) :

Measured by using an immuno-assay ELISA kit

Neutrophil/lymphocyte ratio:

Each smear is colored (red and blue and rinsed) and read (blind) under optical microscope (40x). Neutrophil and lymphocyte are counted until 100 cellules counted. The ratio is calculated as number of neutrophil / number of lymphocyte.

Lesions of the olfactory system:

Histological analysis is made for each nostril of each fish. Presence of lesions is noted as yes or no.

Lesion score:

A score is noted for each fish regarding the lesions of its olfactory tissue:

Confidential – Reproduction forbidden

Inflammation	Description
Level 0	No inflammation
Level 1	Slight inflammatory infiltration (some inflammatory cells, not organized) with or without slight reduction/degeneration of the sensory epithelium)
Level 2	Moderate inflammatory infiltration (Presence of inflammatory cells, more densely) with or without reduction/degeneration of the sensory epithelium)
Level 3	Strong inflammatory infiltration (inflammatory cells organized) with reduction/degeneration of the sensory epithelium)

O) Unexpected events:

In case of exclusion criteria or defective trial, the experiment is repeated with other fish (reserve animals) until we obtain the 8 fish in each group.

P) Data collection:

Data will be input in an Excel file provided by the Statistical Service of IRSEA.

Q) Management of missing or aberrant data:

Management of missing data: deletion of the fish.

Methodology in order to search atypical values (outliers) consists in centering and reduction of data; is considered atypical each centered-reduced value superior to 3 in absolute value.

Once detected, outliers will be removed from the database if qualified as absurd in consultation with clinicians.

R) Statistical analysis:

Data will be analyzed using 9.4 SAS software (2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The significance threshold was conventionally set at 5%. The parameters "Lesions" and "Lesion score" will be compare between NAOSS and AOSS without consideration of SCAIS.

Confidential – Reproduction forbidden

RESULTS

A) Atypical values and missing data

Methodology in order to search atypical values (outliers) consists in, when normal distribution is not encountered, looking at the graphs of point and to identify if there is presence of extreme data in the scatter plot. When the variable follows a normal distribution it consists in centering and reduction of data; is considered atypical each centered-reduced value superior to 3 in absolute value.

Before beginning the analysis, one subject was excluded (code: 2L) because of the total plasma cortisol level which was upper to the quantification limit: 250 ng/ml.

Atypical values were found in this dataset for the parameters as the number of copepodits attached (code: 5L), the total plasma cortisol level (code: 2CL) and the Ratio Heterophile/Lymphocyte (code: 3CL). But with the agreement of the clinicians, these data were kept in the analysis of the study. No other one atypical value was found in this dataset.

B) Descriptive statistics

Table: Descriptive statistics

Treatment	Variable	N	Mean	Std Dev	Std Error	Median	Minimum	Maximum
AOSS/Placebo	nb_copepodid	8	23.625	5.397	1.908	23.000	15.000	32.000
	body_mass	8	97.750	13.167	4.655	96.000	80.000	115.000
	Cortisol	8	99.052	41.402	14.637	87.734	60.356	188.389
	ratio_NL	8	0.178	0.171	0.061	0.111	0.052	0.569231
NAOSS/Placebo	nb_copepodid	8	25.125	5.357	1.894	23.500	20.000	37.000
	body_mass	8	101.375	13.752	4.862	104.000	83.000	116.000
	Cortisol	8	145.340	54.206	19.165	146.961	67.711	224.812
	ratio_NL	8	0.122	0.101	0.036	0.102	0.031	0.325
AOSS/SCAIS	nb_copepodid	8	21.875	4.998	1.767	22.500	15.000	28.000
	body_mass	8	95.625	22.283	7.878	103.000	56.000	120.000
	Cortisol	8	92.468	36.127	12.773	100.453	21.456	141.442
	ratio_NL	8	0.165	0.103	0.036	0.171	0.031	0.338
NAOSS/SCAIS	nb_copepodid	7	17.143	2.968	1.122	16.000	14.000	22.000
	body_mass	7	104.000	17.301	6.539	101.000	87.000	141.000
	Cortisol	7	123.057	41.751	15.782	124.705	48.161	182.491
	ratio_NL	7	0.110	0.080	0.030	0.095	0.031	0.263

Confidential – Reproduction forbidden

Table: Data according to histological analysis of olfactory systems

Fish	Lesion	Score	Fish	Lesion	Score	Fish	Lesion	Score	Fish	Lesion	Score
1L	No	0	3L	Yes	2	5L	Yes	1	7L	Yes	1
1CL	No	0	3CL	Yes	1	5CL	No	0	7CL	Yes	2
1CR	No	0	3CR	No	0	5CR	Yes	2	7CR	Yes	1
1R	No	0	3R	No	0	5R	Yes	2	7R	No	0
~~2L~~	~~No~~	~~0~~	4L	Yes	1	6L	No	0	8L	Yes	1
2CL	No	0	4CL	Yes	2	6CL	Yes	3	8CL	No	0
2CR	Yes	1	4CR	No	0	6CR	Yes	1	8CR	No	0
2R	Yes	1	4R	No	0	6R	No	0	8R	Yes	1

C) Body mass

The parameter "Body_mass" respected the conditions of normality and homogeneity, the comparison of the treatment groups can then be made with the General Linear Model (GLM).

Tests type IV Fixe effects

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
treatment	3	314.4274194	104.8091398	0.36	0.7807

Salmons are homogeneous between groups according to "Body_mass". (p=0.7807)

D) Lesion

Lésions	group		
Frequency Percent Row Pct Col Pct	AOSS	NAOSS	Total
Oui	14 45.16 87.50 87.50	2 6.45 12.50 13.33	16 51.61
Non	2 6.45 13.33 12.50	13 41.94 86.67 86.67	15 48.39
Total	16 51.61	15 48.39	31 100.00

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	17.0522	<.0001

Conclusion: A significant difference is observed between AOSS and NAOSS.

Confidential – Reproduction forbidden

E) Lesion score

Treatment	Score				
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	2	3	Total
AOSS	2 6.45 12.50 13.33	8 25.81 50.00 80.00	5 16.13 31.25 100.00	1 3.23 6.25 100.00	16 51.61
NAOSS	13 41.94 86.67 86.67	2 6.45 13.33 20.00	0 0.00 0.00 0.00	0 0.00 0.00 0.00	15 48.39
Total	15 48.39	10 32.26	5 16.13	1 3.23	31 100.00

As there is more than 50% of cells having expected counts values less than 5, the exact Fisher test is computed:

Fisher's Exact Test	
Table Probability (P)	<.0001
Pr <= P	0.0001

Conclusion: A significant difference is observed between AOSS and NAOSS.

Some pictures of the lesions:

Confidential – Reproduction forbidden

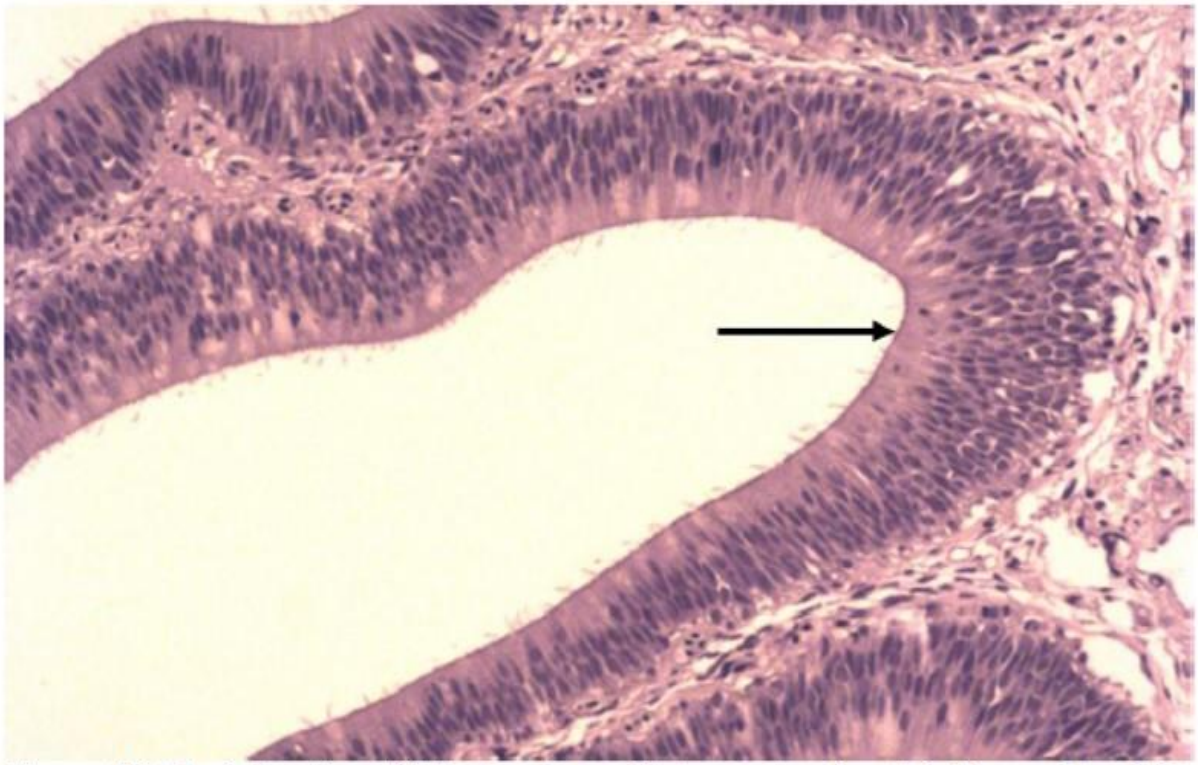

Figure: Histological section of Atlantic salmon olfactory system (rosette). We considered this lesion score as level 0. Black arrow indicates the asymptomatic epithelium. (IRSEA P.Asproni©).



Figure: Histological section of Atlantic salmon olfactory system (rosette). We considered this lesion score as level 1. Black circle indicates some vascular congestions to the base of lamella. (IRSEA P.Asproni©).

Confidential – Reproduction forbidden

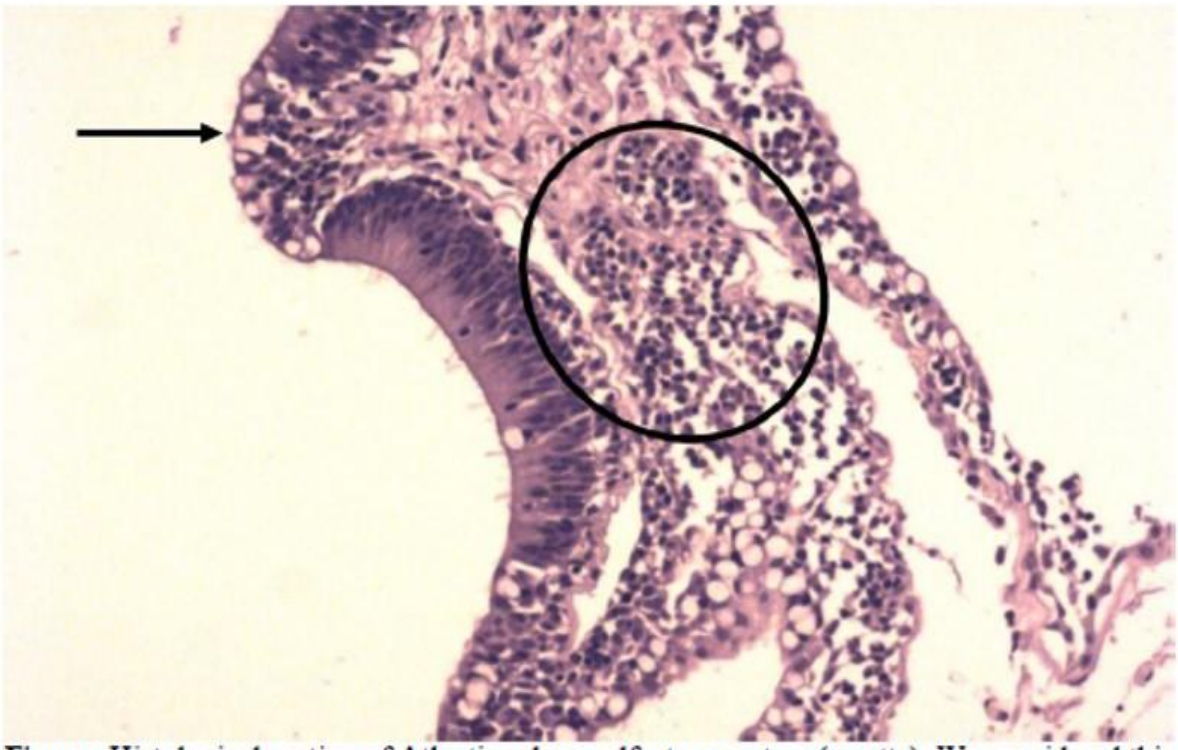

Figure: Histological section of Atlantic salmon olfactory system (rosette). We considered this lesion score as level 2. Black circle indicates organized inflammatory cells. Black arrow indicates degeneration of the epithelium. (IRSEA P.Asproni©).

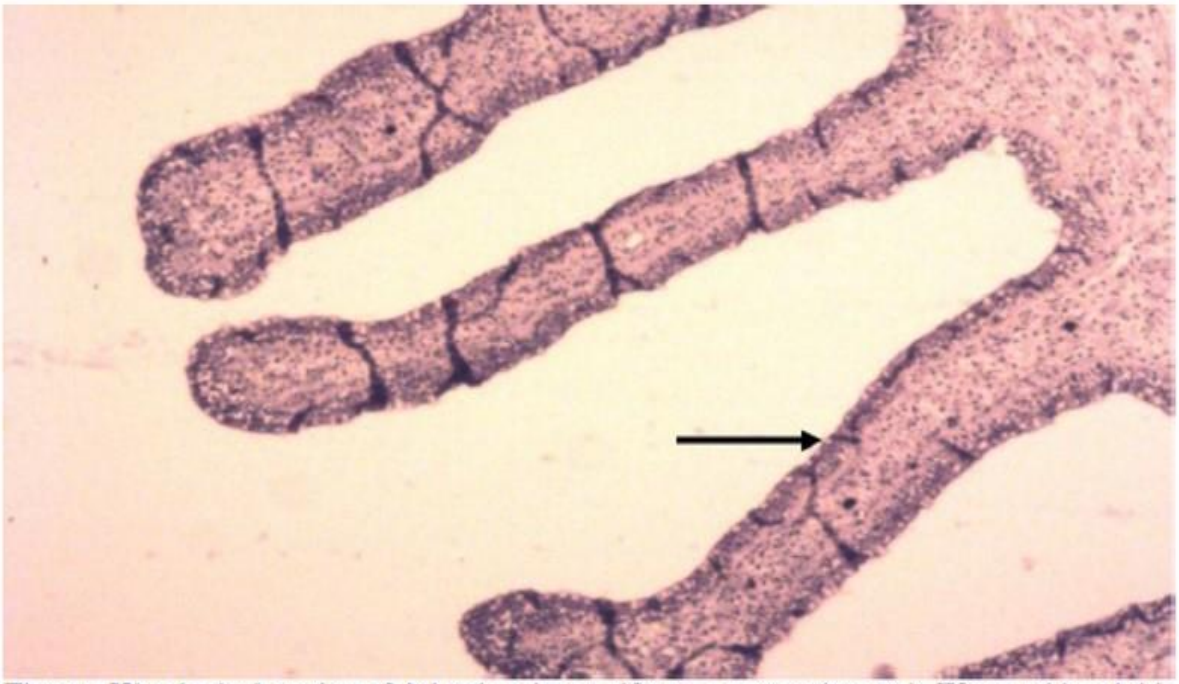

Figure: Histological section of Atlantic salmon olfactory system (rosette). We considered this lesion score as level 3. Black arrow indicates total degeneration of the epithelium. (IRSEA P.Asproni©).

