



HAL
open science

Etude du profil lipidique de larves de poisson

Ophélie Fontaine

► **To cite this version:**

| Ophélie Fontaine. Etude du profil lipidique de larves de poisson. Chimie. 2022. hal-04291765

HAL Id: hal-04291765

<https://hal.inrae.fr/hal-04291765>

Submitted on 17 Nov 2023

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

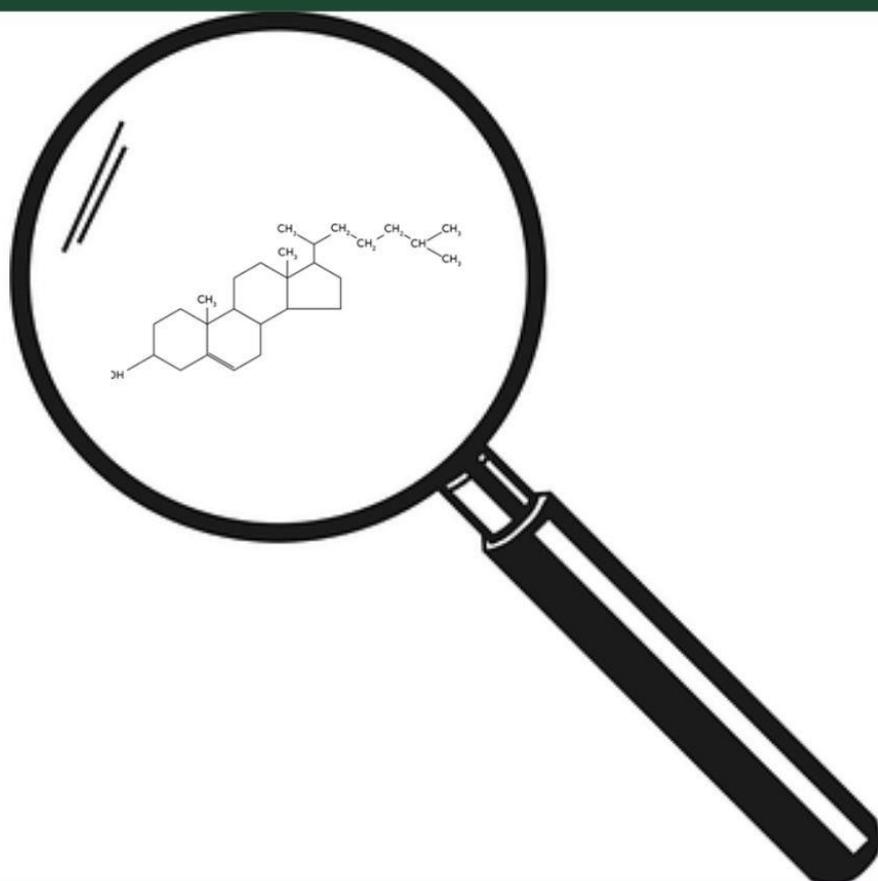
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Public Domain

Etude du profil lipidique de larves de poisson



De Ophélie FONTAINE
Université de Lorraine, M1 parcours ETOX



Superviseurs : Nicolas Mazzella et Aurélie Moreira
Professeur référent : Vincent Normand
Mémoire soutenu le 09/06 devant le jury composé de Elisabeth-Maria Gross,
Vincent Normand et Nicolas Mazzella

INRAE Nouvelle-Aquitaine Bordeaux,
Site de Cestas-Gazinet
ECOVEA et EABX
Du 11/04 au 06/06 2022

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Nicolas MAZZELLA et Aurélie MOREIRA pour m'avoir offert ce stage et m'avoir guidée tout au long de celui-ci.

Je remercie également Elorri AREVALO et son équipe pour leurs remarques avisées sur mes résultats et l'aide qu'ils m'ont apportée pour la compréhension du projet DILEME et de mon sujet.