Confidential – Reproduction forbidden

F) Number of copepodids

The parameter "Nb_copepodids" did not respect the conditions of normality and homogeneity, the comparison of the treatment groups can then be made with a Kruskal-Wallis Test.

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	9.4344
DF	3
Pr > Chi-Square	0.0240

There is a significant difference between treatment groups for "nb_copepodits" (p=0.0240). Then Wilcoxon two sample test is utilized as multiple post hoc comparisons test.

Comparison groups	raw_p	bon_p	stpbon_p	sid_p	hom_p
Placebo AOSS vs. Placebo NAOSS	0.6650	1.0000	1.0000	0.99859	0.6682
Placebo AOSS vs. SCAIS AOSS	0.6682	1.0000	1.0000	0.99867	0.6682
Placebo AOSS vs. SCAIS NAOSS	0.0169	0.1014	0.0845	0.09721	0.0845
Placebo NAOSS vs. SCAIS AOSS	0.4471	1.0000	1.0000	0.97143	0.6682
Placebo NAOSS vs. SCAIS NAOSS	0.0016	0.0096	0.0096	0.00956	0.0096
SCAIS AOSS vs SCAIS NAOSS	0.0732	0.4392	0.2928	0.36625	0.2928

The application of Bonferroni, Sidak & Hommel corrections resulted in only one comparison significant for a 5% threshold which corresponded to the comparison between the placebo NAOSS group & the SCAIS NAOSS group.

Conclusion: There is a significant difference between the placebo NAOSS group and the SCAIS NAOSS group.

G) Cortisol

The parameter "Cortisol" did not respect the conditions of normality and homogeneity, the comparison of the treatment groups can then be made with a Kruskal-Wallis Test.

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	5.7959
DF	3
Pr > Chi-Square	0.1220

Conclusion: There is no significant difference between the treatments groups for "Cortisol" (p=0.1220).

Confidential – Reproduction forbidden

H) N/L ratio

The parameter "Ratio N/L" respected the conditions of normality and homogeneity, the comparison of the treatment groups can then be made with a General linear model (GLM).

Tests type IV Fixe effects

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
treatment	3	0.02466198	0.00822066	0.57	0.6402

Conclusion: There is no significant difference between the treatment groups for "Ratio N/L" (p=0.6402).

DISCUSSION

There is no significant difference between the 4 groups for the body mass. There is a homogeneity of the 4 groups of smolts included in this trial.

Regarding the results, Atlantic salmon smolts submitted to the alteration of olfactory system show significantly more lesions (14/16) than control fish (2/15). However, only 1 fish among the treated salmons presents an anosmia (level 3) with a total degeneration of the epithelium. Histological analysis shown an alteration of the olfactory system of AOSS group. However, 2 fish of AOSS group did not present any lesion in the olfactory tissue.

This procedure could be improved by increasing the concentration of zinc sulfate in the solution. Indeed, the concentration tested here were taken from a model of anosmia in a terrestrial animal, the sheep (Booth and Katz, 2000). This procedure in aquatic condition could need to increase the concentration of zinc sulfate to insure a contact between the zinc sulfate and the olfactory epithelium. We could also increase the quantity of solution injected in the nostrils to increase the time of contact between the zinc sulfate and the epithelium. From a different kind of procedure, we could also imagine to directly inject chirurgical glue in the nostrils. A behavioral test could also be helpful to determine if fish presents an anosmia, by using a known volatile repellent substance.

According to the goal of the study, AOSS group presented an alteration of the olfactory system compare to NAOSS group.

Regarding the number of copepodids, this exploratory study shown a significant difference between NAOSS SCAIS and NAOSS Placebo, which in accordance with previous study about SCAIS (Pageat & Delfosse, 2014; Delfosse & Pageat, 2014). We also have a trend between AOSS Placebo and NAOSS SCAIS, and between AOSS SCAIS and NAOSS SCAIS. These results tend towards showing no efficacy of SCAIS when the smolt has an altered olfactory system.

According to the results of this exploratory study, the SCAIS seems then to be a pheromone of salmons. These results are preliminary knowing that smolts with an alteration of the olfactory

Confidential – Reproduction forbidden

system are not proved to be anosmic. It could be then interesting in further studies to improve the procedure of alteration of the olfactory system and test the anosmia of fish.

In previous studies we saw that stress level of fish can influence the infestation rate. In this study, we decided then to measure the stress level of fish submitted to the procedure of alteration of the olfactory system. The results shown that there is no difference between the 4 groups. The stress level of AOSS and NAOSS group is the same. This results shown that the number of copepodid found on fish of different groups is only due to the alteration of olfactory system, and not because of stress induced by the procedure.

CONCLUSION

Even if tested fish did not present a real anosmia but an alteration of the olfactory system, this exploratory study suggest that SCAIS is a pheromone of salmons.

REFERENCES

Booth, K. K. and Katz, L. S. (2000). Role of the vomeronasal organ in neonatal offspring recognition in sheep. Biology of reproduction 63, 953–958. doi:10.1095/biolreprod63.3.953.

Delfosse, C. and Pageat, P. (2014). Evidence of the effect of S.C.A.I.S (Sealice Copepodid Attachment Inhibiting Semiochemical) on the infesting behavior of Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results. In Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference, p. 27. Portland.

Liley, N. R., Olsen, K. H., Foote, C. J. and Van der Kraak, G. J. (1993). Endocrine changes associated with spawning behavior in male kokanee salmon (Oncorhynchus nerka) and the effects of anosmia. Horm Behav 27, 470–487. doi:http://dx.doi.org/10.1006/hbeh.1993.1034.

Pageat, P. and Delfosse, C. (2014). Effects of a salmon semiochemical on the infestation by Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results. In Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference, p. 26. Portland.

Confidential – Reproduction forbidden

6. Conclusion de l'étude n°7

Cette étude exploratoire a permis d'aborder les mécanismes d'action de la SCAIS. Les résultats ont montré que la SCAIS semblait inefficace chez les saumons ayant une altération de leur système olfactif. Ce constat laisse donc supposer que la SCAIS serait une phéromone du saumon.

La procédure d'altération du système olfactif utilisée dans cette étude a démontré son efficacité dans la création de lésion sur le tissu olfactif des saumons traités. Cette méthode utilisée sur les animaux terrestres serait donc transposable aux animaux aquatiques.

Nous l'avons vu précédemment, le stress peut influencer l'attractivité du saumon pour le parasite *L. salmonis*. C'est pourquoi, il est important de connaitre les effets de la procédure d'altération du système olfactif sur le niveau de stress du poisson testé, afin de limiter au maximum les biais dans les résultats finaux. Dans cette étude, le taux de cortisol et le ratio N/L ne sont significativement pas différents entre les quatre groupes testés. Le niveau de stress ne joue donc pas un rôle dans les différences observées entre les groupes pour le nombre de copépodites attachés.

En résumé, cette étude exploratoire laisse supposer que la SCAIS serait une phéromone de saumon. Ainsi, l'efficacité de ce sémiochimique n'est possible que si le saumon est capable de le capter. Une fois détecté par le saumon, une réaction physiologique ou comportementale entrainerait une protection du saumon contre le parasite. En élevage, la diffusion de la SCAIS dans l'eau des cages permettrait cette protection.

PARTIE III : Discussion générale

Chapitre 1 : Objectifs, stratégie d'organisation du programme de recherche et principaux résultats

L'élevage des salmonidés s'est développé grâce à la mise au point de la reproduction artificielle d'une part, et grâce à l'invention de l'aliment sec industriel d'autre part. Depuis les années 1960, la production de truite arc-en-ciel et de saumon Atlantique augmente exponentiellement face à une consommation de poisson de plus en plus importante. En 2014, la production est estimée à plus de 2 millions de tonnes pour le saumon Atlantique et plus de 800 milles tonnes pour la truite arc-en-ciel (FAO 2016a; FAO 2016b; FAO 2016c). Le processus récent de domestication des salmonidés, ainsi que l'évolution rapide des élevages, rendent difficile l'adaptation des animaux aux conditions d'élevage. Ainsi, plusieurs événements au cours de la production sont potentiellement inducteurs de stress pour le poisson élevé. Ces événements auront pour conséquence une perte dans la rentabilité de la production d'un point de vue économique, et d'un point de vue éthique, une perturbation du bien-être de l'animal élevé. Or, depuis quelques années maintenant, les consommateurs sont de plus en plus sensibles à ces questions éthiques dans le domaine de l'élevage et exigent de la viande issue d'animaux élevés dans de bonnes conditions et en tenant compte de leur bien-être. L'aquaculture n'échappe plus à cette règle et les recherches scientifiques doivent donc améliorer les connaissances dans ce domaine.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'améliorer les connaissances générales sur le stress chez les salmonidés d'élevage. Nous nous sommes ainsi intéressés à plusieurs événements inducteurs de stress et communs dans ce type d'élevage. Les conséquences de ces événements inducteurs de stress ont été étudiées, et des méthodes d'évaluation et de contrôle du stress ont été proposées.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps étudié les conséquences du stress et les méthodes de mesures. Nous avons d'abord étudié les conséquences de la prédation répétée, un événement inducteur de stress commun en élevage de la truite arc-en-ciel d'eau douce. Nous avons alors montré qu'il existait un phénomène d'habituation à ce stress, se traduisant par le déclenchement d'une réponse comportementale sans réponse physiologique associée. Nous avons ensuite étudié un événement stressant plus complexe : le changement d'environnement.

Cet événement implique en effet plusieurs changements inducteurs de stress, comme les facteurs abiotiques (température, luminosité…), la hiérarchie et la densité d'élevage. Dans cette situation, nous avons alors montré qu'il est nécessaire de mesurer et recouper plusieurs paramètres de stress pour évaluer le bien-être des truites. Dans ces deux premières études, nous avons montré que le stress a des conséquences sur la physiologie, le comportement et les performances zootechniques du poisson d'élevage. Parmi les impacts physiologiques du stress, la baisse de l'immunité est l'une des conséquences les plus marquantes, à l'origine de l'apparition de plusieurs pathologies, comme les infestations parasitaires par exemple (Biondi & Zannino, 1997). Dans un deuxième temps, nous nous sommes donc intéressés à l'interaction entre le stress et la pathologie à partir du cas particulier de l'ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. Tout d'abord, nous avons développé un test en laboratoire permettant de mesurer directement l'attachement du parasite sur le saumon Atlantique. Ce test nous a alors permis d'étudier les conséquences du stress aigu puis du stress chronique sur l'infestation du saumon par le parasite. Nous avons alors montré qu'un fort niveau de stress aigu de l'hôte favorisait l'attachement du parasite tandis que le stress chronique était sans effet dans les conditions testées. Enfin, suite à ce constat, nous nous sommes intéressés au mucus de saumons stressés et non stressés. Nous avons alors identifié un sémiochimique responsable de l'inhibition de l'attachement du parasite sur le saumon. Une fois l'efficacité de ce sémiochimique validée grâce au test d'infestation développé, nous avons étudié les mécanismes d'action de ce sémiochimique. Ces recherches nous ont permis de mettre en évidence les résultats qui suivent.

La prédation par les oiseaux piscivores apparait comme un problème récurrent dans les élevages de salmonidés d'eau douce. Nous avons donc étudié les conséquences d'une attaque simulée d'un prédateur sur la physiologie de truites arc-en-ciel, préalablement soumises à des prédations répétées dans leur élevage. Nous avons mesuré le taux de cortisol plasmatique et l'index hépatosomatique. Le taux de cortisol et l'index hépatosomatique ne sont significativement pas différents entre les truites soumises à l'attaque simulée et les truites témoins. Ici, nous avons donc un phénomène d'habituation à l'attaque répétée de prédateurs. Cette stratégie adaptative permet au poisson de se protéger en maintenant une réponse comportementale (fuir, se cacher) tout en éliminant la réponse physiologique (augmentation du taux de cortisol plasmatique) qui a des répercussions secondaires néfastes pour l'organisme (diminution de la croissance, réduction de l'activité immunitaire, augmentation de la morbidité et de la mortalité) (Pickering and Pottinger 1989; Gregory and Wood 1999).

Ainsi, dans le cas d'une situation de stress élémentaire, la prédation, la truite arc-en-ciel est capable de surmonter cet évènement en adaptant sa réponse biologique., ce qui n'altère donc pas son bien-être (Broom 1986).