Merci à Sébastien BOUTRY de m'avoir aidé à traiter mes données.

Je remercie aussi Laura, Alice, Ilan, Olivier, Debora et Arthur pour leur gentillesse et leur aide.

Enfin, mes derniers remerciements vont à toute l'unité EABX pour leur accueil chaleureux au sein de leur unité.

Mots clés : Lipide – TAG – Cholestérol – AGPI – Poisson – HPLC-MS/MS

Résumé

Afin d'évaluer l'état nutritif de larves de poisson, le profil lipidique de larves d'anguille Européenne et de mullet doré ont été dressés en se focalisant sur deux catégories de lipide : les Triacylglycérides (TAG) et les Stérols, représentés par le cholestérol. La teneur en ces lipides, leur ratio et les acides gras des TAG ont été comparés selon les 3 sites de prélèvement des larves de poisson. Les ratio EPA/DHA (EicosaPentaenoic Acid / DocosaHexaénoïc Acid) et Oméga 3/Oméga 6 ont également été observé.

Le ratio TAG/Cholestérol s'est révélé non pertinent, seule la concentration en TAG donne une indication sur l'état nutritif des larves. L'observation de celle-ci n'a pas permis de distinguer un site plus riche en ressource que les autres. Néanmoins, le site Saint-Vivien a tendance à se détacher des deux autres sites avec une plus grande concentration en cholestérol, en acide gras saturés et monoinsaturés ainsi qu'un ratio EPA/DHA plus élevé chez les larves de mullets dorés. Ceci pourrait s'expliquer par un changement de condition du milieu qui n'est pas lié à la ressource en nutriment. Enfin, le ratio oméga 3/oméga 6 étant supérieur à 1, il est possible de supposer que l'estuaire est plus riche en algue verte, source d'oméga 3, qu'en diatomée, source d'oméga 6.

Ainsi, aucun site ne se distingue par sa capacité à être une meilleure nurserie.

Abstract

In order to assess the nutritional status of fish larvae the lipid profile of European Eel and Golden Grey Mullet larvae were made by focusing on two categories of lipids : Triacylglycerides and Sterols, represented by cholesterol. The content of those lipids, their ratio and the molecular species of TAGs were compared according to the 3 sampling sites of the fish larvae. EPA/DHA and Omega 3/Omega 6 ratios were also observed.

The TAG/cholesterol ratio proved to be irrelevant, seeing the concentration of TAG gives an indication of the nutritional status of the larvae. The observation of this one did not make it possible to distinguish a site richer in resource than the others. Nevertheless, the Saint-Vivien site tends to stand out from the other two sites with a higher concentration of cholesterol, a higher concentration of saturated and monounsaturated fatty acids as well as a higher EPA/DHA ratio in the mules. This could be explained by a change in the condition of the environment which is not linked to the nutrient resource. Finally, the Omega 3/Omega 6 ratio is higher than 1, so it is possible to assume that the estuary contain more green algae, a source of omega 3 than diatoms, a source of omega 6.

Thus, no site stands out for its ability to be a better nursery.

Déclaration sur l'honneur contre le plagiat

(à joindre obligatoirement à tout travail de recherche ou dossier remis à un enseignant)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom, Ophélie FONTAINE

Régulièrement inscrit à l'Université de Lorraine

N° de carte d'étudiant : 32010540

Année universitaire : 2022

Niveau d'études : L ou **M**

Parcours : ETOX

N° UE : 815

Certifie qu'il s'agit d'un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie, de surcroît, que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Conformément à la loi, le non-respect de ces dispositions me rend passible de poursuites devant la commission disciplinaire et les tribunaux de la République Française.

Fait à Metz, le 13/04/2022

Signature :



Table des matières

I. Introduction	10
II. Synthèse bibliographique.....	11
1. Les Lipides	11
2. Les poissons	13
3. Analyses conventionnelles des acides gras	14
III. Matériels et méthodes.....	15
1. Echantillonnage	15
2. Extraction des lipides	16
3. Méthodes analytiques	16
4. Tests statistiques.....	17
IV. Résultats et Discussion	19
1. Teneur en TAG selon les sites.....	19
2. Teneur en Cholestérol selon les sites.....	20
3. Ratio TAG/Chol	22
4. Répartition des espèces moléculaires	23
5. Ratio des espèces moléculaires	26
6. Les limites des méthodes.....	29
V. Conclusion.....	30
VI. Annexes	31

Liste des tableaux

<i>Tableau I : Temps et pourcentages des gradients des différentes phases pour l'analyse des Triglycérides.....</i>	<i>17</i>
---	-----------

Liste des figures

<i>Figure 1 Organigramme de l'organisme d'accueil.....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 2 Exemple des structures d'acides gras : sature (acide palmitique), monoinsaturé (acide oleique) et polyinsaturé (acide linoleique (Colette et Monnier, 2011)</i>	<i>11</i>
<i>Figure 3 Structure chimique d'un TAG (Dunlap and B.S., 2021)</i>	<i>11</i>
<i>Figure 4 Structure chimique du stéride.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 5 Structure chimique du cholestérol libre (DUNLAP AND B.S., 2021).....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 6 Schéma des voies de biosynthèse d'acides gras (slideplayer.fr).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 7 Carte de présentation des sites d'échantillonnage</i>	<i>15</i>
<i>Figure 8 Différentes phases après centrifugation</i>	<i>16</i>
<i>Figure 9 Concentrations en TAG (nmol/mg) dans les Mulets avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites</i>	<i>19</i>
<i>Figure 10 Concentrations en TAG (nmol/mg) dans les Anguilles avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites</i>	<i>20</i>

<i>Figure 11 Concentrations en cholestérol (nmol/mg) dans les Mulets avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 12 Concentrations en cholestérol (nmol/mg) dans les Anguilles avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 14 Composition en espèce moléculaire issus des TAG des Anguilles</i>	<i>24</i>
<i>Figure 13 Composition en espèce moléculaire issus des TAG des Mulets.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 15 Evolution de la concentration en PUFA en fonction de la concentration en SFA et MUFA</i>	<i>25</i>
<i>Figure 16 Concentrations en SFA et MUFA (nmol/mg) des mulets avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 17 Valeurs du ratio EPA/DHA des mulets avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites</i>	<i>27</i>
<i>Figure 18 Valeurs du ratio Oméga 3/Oméga 6 des mulets avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites</i>	<i>28</i>
<i>Figure 19 Valeurs du ratio Oméga 3/Oméga 6 des Anguilles avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites</i>	<i>28</i>

Liste des annexes

A. Résultats statistiques annexés

<i>Annexe A1 Valeurs du ratio TAG/Chol des Mulets avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites.....</i>	<i>31</i>
<i>Annexe A2 Valeurs du ratio TAG/Chol des Anguilles avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites.....</i>	<i>31</i>
<i>Annexe A3 Valeurs du ratio EPA/DHA des Anguilles avec les résultats des comparaisons deux à deux selon les sites.....</i>	<i>32</i>
<i>Annexe A4 Valeurs des masses sèches (en mg) des Anguilles (Ang) et des mulets (Mul) selon les sites (1, 2 et 3).....</i>	<i>32</i>
<i>Annexe A4 valeurs des longueurs (en mm) des Anguilles (Ang) et des mulets (Mul) selon les sites (1, 2 et 3).....</i>	<i>33</i>
<i>Annexe A5 Données physicochimiques des sites avec la température (°C) à gauche et la salinité (psu) à droite.....</i>	<i>33</i>