En parallèle, nous avons également étudié les conséquences d'un événement stressant plus complexe à partir d'une situation de changement d'environnement de truites arc-en-ciel. En effet, le transfert de truites d'un environnement à un autre implique plusieurs changements potentiellement stressants comme la température de l'eau, la vitesse du courant, la hiérarchie. Dans cette étude, nous avons mesuré plusieurs paramètres physiologiques, comportementaux et zootechniques sur des truites arc-en-ciel d'élevage transférées en conditions de laboratoire. A partir de la mesure et du recoupement de ces types de paramètres, nous avons proposé une méthode d'évaluation du bien-être des truites en situation d'adaptation à un nouvel environnement. Cette situation engendre un stress physiologique plus ou moins long durant l'adaptation de l'organisme aux nouvelles conditions environnementales imposées (Jenkins et al. 2014). Ce stress physiologique a, par la suite, des répercussions sur le comportement et les performances zootechniques de l'animal comme la prise alimentaire, la croissance et la qualité de la chair (Barton et al. 1987; Gregory and Wood 1999). Dans notre exemple de changement des conditions environnementales, le taux de cortisol plasmatique, la croissance, l'indice de consommation et la prise alimentaire semblent être des paramètres intéressants et adaptés à l'évaluation du bien-être des truites (Delfosse et al. 2016). En revanche, l'index hépatosomatique, qui est un paramètre de stress chronique de longue durée (Barton et al. 1987; Basrur et al. 2010), n'est pas pertinent dans cette situation. Nous avons montré grâce à ces deux études que les méthodes de mesures du stress doivent différer selon l'événement stressant étudié. Plus l'événement inducteur de stress est complexe, plus il faut augmenter le nombre de paramètres à mesurer pour en évaluer les diverses conséquences. Nous l'avons vu en première partie de cette thèse, la baisse de l'immunité est une conséquence du stress chronique qui rend l'organisme plus sensible aux pathologies.

Nous nous sommes donc intéressés aux interactions entre le stress et la pathologie en prenant comme exemple l'infestation du saumon Atlantique par l'ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. Ce parasite marin est responsable de pertes économiques importantes (315 millions d'euros en 2014 en Norvège par exemple) (Iversen et al. 2015). Cet ectoparasite se nourrit du mucus, de la peau et du sang de son hôte et induit ainsi un stress chronique chez le poisson (Bowers et al. 2000). Les effets du parasite sur le niveau de stress de son hôte sont bien connus (Bowers et al. 2000; Johnson et al. 2004). En revanche, nous nous sommes interrogés

sur l'effet du niveau de stress de l'hôte sur son attractivité pour le parasite. Ainsi, nous avons étudié l'effet du stress aigu dans un premier temps, puis du stress chronique dans un second temps, sur l'attractivité du saumon Atlantique pour l'ectoparasite *L. salmonis*. Avant d'aborder ces deux études, il était nécessaire de mettre au point en laboratoire un test d'infestation permettant d'étudier le comportement d'attachement du copépodite (stade infestant du parasite) sur le saumon Atlantique. Ce test permet de compter le nombre final de copépodites attachés sur chaque poisson étudié. Lors du développement de ce test, nous avons montré que la température de l'eau dans le dispositif a un effet significatif sur le nombre de copépodites attachés en fin de test. Il est donc important de contrôler et connaitre cette température de l'eau pour éviter tout biais dans les résultats finaux.

Grâce à ce test, nous avons étudié l'effet du stress aigu puis du stress chronique sur l'attractivité du saumon Atlantique pour l'ectoparasite *L. salmonis*. Nous avons noté que les saumons ayant subi un stress aigu de manipulation sont plus attractifs dans l'heure suivant l'événement que les saumons témoins non manipulés. En revanche, la comparaison entre des saumons stressés chroniquement par confinement et des saumons témoins ne démontre aucune différence significative sur le nombre de copépodites attachés. C'est la première fois que de telles études ont été réalisées et ces résultats ont donc ouvert de nouvelles perspectives de recherche.

Ainsi, connaissant les effets du niveau de stress de l'hôte sur son attractivité pour le parasite, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le niveau de stress du saumon influerait sur la composition de son mucus, et donc sur la composition des sémiochimiques intervenant dans l'interaction entre le parasite et son hôte. Nous avons donc comparé la composition chimique du mucus de différents saumons en fonction de leurs niveaux de stress et de leurs résistances pour le parasite. Nous avons ainsi isolé chez des saumons résistants à l'infestation un sémiochimique nommé SCAIS (Sea Lice Copepodit Attachment Inhibiting Semiochemical) qui permet de réduire significativement le nombre de copépodites attachés sur des saumons traités. Nous nous sommes alors intéressés aux mécanismes d'action de cette SCAIS, à savoir s'il s'agit d'un allélochimique (interspécifique) ou d'une phéromone (intraspécifique). Grâce à la comparaison de saumons au système olfactif altéré et de saumons témoins, traités ou non à la SCAIS, nous avons pu supposer que la SCAIS est une phéromone du saumon. Cette SCAIS, une fois captée par le saumon, engendrerait une réaction physiologique ou comportementale, permettant au saumon de se protéger contre l'infestation par le parasite *L. salmonis*.

Chapitre 2 : Critique méthodologique

1. Choix des espèces étudiées

En pisciculture, l'élevage des salmonidés n'est pas le plus important en quantité de viande produite. Les poissons les plus élevés au monde étant les cyprinidés (carpe herbivore, carpe argentée, etc…) et les cichlidés (Tilapia du Nil) (FAO 2016a). S'intéresser aux espèces les plus produites mondialement comme les espèces de carpes et le Tilapia du Nil pourrait également revêtir un intérêt. En effet, ces espèces de poissons sont de plus en plus consommées dans le monde, et la question de leur bien-être en élevage est tout aussi importante qu'en élevage de salmonidés. Il pourrait alors être judicieux de s'intéresser à des méthodes d'évaluation et de contrôle du stress chez ces espèces d'importance. Mais contrairement aux salmonidés, le tilapia du Nil et les différentes espèces de carpes sont des poissons élevés depuis plusieurs siècles. Ces espèces sont donc considérées comme domestiquées, à l'inverse de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique (Balon 1995; Osure and Phelps 2006). Nous avons donc choisi d'étudier le stress chez les salmonidés d'élevage car cela permet d'aborder les problématiques de gestion du stress chez des espèces en cours de domestication, qui y sont plus exposées du fait du non-achèvement de ce processus (Vandeputte and Prunet 2002). De plus, en termes de valeur économique, l'élevage de saumon Atlantique est le premier et celui de la truite arc-en-ciel 8ème (FAO 2016a; FAO 2016b; FAO 2016c). Les enjeux économiques pour ces espèces sont donc importants.

Le choix des individus dans les différentes études abordées dans cette thèse est basé sur la taille et le stade de vie des animaux. En effet, pour des raisons techniques, nous avons sélectionné des individus les plus petits possible pour éviter une densité d'élevage trop élevée dans nos tanks d'expérimentation, mais assez grands pour effectuer facilement un prélèvement de sang. Ainsi, nous avons exclusivement fait nos expérimentations avec des truites arc-en-ciel et des saumons Atlantique entre 60 et 200 g. Un autre critère concernant les saumons Atlantique a été pris en compte : le stade de vie. En effet, pour les études sur le parasite *Lepeophtheirus salmonis*, nous avons utilisé des smolts de saumon Atlantique provenant de fermes d'eau douce et smoltifiés directement dans notre laboratoire. Ceci permît

d'obtenir des saumons n'ayant jamais été en contact avec le parasite et ainsi d'éviter ce biais dans le dénombrement des copépodites attachés à la fin des expérimentations.

Le nombre d'individus inclus dans chaque essai a été préalablement estimé grâce aux études publiées sur ces sujets, et en accord avec le service statistique et le comité d'éthique de l'institut. Ce nombre d'individus peut être discuté pour la première étude sur la prédation répétée des truites arc-en-ciel. Dans cette étude, comme pour la plupart des autres études, l'unité expérimentale et statistique est le tank. Il y a donc deux répliques par groupe de traitement dans cet essai sur la prédation. L'étude, présentée comme étant préliminaire, reflète toutefois les mêmes résultats que des études similaires sur des espèces voisines (Kortan et al. 2011). Une étude avec plus d'individus, et donc plus de tanks, pourrait confirmer ces résultats préliminaires.

Concernant le parasite *Lepeophtheirus salmonis*, nous avons étudié le comportement du stade copépodite. En effet, selon le cycle de vie de ce parasite, le stade copépodite est caractérisé par la détection et l'attachement du parasite sur l'hôte. Il s'agit donc du stade infestant, un stade d'importance pour les stratégies de lutte contre le parasite. Le copépodite est capable de détecter les vibrations de l'eau créées par le poisson en mouvement. Il se propulse alors sur le poisson et s'y accroche grâce à une paire d'antennes préhensibles et une paire de maxillipodes en crochet (Pike and Wadsworth 1999). Une fois attaché sur le poisson, le copépodite analyse le mucus pour déterminer si le poisson est un hôte approprié. Si le poisson est un hôte convenable, le copépodite développe un filament frontal lui permettant de s'ancrer dans la peau, puis se métamorphose en Chalimus I. Si le poisson n'est pas un hôte approprié pour le parasite, il s'en détache (Pike and Wadsworth 1999). Le copépodite ne peut donc pas se nourrir tant qu'il n'est pas ancré sur son hôte. Des études en laboratoire ont montré qu'il pouvait survivre pendant 4 jours à 12°C grâce à des réserves lipidiques (Pike and Wadsworth 1999). Passé ce délai, le copépodite meurt. La propulsion et l'attachement sur un poisson non-hôte ont un coût biologique important pour le copépodite. L'énergie dépensée dans cette action impacte directement le temps de survie du copépodite. Le copépodite est donc un stade d'intérêt dans les stratégies de lutte contre le parasite. La perturbation de la détection de l'hôte par le copépodite constituerait une bonne stratégie. C'est pourquoi nous avons axé nos recherches sur ce stade pour étudier l'influence du stress sur ce phénomène et, en parallèle, proposer une méthode de lutte contre le parasite.

Le nombre de copépodites utilisé dans chaque test est de 60 par saumon. Ce chiffre a d'abord été estimé selon les conseils d'un laboratoire d'élevage du parasite (Ilab©), puis vérifié dans nos laboratoires comme étant suffisant pour démontrer une éventuelle différence significative dans le nombre final de copépodites attachés. Dans l'étude n°4, sur l'effet du stress de manipulation sur l'attractivité des saumons pour le parasite, nous avons divisé la pression parasitaire par deux. En effet, dans cette étude, les saumons ne sont pas testés individuellement mais par groupe de quatre. Il était donc nécessaire de diviser ce nombre de copépodites par deux pour éviter une forte pression parasitaire trop éloignée des conditions rencontrées dans la nature et qui aurait pu nuire à la mise en évidence de résultats significatifs.

2. Pertinence des protocoles expérimentaux

Les paramètres de mesure du stress sélectionnés dans cette thèse font suite à une bibliographie sur le sujet et sont en accord avec les objectifs de chaque étude. Concernant les paramètres physiologiques, le cortisol représente un bon indicateur de stress aigu mais un indicateur limité en situation de stress chronique. En effet, la libération de cortisol dans la circulation sanguine succédant à un événement stressant est facilement mesurable à partir de 30 min après le stimulus et jusqu'à 3 h après (Fast et al. 2008; Martinez-Porchas et al. 2009). Dans le cas d'un stress chronique, la situation est plus complexe. En effet, les cellules propres du tissu interrénal sécrètent moins de cortisol à cause d'une diminution du nombre de récepteurs à l'ACTH à leur surface (Martinez-Porchas et al. 2009). Le taux de cortisol plasmatique reste alors à un niveau basal alors que l'individu est en situation de stress chronique. C'est pourquoi le cortisol est un paramètre intéressant et indispensable mais qui doit toujours être mesuré avec d'autres paramètres pour pouvoir interpréter les résultats. De nombreux facteurs, hors situation de stress, peuvent influencer ce taux de cortisol. Ces facteurs sont intrinsèques et extrinsèques : intrinsèques comme l'âge de l'individu, l'héritabilité, le sexe, le statut social, et extrinsèques comme les facteurs abiotiques (température, luminosité, période de la journée, pollution, etc…) et biotique (maladie, parasite,…) (Martinez-Porchas et al. 2009). Ces facteurs peuvent être négligés en testant des groupes les plus homogènes possible (même âge, même sexe, même taille/poids, même condition d'élevage). L'étude de Sheriff et al. (2011) montre également que l'interprétation des résultats sur le taux de cortisol plasmatique est complexe. Notamment, la réponse physiologique d'un organisme suite à un stress ne dépend pas uniquement du taux (hauteur du pic) mais également de la durée de la réponse (magnitude) (Sheriff et al. 2011). Dans le cas du

stress chronique, on pourra associer le taux de cortisol plasmatique à d'autres paramètres physiologiques, comportementaux ou zootechniques possiblement modifiés dans cette situation. C'est la conclusion de notre deuxième étude dans laquelle le taux de cortisol plasmatique est associé à la prise alimentaire (comportement), la croissance et l'indice de consommation (zootechnie) pour évaluer efficacement le bien-être des poissons en situation de stress d'adaptation. Dans l'étude sur l'influence du stress chronique sur l'infestation, le taux de cortisol est mesuré avec un autre paramètre physiologique : le comptage de cellules du sang. La mesure du pourcentage de neutrophiles et de lymphocytes dans le sang peut mettre en évidence une lymphopénie dans le cas d'un stress chronique et donc une baisse de l'activité immunitaire. Ainsi, dans cette étude, le statut de stress chronique des individus étudiés est confirmé par un taux de cortisol basal associé à une neutrophilie et une lymphopénie. La mesure du ratio neutrophile/lymphocyte permet de mesurer indirectement l'état immunitaire de l'organisme (Houston et al. 1996; Davis et al. 2008). En effet, les anticorps ou immunoglobulines sont produits par les lymphocytes. Ainsi, l'étude de Espelid et al. (1996) montre chez le saumon Atlantique que l'injection répétée de cortisol induit une lymphopénie qui induit elle-même une baisse de la production d'immunoglobulines et donc un affaiblissement du système immunitaire face à une infection par *Aeromonas salmonicida*. La mesure d'anticorps pourrait également être un bon indicateur de stress chronique (Espelid et al. 1996). Dans nos études, nous avons choisi de mesurer directement le pourcentage de lymphocyte dans le sang et le ratio neutrophile/lymphocyte. D'un point de vue technique, ces paramètres ne nécessitent qu'une goutte de sang pour réaliser les frottis et constituent donc une méthode adaptée à la réalité des recherches en laboratoire.

Un autre paramètre du stress chronique validé par d'autres études est l'index hépatosomatique (Barton et al. 1987; Basrur et al. 2010). Toutefois, ce paramètre est un bon indicateur de stress chronique uniquement dans certaines conditions. Selon ces auteurs et les résultats de nos études, l'index hépatosomatique n'est significativement réduit qu'avec des stress de très longue durée (Barton et al. 1987; Basrur et al. 2010). En effet, la libération constante de cortisol et la sollicitation du foie pour la libération de glucose conduisent à une atrophie du foie et donc une réduction de sa masse en situation de stress chronique. Cette réduction significative du foie n'est visible qu'à partir de 10 semaines de stress de manipulation dans l'étude de Barton et al. (1987) et 9 semaines de stress d'allotement dans l'étude de Basrur et al. (2010). Dans notre deuxième étude, il est alors logique de ne pas impliquer ce paramètre dans l'évaluation du bien-être de truites en stress d'adaptation depuis

15 jours. En revanche, dans l'étude sur la réponse physiologique de truites arc-en-ciel soumises à une prédation répétée, la mesure de ce paramètre est pertinente. En effet, ces truites étaient soumises aux attaques d'oiseaux piscivores à partir du stade *fingerlings* (individus âgés de 2 mois) et jusqu'à leur inclusion dans notre essai (individus âgés de 6 mois).