B. Protocole d'extraction des lipides.....33

C. Photos du protocole

<i>Annexe C1 Photo des larves échantillonnées.....</i>	<i>39</i>
<i>Annexe C2 Photo d'un tube d'échantillon avec les billes et un mulet lyophilisé.....</i>	<i>39</i>
<i>Annexe C3 Photo des échantillons au -80 °C.....</i>	<i>39</i>
<i>Annexe C4 Photo du Système d'extraction VisiPrep ayant servi à l'évaporation</i>	<i>39</i>
<i>Annexe C5 Photo de la Colonne C8.....</i>	<i>40</i>
<i>Annexe C6 Photo de l'HPLC-MS/MS.....</i>	<i>40</i>

Liste des abréviations

AG : Acides Gras

AGPI : Acides Gras PolyInsaturés

ARA : acide ARAchidoniques

DHA : DocosaHexaénoïc Acid

EPA : EicosaPentaenoic Acid

HPLC-MS/MS : Hight Performance Liquid Chromatography-mass spectrometry
(Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse)

MeOH : Méthanol

MUFA : MonoUnsaturated Fatty Acid (Acide Gras MonoInsaturé)

MTBE : Méthyl Tert-Butyl Ether

PUFA : Polyunsaturated Fatty Acid (Acide Gras PolyInsaturé)

SFA : Saturated Fatty Acid (Acide Gras Saturé)

TAG : TriAcylGlycérol

Présentation de l'entreprise

Ce stage s'est déroulé à l'**INRAE** (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) en Nouvelle Aquitaine, à Bordeaux, sur le site de Gazinet-Cestas. Cet institut provient de la fusion de l'INRA (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation) et de l'IRSTEA (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture) ayant eu lieu en 2020. Ce stage a été effectué dans l'unité EABX (Ecologie Aquatique et Changement Globaux) qui est constitué de deux équipes : ECOVEA (Ecologie des Communautés VEgetales Aquatiques et impact des pressions multiples) et FREEMA (Fonctionnement et Restauration des Ecosystèmes Estuariens et des populations de Migrateurs Amphihalins). Ce stage a été réalisé en lien avec FREEMA au sein de l'équipe ECOVEA. Il a été co-encadré par Nicolas Mazzella, Ingénieur de Recherche HDR en chimie de l'environnement et lipidomique et Aurélie Moreira, Assistante Ingénieure en analyses chimiques. (cf figure 1)

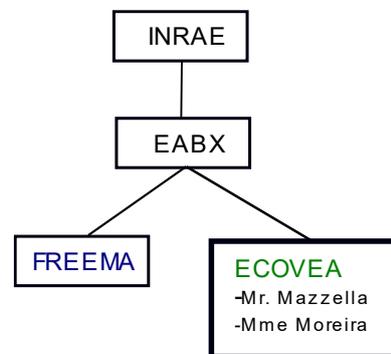


FIGURE 1 ORGANIGRAMME DE L'ORGANISME D'ACCUEIL

Ce stage s'inscrit dans le projet DILEME (Dispersion des Larves En Milieu Estuarien), financé par l'OFB (Office Français de la Biodiversité), commencé le premier juin 2021. Ce projet a pour objectif de comprendre la dispersion des larves de poisson dans les estuaires tempérés, avec une attention particulière portée sur l'estuaire de la Gironde, ainsi que d'évaluer les conditions énergétiques des larves de poissons par analyse quantitative de lipide. Le stage ne se porte ici que sur la deuxième partie traitant de la composition en lipide des poissons.

I. Introduction

Les micro-organismes (microalgues, champignon, bactéries...) et les larves aquatiques, dont celles des poissons, constituent la base de la chaîne trophique (*Neury-Ormanni, 2019*). Celle-ci régit le fonctionnement du reste de la chaîne trophique, il est donc important qu'elle soit en bonne santé. En effet, les larves aquatiques sont une source en nutriment importante qui influence la proportion et la santé des maillons les plus hauts de la chaîne trophique. Or, la survie des larves de poisson dépend de l'accès à leur nourriture, ces dernières ne pouvant supporter de longs jeûnes.

Les poissons sont connus pour être la source primaire d'apport en Acide Gras PolyInsaturé (AGPI) du régime humain (*Gómez-Limia et al., 2020*). Les lipides et les protéines constituent la majorité des composants organiques des poissons (*Galindo et al., 2021*). Ces composants constituent de bons biomarqueurs, c'est-à-dire une caractéristique biologique mesurable communiquant une information sur l'état biologique de l'organisme et permettant de détecter prématurément l'impact de stress environnementaux.

Aussi, la teneur en certains lipides varie directement avec l'alimentation, c'est le cas des triacylglycérides (TAG) (*Lochmann et al., 1995*). En effet, la consommation d'aliments riches en graisse augmente la teneur en TAG dans l'organisme. Ainsi, observer le profil des espèces de poisson pourrait permettre d'évaluer leur état nutritif.

Il est donc justifié de se demander si la ressource trophique offerte par différents habitats de l'estuaire est suffisante pour garantir la bonne condition, et donc la survie, des larves poissons de même espèce mais venant de différents sites d'échantillonnage.

Les lipides extraits de larves de poisson sont analysés. Ceux-ci ont été prélevés en mars, sur différents sites en amont et en aval de l'estuaire de la Gironde. Les profils lipidiques, c'est-à-dire la composition en lipide, de différentes espèces de larve de poisson (Mulet doré et Anguille européenne) sont recherchés en se focalisant sur les cholestérols (Chol), des lipides de structure membranaire des cellules, et les TAG, des lipides de réserve. Ceux-ci sont quantifiés par chromatographie en phase liquide couplé à une spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS). L'indice TAG/Chol permet de conclure sur l'état nutritif des larves, la qualité des habitats et ainsi de déterminer les sites les plus favorables à la survie des larves.

Le présent rapport débute par une présentation des différentes classes de lipides et de l'écologie des deux espèces de poisson choisies. Les méthodes d'analyse seront expliquées et enfin les résultats seront exposés puis discutés.

II. Synthèse bibliographique

1. Les Lipides

Les lipides ont soit un rôle structural, soit un rôle de stockage d'énergie. Ils sont classés en six catégories : les triacylglycérols, les phospholipides, les stérols et stéroïdes, les sphingolipides, les terpénoïdes puis les acides gras (Cuvelier, 2006). Cette étude se focalise sur les **triacylglycérols** (TAG) et les **stérols** qui sont tous deux présents dans la nature. Les lipides peuvent être séparés en deux classes : les lipides polaires, représentés par les phospholipides, et les lipides **neutres**, représentés par les TAG et le cholestérol. (Tocher, 2003)

Les **TAG** sont composés de trois chaînes d'acides gras reliés à un squelette de glycérol (cf. fig.3). En cela ils sont hydrophobes et constituent une **réserve d'énergie** importante chez les **animaux** (Aldred, Buck and Vall, 2009). En effet, les apports énergétiques supérieurs aux besoins métaboliques immédiats sont stockés sous forme de TAG chez les poissons (Pane, 2019). Les TAG sont également présents dans les **végétaux**. Ils peuvent contenir des acides gras saturés (SFA), monoinsaturés (MUFA) et/ou polyinsaturés (PUFA ou AGPI) (cf. fig.2).

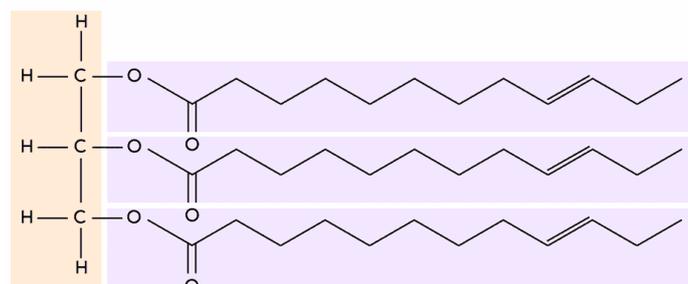


FIGURE 3 STRUCTURE CHIMIQUE D'UN TAG (DUNLAP AND B.S., 2021)