Les réponses physiologiques après un événement stressant influencent le comportement et les performances zootechniques de l'individu. Plusieurs paramètres comportementaux et zootechniques peuvent ainsi être de bons indicateurs de stress aigu ou chronique. Concernant le comportement, nous avons choisi de mesurer la prise alimentaire dans l'étude proposant une méthode d'évaluation du bien-être de la truite arc-en-ciel en situation de changement d'environnement. En effet, plusieurs études montrent une réduction de la recherche de nourriture et de la prise alimentaire après un stress chez la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique (Øverli et al. 2002; Folkedal et al. 2012). La modification de ce comportement peut être expliquée par une baisse dans la capacité d'attention du poisson. En effet, la truite et le saumon sont deux carnivores qui se nourrissent naturellement de proies mobiles. En élevage, ces salmonidés déclenchent leur comportement de prise alimentaire quand la croquette coule au fond du bassin. Une fois immobile, la croquette ne sera pas consommée. La truite et le saumon ne disposent donc que d'un court laps de temps pour déclencher leur séquence comportementale permettant la consommation de la croquette. Le stress physiologique, et notamment l'augmentation de cortisol plasmatique, semble diminuer cette capacité de réaction. Ce cortisol peut également avoir un effet indirect sur la prise alimentaire à cause de la libération de glucose par le foie. L'augmentation de la glycémie peut déclencher une perte de l'appétit et donc une réduction de la prise alimentaire (Gregory and Wood 1999; Øverli et al. 2004; Folkedal et al. 2012). La conséquence directe de cette diminution de la prise alimentaire est une diminution de la croissance. La croissance est également un bon indicateur de stress (Gregory and Wood 1999; Basrur et al. 2010). Toutefois, plusieurs facteurs peuvent influencer cette croissance. La prise alimentaire (d'origine comportementale) et l'indice de consommation (d'origine physiologique) influent directement sur la croissance des salmonidés d'élevage. En effet, l'indice de consommation peut être augmenté dans le cas d'un stress chronique dû à une plus faible assimilation de la nourriture par l'organisme. La mesure de la prise alimentaire, puis de l'indice de consommation, peuvent donc permettre de comprendre l'origine d'une diminution de la croissance, c'est-à-dire comportementale ou

physiologique. Nous avons donc choisi de mesurer ces trois paramètres dans l'évaluation du bien-être de la truite arc-en-ciel d'élevage transférée en laboratoire.

Dans l'étude de la prédation répétée sur la réponse physiologique de truites arc-en-ciel d'élevage, nous avons simulé l'attaque d'un oiseau piscivore en utilisant un leurre en plastique. Ce leurre représentait le héron cendré (*Ardea cinerea*), qui est un prédateur commun pour les truites incluses dans notre essai. Nous pouvons nous interroger sur l'efficacité d'une telle procédure dans le déclenchement d'un stress. En effet, plusieurs paramètres diffèrent entre le leurre et l'animal vivant. L'aspect visuel de l'animal est différent du leurre, mais également son comportement. La séquence comportementale de l'attaque du héron cendré ne peut pas être reproduite avec un leurre. Ce constat nous amène à nous interroger sur la capacité des truites à faire la différence entre une réelle attaque et l'utilisation d'un leurre. Toutefois, l'utilisation d'un héron en plastique pour simuler l'attaque d'un prédateur a déjà été effectuée par d'autres chercheurs (Johnsson et al. 2001; Thomson et al. 2012). Dans ces études, les auteurs ont démontré l'efficacité de cette méthode dans le déclenchement d'un stress physiologique et comportemental. En effet, ils ont montré une augmentation du rythme cardiaque et une augmentation de la durée du comportement de fuite (Johnsson et al. 2001). D'autres études ont utilisé des odeurs de prédateurs aquatiques pour simuler une attaque. Par exemple, dans l'étude Brown and Smith (1998), les truites arc-en-ciel soumises à de l'eau d'élevage d'un Grand brochet (*Esox lucius*) montrent une augmentation de comportements anti-prédateurs (i.e. diminution du comportement de *foraging*, et augmentation des comportements de mise à l'abri et de *freezing*). Toutefois, comme nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse à propos du système auditif, les salmonidés ont moins la capacité d'appréhender l'approche d'un prédateur aérien qu'aquatique (Hawkins and Johnstone 1978; Schellart and Buwalda 1990). Dans notre étude, il était donc plus pertinent de s'intéresser aux prédateurs communs rencontrés en élevage de la truite arc-en-ciel d'eau douce, les oiseaux piscivores, via l'utilisation d'un leurre déjà validé par la littérature.

Pour mesurer l'attractivité des saumons Atlantique pour le parasite *Lepeophtheirus salmonis*, le test d'infestation élaboré durant cette thèse permet de compter directement le nombre de copépodites attachés sur le saumon en fin de test. Ce paramètre est simple et direct et permet d'apprécier, sans biais de jugement possible, le niveau d'infestation de chaque poisson. Durant notre test, les copépodites sont en contact avec le saumon durant 40 min. Cette période ne permet pas au copépodite de développer son filament frontal. En effet, un regroupement cellulaire à l'origine du filament frontal peut être observable dans les 48 h

suivant l'attachement du copépodite sur son hôte (Gonzalez-Alanis 2000). La pertinence de la mesure du nombre de copépodites attachés sur le saumon dans un test de 40 min pourrait alors être discutée. Toutefois, il est à prendre en compte le coût biologique engendré par l'attachement du copépodite sur un poisson non approprié. Le copépodite ne disposant que d'une réserve lipidique limitée pour sa survie a tout intérêt à limiter ces attachements infructueux. Des études ont montré que le copépodite est capable de détecter, à distance, des sémiochimiques libérés par le mucus du poisson (Bailey et al. 2006; Pino-Marambio et al. 2007; Mordue Luntz and Birkett 2009). La perception chimique à distance permet au copépodite de sélectionner les hôtes appropriés à son attachement et limiter les coûts énergétiques d'un attachement inefficace. On peut donc supposer que la mesure du nombre de copépodites attachés dans notre test reflète bien l'infestation du saumon par le parasite.

Dans l'étude des mécanismes d'action de la SCAIS, nous avons comparé des saumons au système olfactif altéré à des saumons témoins. Nous avons produit cette altération du système olfactif par l'injection d'une solution de sulfate de zinc et procaïne. Cette méthode est utilisée dans l'étude de Booth and Katz (2000) pour rendre anosmique des brebis et étudier l'impact de cette anosmie sur les relations entre la brebis et son agneau. Dans cette étude, l'anosmie a été confirmée en présentant devant les nasaux des brebis une ampoule d'ammoniac. Si les brebis ne réagissaient pas à ce gaz (comportement d'évitement), elles étaient considérées anosmiques. Dans notre étude, nous avons choisi d'étudier l'altération cellulaire du tissu olfactif après l'analyse histologique de la rosette. Les altérations du tissu olfactif ne permettent pas de conclure définitivement sur une anosmie totale ou partielle des saumons testés. Quelle que soit la nature et l'intensité de ces lésions cellulaires, une altération fonctionnelle du système olfactif est possible. Cette altération fonctionnelle peut être mise en évidence par un test similaire à l'étude sur les brebis, en présentant une odeur répulsive aux saumons. Le choix de cette odeur pose question. En effet, des études ont montré une augmentation du comportement de *freezing* et une diminution du comportement de *foraging* des salmonidés soumis à une odeur de prédateur (Brown and Smith 1998). Toutefois, l'utilisation d'odeur répulsive pour tester l'anosmie des saumons inclus dans notre essai peut poser problème. Les substances volatiles introduites dans l'eau peuvent se fixer sur le mucus du saumon et perturber notre étude sur l'efficacité de la SCAIS. C'est pourquoi nous n'avons pas procédé à ce test d'anosmie fonctionnelle et avons choisi de mesurer l'altération du système olfactif directement par analyse histologique des rosettes des saumons traités au sulfate de zinc. Dans l'étude réalisée par Liley et al. (1993), les saumons sont rendus

anosmiques par cautérisation des narines du saumon. Pour ce faire, une boucle de fil de fer chauffée à blanc est introduite dans la cupule olfactive de chaque narine du saumon. La méthode utilisée est efficace mais présente des inconvénients. En effet, la douleur engendrée par la procédure peut entrainer une réponse physiologique importante et perturber le comportement du poisson. Les études anatomiques et physiologiques ont montré que les poissons étaient pourvus de nocicepteurs et sont donc capables de ressentir la douleur (Chandroo et al. 2004; Braithwaite and Ebbesson 2014). C'est pourquoi nous n'avons pas retenu cette procédure pour l'altération du système olfactif des saumons. De plus, la question des conséquences de l'anosmie totale sur le comportement et la physiologie des saumons se pose. En effet, nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, l'olfaction est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques chez le saumon : la recherche de nourriture, la communication inter- et intraspécifique, et la migration. L'olfaction a toujours été liée aux émotions chez l'Homme, surtout grâce à l'étude de personnes anosmiques présentant des réactions de peur et d'anxiété (Clepce et al. 2012). La littérature scientifique sur les rongeurs montre également que l'anosmie provoque des comportements d'anxiété (Kudyakova et al. 2007). Ces conséquences de l'anosmie ont récemment été étudiées chez le poisson Zèbre (*Danio rerio*) : les poissons rendus anosmiques présentent plus de comportements d'anxiété (i.e. augmentation de comportement erratique et augmentation du temps passé dans le fond du tank) que les poissons témoins (Abreu et al. 2016). L'anosmie totale peut donc induire des perturbations dans le comportement et la physiologie des saumons.

.

Chapitre 3 : Discussion des résultats et mise en perspective avec la littérature

1. Les conséquences du stress

En étudiant la réponse physiologique, comportementale et zootechnique de truites arc-en-ciel d'eau douce soumises à une prédation répétée par des oiseaux piscivores d'une part, puis en situation de changement d'environnement d'autre part, nous avons pu mieux comprendre les stratégies adaptatives des organismes face à une situation stressante. Dans la première situation, les truites soumises à la prédation répétée ne présentent plus de réponse physiologique à la suite d'une attaque de prédateur. Nous avons mis en évidence ici un phénomène d'habituation au stress. Cette stratégie permet à l'organisme de maintenir une réponse comportementale tout en évitant les effets négatifs de l'augmentation du taux de cortisol plasmatique ou de catécholamines dans l'organisme. Ce phénomène d'habituation à un prédateur a également été mis en évidence chez le saumon Atlantique face au héron (Johnsson et al. 2001). Dans cette étude, les saumons présentaient un rythme cardiaque moins élevé, ainsi qu'une durée moins longue du comportement de fuite après une seconde attaque du prédateur comparée à la première (Johnsson et al. 2001). Dans ce cas, les saumons maintiennent le comportement de fuite mais en réduisent la durée car ils peuvent contourner ce danger plus rapidement (Johnsson et al. 2001). De manière générale, l'habituation à un stress est une stratégie adaptative bénéfique pour l'organisme lui permettant de faire face à cet événement (Broom 2008). Nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, le stress est définit par Broom and Johnson (1993) comme étant « un effet de l'environnement sur l'individu qui se surimpose à ses systèmes de contrôle et induit des réactions adverses, réduisant à terme son adéquation à l'environnement (*fitness*) ». L'habituation est une stratégie adaptative à un stress répété qui permet à l'organisme de rester en adéquation avec son environnement et donc de maintenir sa *fitness*. D'autres stratégies adaptatives à un stress existent comme la sensibilisation. Dans ce cas, l'organisme a une réponse physiologique ou comportementale plus forte à un second événement stressant comparé au premier. Cette stratégie permet à l'organisme de répondre plus rapidement pour faire face à l'événement stressant. C'est le cas par exemple chez la truite arc-en-ciel (Pickering and Pottinger 1987), le

saumon argenté (*Oncorhynchus kisutch*) (Redding et al. 1984), l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) (Vijayan and Leatherland 1990) et la carpe commune (*Cyprinus carpio*) (Ruane 2002) qui présentent un taux de cortisol plasmatique plus élevé après un stress aigu chez les individus préalablement en état de stress chronique (confinement) que les individus témoins. Ces résultats montrent que les individus en état de stress chronique ont une sensibilisation de l'axe HPA face à un stress aigu (Mormède et al. 2007).

En revanche, cette capacité à faire face à un événement stressant pour maintenir sa *fitness* est plus difficile dans le cas d'un stress multiple. Dans notre deuxième étude, nous avons étudié le cas du changement d'environnement. Cet événement implique une multitude de facteurs de stress comme le changement de la température, du courant d'eau, de la hiérarchie entre les poissons, du changement de nourriture, etc…. Les poissons peuvent donc difficilement faire face à cette situation qui peut amener à un état de stress chronique. Nous l'avons vu, les truites stressées chroniquement présentent entre autres, une diminution de la croissance, de la prise alimentaire, et une augmentation de l'indice de consommation, de la morbidité et de la mortalité (Van Weerd and Komen 1998; Gilmour et al. 2005). Dans notre étude, la mesure du taux de cortisol plasmatique, la croissance, la prise alimentaire et l'indice de consommation sont des paramètres intéressants pour l'évaluation du bien-être des truites en situation de changement d'environnement (Delfosse et al. 2016). De manière générale, la mesure et le recoupement de plusieurs paramètres physiologiques, comportementaux et zootechniques permettent d'évaluer plus précisément le bien-être des animaux d'élevage (Broom 2007; Broom and Fraser 2007). L'analyse multivariée pour recouper plusieurs paramètres est également utilisé par Turnbull et al. (2005) pour évaluer le bien-être du saumon Atlantique dans différentes densités d'élevage. Les auteurs montrent ainsi que la période d'échantillonnage, la position de la cage d'élevage et la densité d'élevage sont des paramètres importants qui influencent directement le bien-être des saumons (Turnbull et al. 2005). La méthode de l'analyse multivariée semble donc être intéressante pour l'évaluation du bien-être des animaux d'élevage. D'autres paramètres peuvent être inclus dans ces analyses multivariées pour augmenter la précision de l'évaluation du bien-être. Chez les mammifères, certains nouveaux paramètres du bien-être animal sont à l'étude tels que le taux d'ocytocine (Ishak et al. 2011) et les comportements de jeu (Mintline et al. 2013). Il serait intéressant de rechercher aussi de nouveaux paramètres de bien-être chez les salmonidés et les autres poissons d'élevage. Des études montrant le lien entre stress, adaptation à l'environnement et neuropeptides hypophysaires (arginine-vasotocine et isotocine, l'équivalent du système

arginine-vasopressine/ocytocine existant chez les mammifères) chez la truite arc-en-ciel ont déjà été réalisées (Kulczykowska and Stolarski 1996; Kulczykowska 1997; Kulczykowska 1999; Kulczykowska 2001). En outre, chez la dorade royale (*Sparus aurata*), le système arginine-vasotocine/isotocine est impliqué dans l'adaptation à l'environnement, plus précisément l'acclimatation à long-terme à différentes salinités (Kleszczynska et al. 2006). Au niveau éthologique, pour les salmonidés par exemple, le *schooling* (nage en banc (Lopez et al. 2012) permettant d'optimiser la recherche de nourriture et la protection contre les prédateurs (Pitcher 1986)) est un comportement naturel qui pourrait être un indicateur de bien-être (Martins et al. 2012). L'évaluation du bien-être des salmonidés d'élevage pourra alors se faire grâce au recoupement de paramètres de bien-être et de stress.

Nous l'avons vu, les conséquences du stress sur la physiologie, le comportement et les performances zootechniques des salmonidés sont différentes suivant la nature et la fonctionnalité du stress. Les conséquences du stress chronique sont nombreuses : diminution de la croissance, réduction de la prise alimentaire, baisse de l'activité immunitaire, augmentation de la morbidité et mortalité. En effet, l'affaiblissement du système immunitaire induit par une lymphopénie engendre une plus forte exposition des individus aux maladies. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre le stress et la pathologie, en prenant comme exemple le parasite *Lepeophtheirus salmonis*.

2. Interaction stress pathologie : le cas du pou du saumon *Lepeophtheirus salmonis*

Nous avons étudié l'infestation par le parasite en fonction de l'état de stress (aigu et chronique) du saumon. Nous avons démontré que les saumons soumis à un stress aigu sont plus attractifs pour le parasite que les saumons témoins, mais qu'il n'y a aucune différence dans l'infestation des saumons stressés chroniquement ou pas. Nous avons vu que le copépodite s'attache sur le saumon pour se nourrir de son mucus, de sa peau et de son sang. Le mucus a donc un rôle important dans les interactions entre le parasite et son hôte. Le copépodite déclenche son comportement d'attachement sur le poisson après avoir détecté les vibrations de l'eau créées par le poisson. Des études ont également montré que le copépodite était capable de détecter des sémiochimiques libérés par le mucus du poisson (Ingvarsdóttir et al. 2002; Bailey et al. 2006; Mordue Luntz and Birkett 2009). Une fois attaché sur son hôte, le copépodite analyse le mucus et peut se détacher si le poisson n'est pas un hôte approprié. Plusieurs paramètres du mucus peuvent donc intervenir dans ce comportement d'attachement

comme la composition du mucus en substances chimiques, dont les sémiochimiques, sa teneur en anticorps, et sa texture. D'après nos résultats, on peut en effet supposer que les copépodites sont capables de discriminer à distance un saumon stressé d'un saumon non-stressé. Ce phénomène pourrait être possible grâce à la présence de métabolites de glucocorticoïdes dans le mucus (Ellis et al. 2013) et détectés par le copépodite. De plus, l'étude de Easy and Ross (2010) montre que la composition du mucus en protéines et enzymes du saumon Atlantique est modifiée après un stress aigu ou chronique. Cette étude montre donc que la composition du mucus du saumon, et potentiellement sa composition en sémiochimique, change après un événement stressant. On peut également s'interroger sur la teneur en anticorps du mucus. Les anticorps dans le mucus pourraient éventuellement altérer le développement du filament frontal du copépodite. Dans le cas d'un stress chronique, la baisse de production d'anticorps dans le mucus pourrait ainsi avoir comme conséquence une augmentation de l'infestation si le développement du filament frontal n'est plus entravé. Dans notre test, aucune augmentation de l'infestation ne peut être démontrée dans le cas d'un stress chronique, puisque les copépodites sont détachés du saumon avant le début de développement du filament frontal. D'un point de vue biomécanique, la texture du mucus peut également influencer la capacité d'attachement du copépodite sur le saumon. Principalement, la teneur du mucus en glycoprotéines influence directement sa texture (Shephard 1994). Le stress augmente aussi la quantité de mucus produit (Shephard 1994). Le niveau de stress peut donc influencer sur la texture et l'épaisseur du mucus et ainsi jouer un rôle biomécanique inhibant les capacités du copépodite à s'attacher sur son hôte. D'après nos résultats, le stress aigu favorise l'attachement des copépodites sur son hôte. Ces résultats sont intéressants sachant que les saumons peuvent subir un stress aigu de manipulation durant le cycle de production et notamment lors des contrôles de comptage des poux du saumon et pour l'application des traitements contre ces parasites. La situation est ici dénoncée comme étant paradoxale. Lutter contre ces sources de stress en élevage permettrait alors de diminuer l'infestation.

3. Méthode de lutte contre le parasite *Lepeophtheirus salmonis*

Les traitements actuels de lutte contre le parasite *Lepeophtheirus salmonis* sont de plus en plus inefficaces à cause des résistances (Aaen et al. 2015) et de leur toxicité pour l'environnement (Shao 2001; Denholm et al. 2002; Frazer 2009; Igboeli et al. 2014; Samuelsen et al. 2014; Nostbakken et al. 2015). Le saumon étant un poisson à viande riche en lipides, des résidus de ces produits phytosanitaires peuvent se retrouver dans la viande destinée à la consommation (Berntssen et al. 2011; Nostbakken et al. 2015). Des stratégies

alternatives sont donc développées pour lutter contre ce parasite (Deady et al. 1995; Raynard et al. 2002; Bricknell et al. 2003; Molloy et al. 2011; Gharbi et al. 2015). La sémiochimie apparait alors comme un moyen de lutte intéressant abordé par Ingvarsdóttir et al. (2002). Selon le même principe, nous nous sommes donc intéressés à la sémiochimie impliquée dans la relation entre le parasite et son hôte, et plus particulièrement entre le stade infestant de *Lepeophtheirus salmonis* et son hôte de préférence, le saumon Atlantique. La première étude sur le sujet consistait en un screening de différentes compositions de molécules sélectionnées après la comparaison de plusieurs mucus de salmonidés infestés ou non en milieu infesté ou non. Les saumons non-infestés en présence d'individus infestés présentaient alors un intérêt tout particulier. Une composition est alors mise en évidence comme étant inhibitrice de l'attachement du copépodite sur le saumon Atlantique, la SCAIS. La SCAIS est validée lors d'une deuxième étude contre contrôle positif (saumon non traité) et négatif (un poisson non-hôte, la morue *Gadus morhua*). Cette découverte n'exclut en rien l'existence d'éventuelles compositions supplémentaires ou une amélioration de la SCAIS aux propriétés similaires. En effet, d'autres études ont démontré l'existence de molécules inhibitrices de l'attachement du parasite sur le saumon comme la 2-aminoacétophénone et la 4-méthylquinazoline issues du turbot (*Scophthalmus maximus*) (Bailey et al. 2006; Hastie et al. 2013), ou comme attractif du pou du saumon comme l'isophorone et la 6-méthyl-5-hepten-2-one issues du saumon Atlantique lui-même (Ingvarsdóttir et al. 2002; Bailey et al. 2006). La SCAIS ne contient aucun de ces éléments dans sa composition et il pourrait être intéressant de coupler certaines de ces molécules pour vérifier leurs propriétés.

L'étude des mécanismes d'action de la SCAIS permet de supposer qu'il s'agit d'une phéromone du saumon Atlantique. En effet, l'efficacité de la SCAIS n'est pas retrouvée chez les saumons dont le système olfactif a été altéré. D'après les résultats de nos études précédentes sur l'effet du stress des saumons sur l'infestation par le parasite, on peut supposer que la SCAIS agit directement sur le niveau de stress du saumon. La SCAIS serait alors une phéromone apaisante. Les phéromones apaisantes existent chez d'autres espèces animales terrestres comme chez le chien (Gaultier et al. 2008), le chat (Pageat 1998), le cheval (Falewee et al. 2006) et la poule (Madec et al. 2008; Pageat et al. 2010; Delfosse et al. 2011). La diminution du stress des saumons traités à la SCAIS impliquerait une modification du mucus intervenant dans les interactions entre le saumon et le parasite, comme expliqué précédemment. De plus, les mécanismes d'actions de la SCAIS empêcheraient le

développement de résistance, puisqu'elle n'interviendrait pas directement sur le parasite mais sur le saumon.

Les perspectives de ce projet sont donc nombreuses. La SCAIS est un outil intéressant à développer en laboratoire puis en ferme pour savoir si ces propriétés inhibitrices de l'attachement du copépodite sur le saumon sont suffisantes pour lutter efficacement contre le parasite en élevage. La SCAIS étant naturellement sécrétée par le mucus du saumon, les molécules la composant sont entièrement inoffensives pour l'environnement. C'est un grand avantage comparé aux parasiticides utilisés jusqu'à maintenant (Shao 2001). De plus, la SCAIS étant un sémiochimique, les concentrations d'efficacité testées ici (3 ppm) sont très faibles et réduisent les risques de toxicité à la fois pour l'environnement et pour les saumons traités.

Parmi les autres projets à développer, il serait intéressant d'étudier d'autres communications sémiochimiques impliquées dans les relations entre le parasite et son hôte. D'un point de vue biologique par exemple, il serait cohérent que les stades de vies inférieurs du parasite (nauplius I et II, qui sont des stades larvaires libres) aient développé des stratégies pour se localiser dans des zones proches de salmonidés. On peut alors imaginer que des sémiochimiques aux propriétés attractives soient sécrétées par les saumons et captées par les nauplius de *Lepeophtheirus salmonis*. Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse qui pourrait alors conduire au développement d'un produit complémentaire de la SCAIS pour piéger les nauplius par exemple.

L'utilisation de la SCAIS pourrait également s'associer à d'autres moyens de lutte alternative actuellement développés. C'est le cas des filets anti-plancton placés autour des cages jusqu'à 5 m de profondeur pour prévenir des entrées de parasites dans l'enceinte de la cage. En effet, les stades larvaires libres (nauplius et copépodite) sont attirés par la lumière (phototaxie) et auront tendance à se trouver vers la surface de l'eau (Tully and Nolan 2002). L'ajout d'une jupe de filet anti-plancton autour de la cage d'élevage des saumons peut être efficace pour limiter l'infestation par le parasite. Toutefois, cette méthode présente également des limites. En effet, le filet réduit le courant dans la cage et ainsi réduit l'apport en oxygène aux saumons. En outre, une cage équipée avec ce filet peut être endommagée par un courant trop fort (Lien et al. 2014). Les poissons nettoyeurs sont également utilisés dans les fermes pour lutter contre le pou du saumon (Skiftesvik et al. 2013a; Skiftesvik et al. 2013b). Ces poissons de la famille des *Labridae* sont des mangeurs de parasites qu'ils trouvent

naturellement sur le corps des autres poissons. Ajoutés dans les cages de saumon, ils permettent de limiter significativement l'infestation par *Lepeophtheirus salmonis* (Skiftesvik et al. 2013a). L'association de ces poissons nettoyeurs à la SCAIS pourrait constituer une méthode de lutte efficace contre le parasite.

CONCLUSION

L'aquaculture s'est développée ces dernières années de manière exponentielle. La demande croissante des consommateurs pour la viande de poisson et la surpêche ont conduit au développement rapide de ce type d'élevage. La salmoniculture est une activité récente qui a débuté dans les années 1960 pour une production de plusieurs millions de tonnes par an actuellement. Le processus de domestication récent de la truite arc-en-ciel et du saumon Atlantique, ainsi que le développement rapide des méthodes d'élevage, sont à l'origine de nombreux problèmes dans la production. Le but de cette thèse était d'améliorer les connaissances sur le stress des salmonidés d'élevage et de proposer des méthodes d'évaluation et du contrôle de ces stress.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux conséquences du stress sur la physiologie, le comportement et les performances zootechniques des salmonidés d'élevage. L'étude de la réponse physiologique de truites arc-en-ciel, soumises à une prédation répétée par les oiseaux piscivores, nous a permis de mettre en évidence un phénomène d'habituation au stress. Nos résultats et la littérature scientifique sur le sujet montrent que les poissons soumis à une prédation répétée maintiennent une réponse comportementale (la fuite) sans réponse physiologique. Cette stratégie adaptative permet aux organismes de faire face à l'événement tout en évitant les conséquences physiologiques qui réduisent la *fitness* de l'individu. A l'inverse, la sensibilisation à un stress est une autre stratégie d'adaptation qui permet à l'organisme de répondre plus rapidement à un événement stressant. Après avoir étudié cette modalité de stress, nous avons étudié le cas d'un événement impliquant plusieurs inducteurs de stress : le changement d'environnement. La mesure et le recoupement de paramètres physiologiques, comportementales et zootechniques nous ont permis de proposer une méthode d'évaluation du bien-être des truites en situation d'adaptation à un nouvel environnement. De manière générale, la mesure de plusieurs paramètres indicateurs de stress ou de bien-être permet d'évaluer avec précision le bien-être des animaux d'élevage. A partir de ces deux modalités de stress nous avons montré les conséquences du stress sur les salmonidés d'élevage, et notamment la baisse de l'immunité dans le cas d'un stress chronique. Cette baisse de l'activité immunitaire rend les organismes plus sensibles aux infestations.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'interaction entre le stress et la pathologie, avec le cas particulier de l'ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. L'infestation des saumons par ce parasite engendre un état de stress chronique dû aux lésions créées par le parasite se nourrissant de la peau et du mucus du poisson. Si les effets de l'infestation sur le niveau de stress des saumons sont connus, le contraire n'a jamais été étudié. Nous avons montré que les

saumons Atlantique soumis à un stress aigu sont plus infestés par le parasite que les saumons non-stressés. En revanche, les saumons stressés chroniquement ne sont pas plus infestés que les saumons non-infestés. Ces études montrent l'intérêt de contrôler les événements stressants en condition d'élevage afin de limiter l'infestation par le parasite. De plus, ces études ont permis de comprendre les interactions entre le stade infestant du parasite (copépodite) et son hôte. Le niveau de stress de l'hôte pourrait alors influencer la nature de son mucus et ainsi perturber la détection de l'hôte par le parasite. En effet, le mucus libère des sémiochimiques intervenant dans la détection de l'hôte par le parasite.