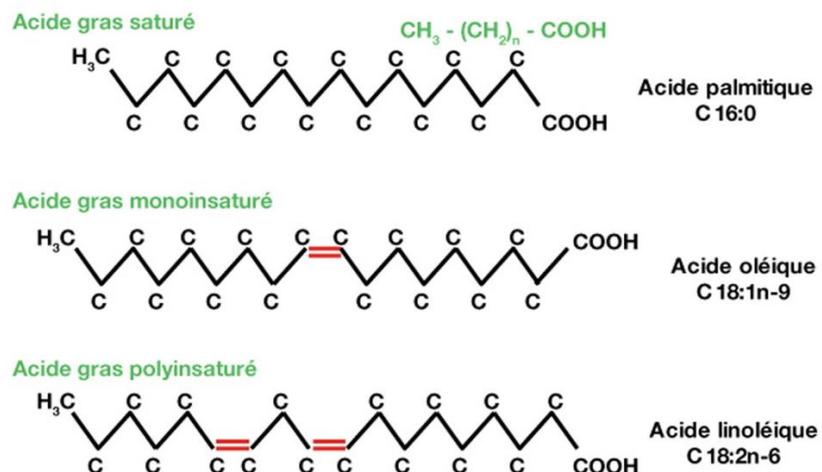


FIGURE 2 EXEMPLE DES STRUCTURES D'ACIDES GRAS : SATURÉ (ACIDE PALMITIQUE), MONOINSATURÉ (ACIDE OLEIQUE) ET POLYINSATURÉ (ACIDE LINOLEIQUE (COLETTE ET MONNIER, 2011))

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des précurseurs de médiateurs lipidiques jouant un rôle dans la régulation des propriétés biophysiques de la membrane, c'est-à-dire qui affecte les fonctions des protéines transmembranaires et des protéines membranaires périphériques (Osman, Suriah and Law, 2001). La plupart des animaux ne peuvent pas produire de novo d'AGPI tel que le 18:2n-6 et le 18:3n-3 (Strandberg et al., 2015) qui ne sont produits que par les algues dans le système aquatique. Ainsi, le phytoplancton est un important fournisseur

d'énergie, tel que les AGPI, et de nutriments pour les consommateurs du niveau trophique supérieur tel que les poissons.

Les acides docosahexaénoïques (**DHA**) et les acides eicosapentaénoïques (**EPA**) sont des types de AGPI essentiels au bon développement des système nerveux et sensoriel des poissons (*Nieves-Soto et al., 2021*).

Les **stérols** sont des molécules polycycliques (cf. fig 4). Le plus important est le **cholestérol**, un constituant membranaire essentiel des **animaux**, essentiel pour la **structure** des membranes cellulaires. Il est également essentiel pour le métabolisme des lipides et c'est un précurseur des hormones stéroïdes, des acides biliaires, de la vitamine D et des stérides (*Li et al., 2019*). Le cholestérol peut être sous forme libre (cf. fig 4) ou sous forme de stéride. Les **stérides** sont des stérols estérifiés par un acide gras (cf. fig 5). Ils ne sont présents que chez les animaux principalement dans les cellules spumeuses et les lipoprotéines circulant dans le sang.