A partir de ce constat nous avons donc étudié et comparé le mucus de saumons résistants et non résistants à l'infestation par le parasite. Les différences de composition du mucus nous ont permis d'isoler un sémiochimique inhibiteur de l'attachement du copépodite sur le saumon (SCAIS). L'étude des mécanismes d'action de la SCAIS nous a permis de supposer qu'il s'agit d'une phéromone de saumon. D'après les résultats obtenus dans l'étude de l'effet du stress des saumons sur l'infestation par le parasite, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la SCAIS réduirait le niveau de stress du saumon et donc réduirait l'infestation par le parasite. La mise au point de méthodes de lutte utilisant les sémiochimiques est une étape importante dans le remplacement des méthodes de lutte conventionnelle au moyen de parasiticides toxiques. L'application de telles méthodes (diffusion dans la cage) ne nécessitera pas de changement important des pratiques d'élevage, condition essentielle pour l'acceptabilité de cette stratégie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aaen SM, Helgesen KO, Bakke MJ, et al (2015) Drug resistance in sea lice: A threat to salmonid aquaculture. Trends in Parasitology 31:72–81. doi: 10.1016/j.pt.2014.12.006

Abreu MS, Giacomini ACV V, Kalueff A V., Barcellos LJG (2016) The smell of "anxiety": Behavioral modulation by experimental anosmia in zebrafish. Physiology and Behavior 157:67–71. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.01.030

Ashley PJ (2007) Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science 104:199–235. doi: 10.1016/j.applanim.2006.09.001

Bailey RJE, Birkett MA, Ingvarsdóttir A, et al (2006) The role of semiochemicals in host location and non-host avoidance by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) copepodids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 63:448–456. doi: 10.1139/F05-231

Balon EK (1995) Origin and domestication of the wild carp, Cyprinus carpio: from Roman gourmets to the swimming flowers. Aquaculture 129:3–48. doi: 10.1016/0044-8486(94)00227-F

Barcellos LJG, Kreutz LC, De Souza C, et al (2004) Hematological changes in jundiá (Rhamdia quelen Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture 237:229–236. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.03.026

Barton BA, Schreck CB, Barton LD (1987) Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms 2:173–185.

Basrur T V, Longland R, Wilkinson RJ (2010) Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (Salmo salar). Fish physiology and biochemistry 36:445–50. doi: 10.1007/s10695-009-9314-x

Beall E, de Gaudemar B (1999) Plasticité des Comportements de Reproduction Chez le Saumon Atlantique (Salmo salar) en Fonction des Conditions Environnementales. Cybium 23:9–28.

Bégout Anras M, Beauchaud M, Juell J, et al (2001) Environmental Factors and Feed Intake : Rearing Systems. In: Houlihan D, Boujard T, Jobling M (eds) Food Intake in Fish, Blackwell. Oxford, pp 157–188

Begout Anras M, Lagardere J (2004) Domestication et comportement chez les poissons téléostéens. INRA Production Animale 17:211–215.

Benhamed S, Guardiola F a., Mars M, Esteban MÁ (2014) Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. Veterinary Microbiology 171:1–12. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.008

Berntssen MHG, Aatland A, Handy RD (2003) Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (Salmo salar) parr. Aquatic Toxicology 65:55–72. doi: 10.1016/S0166-445X(03)00104-8

Berntssen MHG, Maage A, Julshamn K, et al (2011) Carry-over of dietary organochlorine pesticides, PCDD/Fs, PCBs, and brominated flame retardants to Atlantic salmon (Salmo salar L.) fillets. Chemosphere 83:95–103. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.01.017

Bidgood BF, Berst AH (1969) Lethal Temperatures for Great Lakes Rainbow Trout. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 26:456–459. doi: 10.1139/f69-044

Bjørge MH, Nordgreen J, Janczak AM, et al (2011) Behavioural changes following intraperitoneal vaccination in Atlantic salmon (Salmo salar). Applied Animal Behaviour

Science 133:127–135. doi: 10.1016/j.applanim.2011.04.018

Blaxter JHS (1988) Sensory performance, behavior, and ecology of fish. In: Fay RR, Popper AN, Tavolga WN (eds) Sensory Biology of Aquatic Animals, Springer-V. New-York, pp 203–232

Bleckmann H, Zelick R (2009) Lateral line system of fish. Integrative zoology 4:13–25. doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00131.x

Booth KK, Katz LS (2000) Role of the vomeronasal organ in neonatal offspring recognition in sheep. Biology of reproduction 63:953–958. doi: 10.1095/biolreprod63.3.953

Bowers JM, Mustafa a, Speare DJ, et al (2000) The physiological response of Atlantic salmon, Salmo salar L., to a single experimental challenge with sea lice, Lepeophtheirus salmonis. Journal of Fish Diseases 23:165–172. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00225.x

Boxaspen K (2006) A review of the biology and genetics of sea lice. ICES Journal of Marine Science 63:1304–1316. doi: 10.1016/j.icesjms.2006.04.017

Braithwaite VA, Ebbesson LOE (2014) Pain and stress responses in farmed fish. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties 33:245–253.

Bres M (1986) A new look at optimal foraging behaviour; rule of thumb in the rainbow trout. Journal of Fish Biology 29:25–36. doi: 10.1111/j.1095-8649.1986.tb04996.x

Bricknell IR, Hayes HE, Billingsly P, et al (2003) Vaccines against the salmon lice (lepeophtheirus salmonis)-A holy grail, or just around the corner?

Bron JE, Sommerville C, Jones M, Rae GH (1991) The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis. Journal of Zoology 224:201–212.

Broom DM (1986) Indicators of poor welfare. British Veterinary Journal 142:524–526. doi: 10.1016/0007-1935(86)90109-0

Broom DM (2007) Welfare in relation to feelings , stress and health. Revista electronica de Veterinaria 8:207–222.

Broom DM (2008) Welfare assessment and relevant ethical decisions: Key concepts. Annual Review of Biomedical Sciences 10:79–90. doi: 10.5016/1806-8774.2008.v10pT79

Broom DM, de Fontenay E, Broberg B, et al (2006) Le bien-être animal. Strasbourg

Broom DM, Fraser AF (2007) Domestic Animal Behaviour and Welfare. Cambridge

Broom DM, Johnson KG (1993) Stress and animal welfare. Dordrecht

Brown GE, Rive AC, Ferrari MCO, Chivers DP (2006) The dynamic nature of antipredator behavior: prey fish integrate threat-sensitive antipredator responses within background levels of predation risk. Behavioral Ecology and Sociobiology 61:9–16. doi: 10.1007/s00265-006-0232-y

Brown GE, Smith RJF (1998) Acquired predator recognition in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): conditioning hatchery-reared fish to recognize chemical cues of a predator. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55:611–617.

Burridge L, Weis JS, Cabello F, et al (2010) Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 306:7–23. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.020

Bustos PA, Young ND, Rozas MA, et al (2011) Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic

salmon (Salmo salar) farmed in Chile. Aquaculture 310:281–288. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.001

Cañon Jones HA, Noble C, Damsgård B, Pearce GP (2011) Social network analysis of the behavioural interactions that influence the development of fin damage in Atlantic salmon parr (Salmo salar) held at different stocking densities. Applied Animal Behaviour Science 133:117–126. doi: 10.1016/j.applanim.2011.05.005

Carr WES, Derby CD (1986) Chemically stimulated feeding behavior in marine animals - Importance of chemical mixtures and involvement of mixture interactions. Journal of Chemical Ecology 12:989–1011. doi: 10.1007/BF01638992

Chandroo KP, Duncan IJH, Moccia RD (2004) Can fish suffer?: Perspectives on sentience, pain, fear and stress. Applied Animal Behaviour Science 86:225–250. doi: 10.1016/j.applanim.2004.02.004

Chiszar D, Drake RW, Windell JT (1975) Aggressive Behavior in Rainbow Trout (Salmo gairdneri Richardson) of Two Ages. Behavioral Biology 13:425–431.

Clepce M, Reich K, Gossler A, et al (2012) Olfactory abnormalities in anxiety disorders. Neuroscience letters 511:43–6. doi: 10.1016/j.neulet.2012.01.034

Collin SP, Hart NS (2015) Vision and photoentrainment in fishes : the effects of natural and anthropogenic perturbation. Integrative Zoology 10:15–28. doi: 10.1111/1749-4877.12093.This

Costello MJ (2006) Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. Trends in parasitology 22:475–83. doi: 10.1016/j.pt.2006.08.006

Costello MJ (2009) The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. Journal of fish diseases 32:115–118. doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x

Courtenay SC, Quinn TP, Dupuis HMC, et al (1997) Factors affecting the recognition of population-specific odours by juvenile coho salmon. Journal of Fish Biology 50:1042–1060. doi: 10.1006/jfbi.1996.0374

Courtenay SC, Quinn TP, Dupuis HMC, et al (2001) Discrimination of family-specific odours by juvenile coho salmon: roles of learning and odour concentration. Journal of Fish Biology 58:107–125. doi: 10.1006/jfbi.2000.1432

Cunjak R (1988) Behavior and Microhabitat of Young Atlantic Salmon (Salmo salar) during Winter. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 45:2156–2160.

Davis AK, Maney DL, Maerz JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. Functional Ecology 22:760–772. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x

Deady S, Varian SJA, Fives JM (1995) The use of cleaner-fish to control sea lice on two Irish salmon (Salmo salar) farms with particular reference to wrasse behaviour in salmon cages. Aquaculture 131:73–90. doi: 10.1016/0044-8486(94)00331-H

Delfosse C, Bienboire-Frosini C, Chabaud C, et al (2016) Using physiological and zootechnical profiles to evaluate welfare in farmed rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) under stressful conditions. Aquaculture International 24:1449–1457. doi: 10.1007/s10499-016-0004-2

Delfosse C, Lafont Lecuelle C, Bougrat L, et al (2011) Effects of the maternal semiochemical Mother Hen Uropygial Secretion (Avizen®), on stress-related behaviours in hens housed

in “2012-type” cages. Avignon

Delfosse C, Pageat P (2014) Evidence of the effect of S.C.A.I.S (Sealice Copepodid Attachment Inhibiting Semiochemical) on the infesting behavior of Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results. In: Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference. Portland, p 27

Denholm I, Devine GJ, Horsberg TE, et al (2002) Analysis and management of resistance to chemotherapeutants in salmon lice, Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae). Pest Management Science 58:528–536. doi: 10.1002/ps.482

Drenner SM, Clark TD, Whitney CK, et al (2012) A synthesis of tagging studies examining the behaviour and survival of anadromous salmonids in marine environments. PLoS ONE 7:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0031311

Dukes JP, Deaville R, Gottelli D, et al (2006) Isolation and characterisation of main olfactory and vomeronasal receptor gene families from the Atlantic salmon (Salmo salar). Gene 371:257–67. doi: 10.1016/j.gene.2005.12.003

Easy RH, Ross NW (2010) Changes in Atlantic salmon Salmo salar mucus components following short- and long-term handling stress. Journal of fish biology 77:1616–31. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02796.x

EIFAC (1988) Report of the EIFAC working party on prevention and control of bird predation in aquaculture and fisheries operations. EIFAC Technical paper 51:79.

Ellis T, Sanders MB, Scott AP (2013) Non-invasive monitoring of steroids in fishes. Veterinary Medicine Austria 100:255–269.

Erikson U, Misimi E (2008a) Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. Journal of food science 73:C50–9. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00617.x

Erikson U, Misimi E (2008b) Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. Journal of food science 73:C50–9. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00617.x

Espelid S, Løkken GB, Steiro K, Bøgwald J (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (Salmo salar L.). Fish and Shellfish Immunology 6:95–110. doi: 10.1006/fsim.1996.0011

Esteve M (2005) Observations of spawning behaviour in Salmoninae: Salmo, Oncorhynchus and Salvelinus. Reviews in Fish Biology and Fisheries 15:1–21. doi: 10.1007/s11160-005-7434-7

European Medicines Agency (2011) Guideline on bioanalytical method validation. London

Falewee C, Gaultier E, Lafont C, et al (2006) Effect of a synthetic equine maternal pheromone during a controlled fear-eliciting situation. Applied Animal Behaviour Science 101:144–153. doi: 10.1016/j.applanim.2006.01.008

FAO (2016a) FishstatJ software 2.0.0.

FAO (2016b) Oncorhynchus mykiss. In: Programme d’information sur les espèces aquatiques cultivées. Oncorhynchus mykiss.

FAO (2016c) Salmo salar. In: Programme d’information sur les espèces aquatiques cultivées.

Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LOB (2008) Cortisol response and immune-related

effects of Atlantic salmon (Salmo salar Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. Fish & shellfish immunology 24:194–204. doi: 10.1016/j.fsi.2007.10.009

Fast MD, Sims DE, Burka JF, et al (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology 132:645–657. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00109-5

Ferrari MCO, Vavrek M a., Elvidge CK, et al (2008) Sensory complementation and the acquisition of predator recognition by salmonid fishes. Behavioral Ecology and Sociobiology 63:113–121. doi: 10.1007/s00265-008-0641-1

Fevolden S-E, Røed KH, Fjalestad KT (2002) Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. Aquaculture 205:61–75. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00660-3

Folkedal O, Stien LH, Torgersen T, et al (2012) Food anticipatory behaviour as an indicator of stress response and recovery in Atlantic salmon post-smolt after exposure to acute temperature fluctuation. Physiology & behavior 105:350–6. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.08.008

Frazer LN (2009) Sea-cage aquaculture, sea lice, and declines of wild fish. Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology 23:599–607. doi: 10.1111/j.1523-1739.2008.01128.x

Frederick CA, Brady D, Bricknell IR (2014) Determining the surface area of Atlantic salmon, Salmo salar. In: The 10th International Sea Lice Conference. Portland, p 140

Garside ET (1973) Ultimate upper lethal temperature of Atlantic salmon Salmo salar L. Canadian Journal of Zoology 51:898–900.

Gaultier E, Bonnafous L, Vienet-Legué D, et al (2008) Efficacy of dog-appeasing pheromone in reducing stress associated with social isolation in newly adopted puppies. The Veterinary record 163:73–80. doi: 10.1136/vr.163.3.73

Gharbi K, Matthews L, Bron J, et al (2015) The control of sea lice in Atlantic salmon by selective breeding. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society 12:0574. doi: 10.1098/rsif.2015.0574

Gilmour KM, Dibattista JD, Thomas JB (2005) Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. Integrative and comparative biology 45:263–73. doi: 10.1093/icb/45.2.263

Gjerde B, Ødegård J, Thorland I (2011) Estimates of genetic variation in the susceptibility of Atlantic salmon (Salmo salar) to the salmon louse Lepeophtheirus salmonis. Aquaculture 314:66–72. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.01.026

Glover KA, Nilsen F, Skaala O (2004) Individual variation in sea lice (Lepeophtheirus salmonis) infection on Atlantic salmon (Salmo salar). Aquaculture 241:701–709. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.07.030

Gonzalez-Alanis P (2000) Frontal Filament Morphogenesis in the Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis. University of Prince Edward Island

Grande T, de Pinna M (2004) The evolution of the Weberian apparatus: a phylogenetic perspective. In: Arratia G, Tintori A (eds) Systematics, Paleoenvironments and Biodiversity, Verlag. München, pp 429–448

Gregory TR, Wood CM (1999) The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. Physiological and biochemical zoology : PBZ 72:286–95. doi: 10.1086/316673

Groves PM, Thompson RF (1970) Habituation: a dual-process theory. Psychological Review 77:419–50.

Hamdani EH, Døving KB (2007) The functional organization of the fish olfactory system. Progress in Neurobiology 82:80–86. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.007

Hamre LA, Eichner C, Caipang CMA, et al (2013) The Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. PLOS ONE 8:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0073539

Harwood AJ, Armstrong JD, Metcalfe NB, Griffiths SW (2003) Does dominance status correlate with growth in wild stream-dwelling Atlantic salmon (Salmo salar)? Behavioral Ecology 14:902–908. doi: 10.1093/beheco/arg080

Hasler AD, Scholz AT, Horrall RM, et al (1978) homing Olfactory Imprinting and Homing in Salmon Recent experiments in which salmon have been. American Scientist 66:347–355.

Hasler AD, Wisby WJ (1951) Discrimination of Stream Odors by Fishes and Its Relation to Parent Stream Behavior. The American Naturalist 85:223. doi: 10.1086/281672

Hastie LC, Wallace C, Birkett M a., et al (2013) Prevalence and infection intensity of sea lice (Lepeophtheirus salmonis) on Atlantic salmon (Salmo salar) host is reduced by the non-host compound 2-aminoacetophenone. Aquaculture 410-411:179–183. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.06.035

Hatten F, Fredriksen A, Hordvik I, Endresen C (2001) Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, Salmo salar. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. Fish & shellfish immunology 11:257–268. doi: 10.1006/fsim.2000.0313

Hawkins AD, Johnstone ADF (1978) The hearing of the Atlantic Salmon, Salmo salar. Journal of Fish Biology 13:655–673. doi: 10.1111/j.1095-8649.1978.tb03480.x

Hawkins LA, Magurran AE, Armstrong JD (2007) Innate abilities to distinguish between predator species and cue concentration in Atlantic salmon. Animal Behaviour 73:1051–1057. doi: 10.1016/j.anbehav.2006.08.011

Heuch P a, Karlsen HE (1997) Detection of infrasonic water oscillations by copepodids of Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligida). Journal of Plankton Research 19:735–747. doi: 10.1093/plankt/19.6.735

Hino H, Miles NG, Bandoh H, Ueda H (2009) Molecular biological research on olfactory chemoreception in fishes. Journal of fish biology 75:945–59. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02341.x

Houston a. H, Dobric N, Kahurananga R (1996) The nature of hematological response in fish. Fish Physiology and Biochemistry 15:339–347. doi: 10.1007/BF02112361

Huntingford FA, Kadri S (2014) Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties 33:233–244.

IFREMER (2006) Saumon d'Atlantique. In: La découverte des poissons et de leur élevage.

Igboeli OO, Burka JF, Fast MD (2014) Lepeophtheirus salmonis: a persisting challenge for

salmon aquaculture. Animal Frontiers 4:22–32. doi: 10.2527/af.2014-0004

Ingvarsdóttir A, Birkett M a, Duce I, et al (2002) Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. Pest management science 58:537–45. doi: 10.1002/ps.510

Ishak WW, Kahloon M, Fakhry H (2011) Oxytocin role in enhancing well-being: A literature review. Journal of Affective Disorders 130:1–9. doi: 10.1016/j.jad.2010.06.001

Iversen A, Hermansen Ø, Andreasen O, et al (2015) Kostnadsdrivere i lakseoppdrett.

Iwama G, Afonso LOB, Vijayan M (2005) Stress in Fishes. In: Evans D, Claiborne J (eds) The physiology of fishes, Boca raton. pp 320–42

Javaid MY, Anderson JM (1967) Thermal Acclimation and Temperature Selection in Atlantic Salmon , Salmo salar , and Rainbow Trout , S. gairdneri. Journal Fsheries Research Board of Canada 24:1507–1513.

Jenkins JA, Bart HL, Bowker JD, et al (2014) Guidelines for the Use of Fishes in Research. American Fisheries Society, Maryland

Johnson SC, Albright LJ (1991) Development, Growth, and Survival of Lepeophtheirus Salmonis (Copepoda: Caligidae) Under Laboratory Conditions. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 71:425. doi: 10.1017/S0025315400051687

Johnson SC, Treasurer JW, Bravo S, Nagasawa K (2004) A Review of the Impact of Parasitic Copepods on Marine Aquaculture. Zoological Studies 43:229–243.

Johnsson JI, Höjesjö J, Fleming I a. (2001) Behavioural and heart rate responses to predation risk in wild and domesticated Atlantic salmon. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58:788–794. doi: 10.1139/cjfas-58-4-788

Johnstone KA, Lubieniecki KP, Koop BF, Davidson WS (2011) Expression of olfactory receptors in different life stages and life histories of wild Atlantic salmon (Salmo salar). Molecular ecology 20:4059–69. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05251.x

Kadri S, Huntingford FA, Metcalfe NB, Thorpe JE (1996) Social interactions and the distribution of food among one-sea-winter Atlantic salmon (S & W salar) in a sea-cage.

Keenleyside MHA (1979) Anti-Predator Behaviour. In: Keenleyside MHA (ed) Divesity and Adaptation in Fish Behavior, Springer B. Berlin, pp 44–62

Khorramshahi O, Schartau JM, Kröger RHH (2008) A complex system of ligaments and a muscle keep the crystalline lens in place in the eyes of bony fishes (teleosts). Vision Research 48:1503–1508. doi: 10.1016/j.visres.2008.03.017

Kleszczynska A, Vargas-Chacoff L, Gozdowska M, et al (2006) Arginine vasotocin, isotocin and melatonin responses following acclimation of gilthead sea bream (Sparus aurata) to different environmental salinities. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology 145:268–273. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.06.037

Kolstad K, Heuch PA, Gjerde B, et al (2005) Genetic variation in resistance of Atlantic salmon (Salmo salar) to the salmon louse Lepeophtheirus salmonis. Aquaculture 247:145–151. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.02.009

Kortan J, Blahova J, Kruzikova K, Adamek Z (2011) Stress responses of carp pond fish stock upon hunting activities of the great cormorant(Phalacrocorax carbo sinensis L.). Aquaculture Research 42:322–330. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02624.x

Kudyakova TI, Sarycheva NY, Kamenskii AA (2007) Orientation and exploratory behavior and anxiety of CBA mice with anosmia induced by N-trimethylindole (skatole). Bulletin of Experimental Biology and Medicine 143:1–4. doi: 10.1007/s10517-007-0001-6

Kulczykowska E (1999) Diel changes in plasma arginine vasotocin, isotocin, and melatonin in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiology & Biochemistry 21:141–146. doi: 10.1023/a:1007808924841

Kulczykowska E (1997) Response of circulating arginine vasotocin and isotocin to rapid osmotic challenge in rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology 118:773–778. doi: 10.1016/S0300-9629(97)00033-9

Kulczykowska E (2001) Responses of circulating arginine vasotocin, isotocin, and melatonin to osmotic and disturbance stress in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiology & Biochemistry 24:201–206. doi: 10.1023/A

Kulczykowska E, Stolarski J (1996) Diurnal changes in plasma arginine vasotocin and isotocin in rainbow trout adapted to fresh water and brackish baltic water. General and Comparative Endocrinology 104:197–202. doi: 10.1023/A

Kupsala S, Jokinen P, Vinnari M (2013) Who Cares about Farmed Fish? Citizen Perceptions of the Welfare and the Mental Abilities of Fish. Journal of Agricultural and Environmental Ethics 26:119–135. doi: 10.1007/s10806-011-9369-4

Le Gall O (2001) Les représentations de poissons dans l'art mobilier magdalenien: Une expression de l'importance culturelle de la pêche. Préhistoire du Sud-Ouest 8:55–69.

Leggett WC (1977) The Ecology of Fish Migrations. Annual Review of Ecology and Systematics 8:285–308. doi: 10.1146/annurev.es.08.110177.001441

Lien AM, Volent Z, Jensen Ø, et al (2014) Shielding skirt for prevention of salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) infestation on Atlantic salmon (Salmo salar L.) in cages - A scaled model experimental study on net and skirt deformation, total mooring load, and currents. Aquacultural Engineering 58:1–10. doi: 10.1016/j.aquaeng.2013.11.003

Liley NR, Olsen KH, Foote CJ, Van der Kraak GJ (1993) Endocrine changes associated with spawning behavior in male kokanee salmon (Oncorhynchus nerka) and the effects of anosmia. Horm Behav 27:470–487.

Liu Y, Bjelland HV (2014) Estimating costs of sea lice control strategy in Norway. Preventive Veterinary Medicine 117:469–477. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.08.018

Lopez U, Gautrais J, Couzin ID, Theraulaz G (2012) From behavioural analyses to models of collective motion in fish schools. Interface Focus 2:693–707. doi: 10.1098/rsfs.2012.0033

MacCrimmon HR, Gots BL (1979) World Distribution of Atlantic Salmon, Salmo salar. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 36:422–457.

Mackie AM (1982) Identification of the gustatory feeding stimulants. In: Hara TJ (ed) Chemoreception in Fishes, Elsevier. Amsterdam, pp 275–291

Mackinnon BM (1998) Host factors important in sea lice infections. Journal of Marine Science 55:188–192.

Madec I, Gabarrou JF, Pageat P (2008) Influence of a maternal odorant on copying strategies in chicks facing isolation and novelty during a standardized test. Neuroendocrinology Letters 29:507–511.

Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR, Ramos-Enriquez R (2009) Cortisol and Glucose : Reliable indicators of fish stress ? American Journal of Aquatic Sciences 4:158–178.

Martins CIM, Galhardo L, Noble C, et al (2012) Behavioural indicators of welfare in farmed fish. Fish Physiology and Biochemistry 38:17–41. doi: 10.1007/s10695-011-9518-8

McCormick S., Shrimpton J., Carey J., et al (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 168:221–235. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00351-2

Mearns KJ, Ellingsen OF, Døving KB, Helmer S (1987) Feeding behaviour in adult rainbow trout and Atlantic salmon parr, elicited by chemical fractions and mixtures of compounds identified in shrimp extract. Aquaculture 64:47–63. doi: 10.1016/0044-8486(87)90205-5

Merkin G V., Roth B, Gjerstad C, et al (2010) Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture 309:231–235. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.08.025

Mintline EM, Stewart M, Rogers AR, et al (2013) Play behavior as an indicator of animal welfare: Disbudding in dairy calves. Applied Animal Behaviour Science 144:22–30. doi: 10.1016/j.applanim.2012.12.008

Mirza RS, Chivers DP (2001) Are chemical cues conserved within salmonid fishes? Journal of Chemical Ecology 27:1641–1651.

Molloy SD, Pietrak MR, Bouchard DA, Bricknell I (2011) Ingestion of Lepeophtheirus salmonis by the blue mussel Mytilus edulis. Aquaculture 311:61–64. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.038

Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts : dynamics , mechanisms of action , and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9:211–268.

Moore A, Waring CP (1996) Electrophysiological and endocrinological evidence that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male Atlantic salmon (Salmo salar) parr. The Journal of experimental biology 199:2307–2316.

Mordue Luntz a J, Birkett M a (2009) A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, Lepeophtheirus salmonis (Caligidae: Copepoda). Journal of fish diseases 32:3–13. doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.01004.x

Mormède P, Andanson S, Aupérin B, et al (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & behavior 92:317–39. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.12.003

Noga E (2010) Fish Diseases: Diagnosis and treatment, Wiley-Blac. Iowa, USA

Nomura M, Sloman KA, von Keyserlingk MAG, Farrell AP (2009) Physiology and behaviour of Atlantic salmon (Salmo salar) smolts during commercial land and sea transport. Physiology & behavior 96:233–43. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.10.006

Nordgreen J, Bjorge MH, Janczak AM, et al (2013) The effect of morphine on changes in behaviour and physiology in intraperitoneally vaccinated Atlantic salmon (Salmo salar). Applied Animal Behaviour Science 145:129–137. doi: 10.1016/j.applanim.2013.03.002

Norwegian Institute of Public Health (2014) Increased use of medicines in Norwegian fish farming.

Nostbakken OJ, Hove HT, Duinker A, et al (2015) Contaminant levels in Norwegian farmed Atlantic salmon (Salmo salar) in the 13-year period from 1999 to 2011. Environment International 74:274–280. doi: 10.1016/j.envint.2014.10.008

OIE (2016) Fiches d ' information générale sur les maladies : Anémie infectieuse du saumon.

Olsén KH, Bjerselius R, Mayer I, Kindahl H (2001) Both ovarian fluid and female urine increase sex steroid hormone levels in mature atlantic salmon (Salmo salar) male parr. Journal of Chemical Ecology 27:2337–2349. doi: 10.1023/A:1012243323670

Olsén KH, Johansson AK, Bjerselius R, et al (2002) Mature Atlantic salmon (Salmo salar L.) male parr are attracted to ovulated female urine but not to ovarian fluid. Journal of Chemical Ecology 28:29–40. doi: 10.1023/A:1013506701218

Osure GO, Phelps RP (2006) Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (Oreochromis niloticus, L) with different histories of domestication. Aquaculture 253:485–494. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.09.019

Øverli Ø, Korzan WJ, Höglund E, et al (2004) Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. Hormones and behavior 45:235–41. doi: 10.1016/j.yhbeh.2003.12.002

Øverli Ø, Pottinger TG, Carrick TR, et al (2002) Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. The Journal of experimental biology 205:391–5.