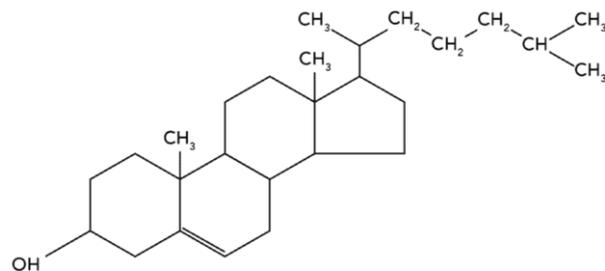


FIGURE 5 STRUCTURE CHIMIQUE DU CHOLESTÉROL LIBRE (DUNLAP AND B.S., 2021)

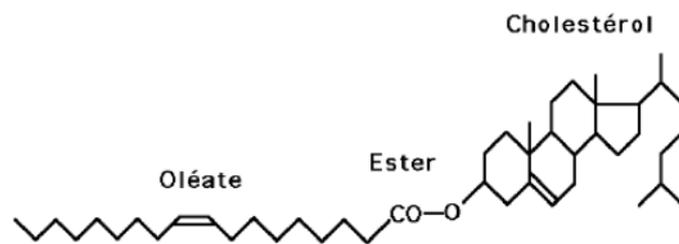


FIGURE 4 STRUCTURE CHIMIQUE DU STÉRIDE

Le cholestérol reste en quantité constante et proportionnelle à la taille du poisson, même en période de jeûne (*Håkanson, 1989*).

Le cholestérol et le triacylglycérol sont tous deux situés dans les composés apolaires et à l'intérieur des cellules des animaux (*Blanco and Blanco, 2017*)

Le **ratio TAG/Chol** permet d'apprécier l'état nutritif d'un individu parmi une espèce de poisson donnée. Plus celui-ci est élevé, plus l'état nutritif est bon, ce qui signifie, en théorie, qu'il se trouvait dans une zone riche en ressource nutritive (*Giraldo et al., 2013*). Lors d'une perturbation ou d'un stress environnemental, un individu en « bon » état a une probabilité plus importante de survie. *Håkanson (1993)* a montré le lien entre la capacité de survie d'un poisson et sa teneur en lipide, qui évolue dans le même sens. Il a aussi déterminé qu'un ratio TAG/Chol en dessous de 0.2–0.3 indique une faible condition nutritionnelle pour des larves d'anchois de Californie, *Engraulis mordax*.

Par ailleurs, plus cet indice est élevé, plus l'individu est tolérant au jeûne (*Pane, 2019*). Aussi, cet indice est très utilisé car il permet de s'affranchir des unités et de faciliter la comparaison entre les différents articles scientifiques.

Tous les lipides sont issus de voie de synthèse. Ci-dessous (cf. fig 6) est représenté la biosynthèse des acides gras tel que les **EPA** et **DHA**. Ces deux composés sont issus de 18:3n-3, l'EPA étant formé avant le DHA.

Les acide arachidoniques, ARA, (20:4), synthétisés à partir des 18:2, sont une autre espèce moléculaire courante chez les anguilles (*Prigge et al., 2012*). D'après *Lund et al. (2020)*, les

ARA, DHA et EPA sont des AG essentiels au bon développement des poissons. Contrairement aux EPA et DHA qui sont des omégas 3, l'ARA est un oméga 6. (cf. fig.6)