Pageat P (1998) Properties of cats' facial pheromones.

Pageat P, Alnot-Perronin M, Bougrat L, et al (2010) Chemical communication in birds: Recent findings. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research 5:36. doi: 10.1016/j.jveb.2009.10.017

Pageat P, Delfosse C (2014) Effects of a salmon semiochemical on the infestation by Lepeophtheirus salmonis copepodids in salmon smolts : Preliminary results. In: Proceedings of the 10th International Sea Lice Conference. Portland, p 26

Pert CC, Mordue (Luntz) a. J, Fryer RJ, et al (2009) The settlement and survival of the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837), on atypical hosts. Aquaculture 288:321–324. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.12.005

Petersson E, Jarvi T (2000) Both contest and scramble competition affect the growth performance of brown trout, Salmo trutta, parr of wild and of sea-ranched origins. Environmental Biology of Fishes 59:211–218. doi: 10.1023/A:1007645411586

Pickering A, Pottinger T (1987) Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. Journal of Fish Biology 30:363–374. doi: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05761.x

Pickering AD, Pottinger TG (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish physiology and biochemistry 7:253–8. doi: 10.1007/BF00004714

Pike AW, Wadsworth SL (1999) Sealice on salmonids: their biology and control. Advances in parasitology 44:233–337.

Pino-Marambio J, Mordue (Luntz) a. J, Birkett M, et al (2007) Behavioural studies of host, non-host and mate location by the Sea Louse, Caligus rogercresseyi Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). Aquaculture 271:70–76. doi:

10.1016/j.aquaculture.2007.05.025

Pitcher TJ (1986) Functions of Shoaling Behaviour in Teleosts. In: Pitcher TJ (ed) The Behaviour of Teleost Fishes, Springer U. Bangor, pp 294–337

Platt C, Popper AN (1981) Fine structure and function of the ear. In: Tavolga WN, Popper AN, Fay RR (eds) Hearing and Sound Communication in Fishes, Springer-V. New-York, pp 3–38

Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G (2005) Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. Aquaculture International 13:29–49. doi: 10.1007/s10499-004-9035-1

Pusey A, Wolf M (1996) Inbreeding avoidance in animals. Trends in Ecology and Evolution 11:201–206. doi: 10.1016/0169-5347(96)10028-8

Quinn T, Busack C (1985) Chemosensory recognition of siblings in juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Animal Behaviour 33:51–56.

Quinn T, Hara T (1986) Sibling recognition and olfactory sensitivity in juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Canadian Journal of Zoology 64:921–926.

Ranson K, Beveridge MCM (1983) Raiders from the skies. Bird predation at a freshwater cage farm. Fish Farmer 6:22–3.

Raynard RS, Bricknell IR, Billingsley PF, et al (2002) Development of vaccines against sea lice. Pest management science 58:569–75. doi: 10.1002/ps.474

Redding JM, Patiño R, Schreck CB (1984) Clearance of corticosteroids in yearling coho salmon, Oncorhynchus kisutch, in fresh water and seawater and after stress. General and Comparative Endocrinology 54:433–443. doi: 10.1016/0016-6480(84)90159-X

Reid SG, Bernier NJ, Perry SF (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 120:1–27. doi: 10.1016/S0742-8413(98)00037-1

Ruane NMNM (2002) Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp Cyprinus carpio (L.). Aquaculture Research 33:777–784.

Samuelsen OB, Lunestad BT, Farestveit E, et al (2014) Mortality and deformities in European lobster (Homarus gammarus) juveniles exposed to the anti-parasitic drug teflubenzuron. Aquatic Toxicology 149:8–15. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.01.019

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA (2001) Feeding Anticipatory Activity. In: Houlihan D, Boujard T, Jobling M (eds) Food Intake in Fish, Blackwell . Oxford, pp 216–232

Schellart NAM, Buwalda RJA (1990) Directional variant and invariant hearing thresholds in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Journal of Experimental Biology 149:113–131.

Schoener TW (1971) Theory of Feeding Strategies. Annual Review of Ecology and Systematics 2:369–404.

Scholz AT, Horrall RM, Cooper JC, Hasler AD (1976) Imprinting to chemical cues: the basis for home stream selection in salmon. Science 192:1247–1249. doi: 10.1126/science.1273590

Seiler SM, Keeley ER (2007) A comparison of aggressive and foraging behaviour between juvenile cutthroat trout, rainbow trout and F1 hybrids. Animal Behaviour 74:1805–1812.

doi: 10.1016/j.anbehav.2007.03.025

Selye H (1946) The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. The Journal of Allergy 289–323.

Shao ZJ (2001) Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. Advanced drug delivery reviews 50:229–43.

Shedko S V., Miroshnichenko IL, Nemkova G a. (2012) Phylogeny of salmonids (Salmoniformes: Salmonidae) and its molecular dating: Analysis of nuclear RAG1 gene. Russian Journal of Genetics 48:575–579. doi: 10.1134/S1022795412050201

Shephard KL (1981) The Influence of Mucus on the Diffusion of Water across Fish Epidermis. Physiological Zoology 54:224–229.

Shephard KL (1994) Functions for fish mucus. Reviews in Fish Biology and Fisheries 4:401–429. doi: 10.1007/BF00042888

Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, et al (2011) Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. Oecologia 166:869–887. doi: 10.1007/s00442-011-1943-y

Sigholt T, Erikson U, Rustad T, et al (1997) Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (Salmo Salar). Journal of Food Science 62:898–905.

Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA (2008) Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish physiology and biochemistry 34:95–101. doi: 10.1007/s10695-007-9150-9

Skiftesvik AB, Bjelland RM, Durif CMF, et al (2013a) Delousing of Atlantic salmon (Salmo salar) by cultured vs. wild ballan wrasse (Labrus bergylta). Aquaculture 402-403:113–118. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.03.032

Skiftesvik AB, Blom G, Agnalt A-L, et al (2013b) Wrasse (Labridae) as cleaner fish in salmonid aquaculture – The Hardangerfjord as a case study. Marine Biology Research 10:289–300. doi: 10.1080/17451000.2013.810760

Stefansson SO, Haugland M, Björnsson BT, et al (2012) Growth, osmoregulation and endocrine changes in wild Atlantic salmon smolts and post-smolts during marine migration. Aquaculture 362-363:127–136. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.07.002

Steinum T, Kvellestad A, R??nneberg LB, et al (2008) First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, Salmo salar L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. Journal of Fish Diseases 31:205–214. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00893.x

Stewart TA, Smith WL, Coates MI (2014) The origins of adipose fins: an analysis of homoplasy and the serial homology of vertebrate appendages. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 281:20133120. doi: http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.3120

Tadiso TM, Krasnov A, Skugor S, et al (2011) Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. BMC genomics 12:141. doi: 10.1186/1471-2164-12-141

Thomson JS, Watts PC, Pottinger TG, Sneddon LU (2012) Plasticity of boldness in rainbow

trout, Oncorhynchus mykiss: do hunger and predation influence risk-taking behaviour? Hormones and behavior 61:750–7. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.03.014

Toa DG, Afonso LOB, Iwama GK (2004) Stress response of juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to chemical cues released from stressed conspecifics. Fish Physiology and Biochemistry 30:103–108. doi: 10.1007/s10695-005-0266-5

Torrissen O, Jones S, Asche F, et al (2013) Salmon lice - impact on wild salmonids and salmon aquaculture. Journal of Fish Diseases 36:171–194. doi: 10.1111/jfd.12061

Treasurer JW (2002) A review of potential pathogens of sea lice and the application of cleaner fish in biological control. Pest management science 58:546–58. doi: 10.1002/ps.509

Trevanius GR (1822) Biologie, oder Philosophie der lebenden Natur für Naturforscher und Aerzte. Göttingen

Tucker CS, Sommerville C, Wootten R (2000) The effect of temperature and salinity on the settlement and survival of copepodids of Lepeophtheirus salmonis (Kroyer, 1837) on Atlantic salmon, Salmo salar L. Journal of Fish Diseases 23:309–320. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00219.x

Tully O, Nolan DT (2002) A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae). Parasitology 124 Suppl:S165–82.

Tunney TD, Steingrímsson SÓ (2012) Foraging mode variation in three stream-dwelling salmonid fishes. Ecology of Freshwater Fish 21:570–580. doi: 10.1111/j.1600-0633.2012.00577.x

Turnbull J, Bell A, Adams C, et al (2005) Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. Aquaculture 243:121–132. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.09.022

Van Weerd JH, Komen J (1998) The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 120:107–112. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10017-X

Vandeputte M, Prunet P (2002) Genetics of adaptation in fish: effects of domestication, stress resistance and adaptation to the environment. Productions Animales 15:365–371.

Vehanen T, Hamari S (2004) Predation threat affects behaviour and habitat use by hatchery brown trout (Salmo trutta L.) juveniles. Hydrobiologia 525:229–237.

Verspoor E, Olesen I, Bentsen HB, et al (2006) Atlantic Salmon - Salmo salar. In: Crosetti D, Lapègue S, Olesen I, Svaasand T (eds) Genetic effects of domestication, culture and breed ing of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. Viterbo, Italy, pp 23–31

Vigneulle M (1986) Bactéries Ichtyopathogènes en Mariculture. In: Deuxième Colloque International de Bactériologie Marine. Brest, pp 467–473

Vijayan MM, Leatherland JF (1990) High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, Salvelinus fontinalis. J Endocrinol 124:311–8.

Vijayan MM, Pereira C, Moon TW (1994) Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 108:321–329. doi: 10.1016/0742-8413(94)00024-5

Vilata J, Oliva D, Sepu M (2010) The predation of farmed salmon by South American sea lions (Otaria flavescens) in southern Chile. Journal of Marine Science 67:475 – 482.

Whelan PK (2010) A Review of the Impacts of the Salmon Louse, Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837) on Wild Salmonids.

Wilson MVH, Li G (1999) Osteology and systematic position of the Eocene Eosalmo driftwoodensis Wilson from western North America. Zoological Journal of the Linnean Society 125:279–311. doi: 10.1111/j.1096-3642.1999.tb00594.x

Yamamoto Y, Hino H, Ueda H (2010) Olfactory imprinting of amino acids in lacustrine sockeye salmon. PLoS ONE 5:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0008633

Yamamoto Y, Ueda H (2009) Behavioral responses by migratory chum salmon to amino acids in natal stream water. Zoological science 26:778–782. doi: 10.2108/zsj.26.778

Yambe H, Kitamura S, Kamio M, et al (2006a) L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:15370–15374. doi: 10.1073/pnas.0604340103

Yambe H, Yamada M, Yamazaki F (2006b) Responses of immature male masu salmon parr to the urine of mature males. Ichthyological Research 53:182–184. doi: 10.1007/s10228-005-0323-1

Yambe H, Yamazaki F (2001) Species-specific releaser effect of urine from ovulated female masu salmon and rainbow trout. Journal of Fish Biology 59:1455–1464. doi: 10.1006/jfbi.2001.1791

Ylönen H, Kortet R, Myntti J, Vainikka A (2007) Predator odor recognition and antipredatory response in fish: does the prey know the predator diel rhythm? Acta Oecologica 31:1–7. doi: 10.1016/j.actao.2005.05.007

Young MK, Micek BK, Rathbun M (2003) Probable Pheromonal Attraction of Sexually Mature Brook Trout to Mature Male Conspecifics. North American Journal of Fisheries Management 23:276–282. doi: 10.1577/1548-8675(2003)023

Notes :

RESUME

Méthodes d'évaluation et de contrôle du stress chez les salmonidés d'élevage : implications sanitaires, zootechniques et environnementales

De l'éclosion à l'abattage, le saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel d'élevage sont soumis à divers événements inducteurs de stress. Le stress influe directement sur la physiologie, le comportement et les performances zootechniques des animaux. Ainsi, l'intérêt grandissant du public pour le bien-être des animaux nous a amené à améliorer les connaissances sur le stress des salmonidés d'élevage pour en proposer des méthodes d'évaluation et de contrôle.
Partant de ce constat, nous avons étudié les conséquences de deux situations inductrices de stress et proposé une méthode d'évaluation du bien-être de la truite arc-en-ciel d'eau douce. Nous avons ensuite étudié l'interaction entre stress et pathologie à travers l'exemple du parasite du saumon *Lepeophtheirus salmonis*. Après avoir mis au point un test d'attractivité du saumon pour ce parasite, nous avons étudié les conséquences du stress aigu puis chronique sur l'attractivité des saumons. Le stress de manipulation augmente l'attractivité des saumons pour le parasite, alors qu'il n'y a pas de différence entre les saumons stressés chroniquement et les témoins. Nous avons ensuite proposé une méthode de contrôle de ce parasite en isolant un sémiochimique issu du mucus de saumon et inhibant l'attachement du parasite.
L'ensemble de nos travaux ouvre des perspectives intéressantes quant à l'amélioration des méthodes d'évaluation et de contrôle du stress en élevage des salmonidés. L'étude des conséquences du stress est importante pour mesurer l'impact, à la fois sur le bien-être de l'animal, mais aussi sur les coûts de production. Le sémiochimique inhibiteur de l'attachement du parasite sur le saumon promet de nombreuses études pour comprendre ses mécanismes d'action et son éventuelle utilisation en élevage.

Mots clés : Salmonidés, Stress, Elevage, Bien-être, Parasitisme, Sémiochimie

ABSTRACT

Methods for stress assessment and management in farmed salmonids: sanitary, zootechnical and environmental implications.

From hatching to slaughter, Atlantic salmon and Rainbow trout are subjected to several stressful events. Stress impairs physiological, behavioral and zootechnical performances of animals. The public interest in animal welfare brings us to study the assessment and control methods of stress in farmed salmonids.
To do that, we studied the consequences of two different stressful events and proposed a method for assessing welfare of freshwater Rainbow trout. We also studied the interaction between stress and pathology with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. After developing an attractiveness test of salmon for the parasite, we investigated the influence of short- and long-term stress on salmon attractiveness for the parasite. Handling stress increased attractiveness of salmon for the parasite, while there was no difference between chronically stressed and control salmon. We proposed then a method to control this parasite by isolating a semiochemical which inhibit the hooking behavior of the parasite on the host.
These results open interesting prospects for improving the assessment and control methods of stress in farmed salmonids. The investigation of stress consequences on animal welfare and on production performances is crucial. The semiochemical inhibiting the hooking behavior of the parasite on the salmon needs more studies to identify its mechanisms of action for use in farms.

Key words: Salmonids, Stress, Farming, Welfare, Parasitism, Semiochemistry