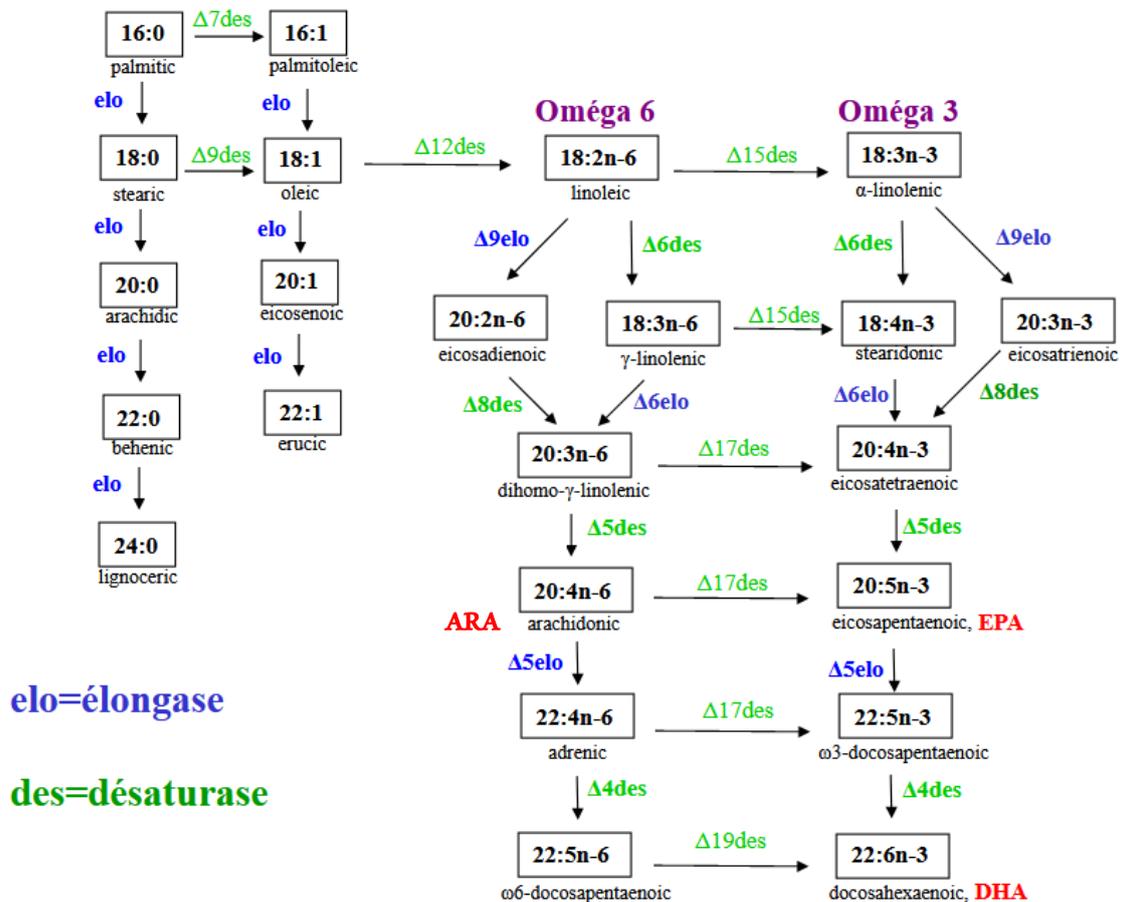


FIGURE 6 SCHEMA DES VOIES DE BIOSYNTHESE D'ACIDES GRAS (SLIDEPLAYER.FR)

Les lipides sont nommés de la manière suivante : nombre de carbone : nombre d'insaturation, puis n la position de la première double liaison. Par exemple, 20:5n-3 est un lipide à 20 carbones ayant 5 insaturations en commençant par le troisième carbone en partant de la fin de la chaîne aliphatique (Cuvelier et al., 2004).

2. Les poissons

Le cycle de vie des poissons se déroule ainsi : œuf, larve, post-larve, juvénile puis adulte. Les poissons observés durant cette étude sont sous forme de larve ou post-larve.

Les larves possèdent un sac vitellin dans lequel elles puisent leur énergie au fur et à mesure de leur développement. Lorsque cette réserve est épuisée, les larves sont alors appelées « post-larves » et se nourrissent sur les proies présentes dans leur environnement. Le passage d'une alimentation endogène à exogène suite à la perte de ce sac vitellin est une étape critique du cycle de développement des poissons. (Pane, 2019)

Le **mulet doré** (*Chelon auratus*) est un poisson marin qui se rapproche des littoraux du printemps jusqu'au début de l'automne, il fréquente les **zones estuariennes** sans pour autant remonter jusqu'aux eaux douces. (Coudre et André, 2021). Les **larves de mulet en captivité** se

nourrissent d'algues unicellulaires, tel que des diatomées benthiques, et de zooplanctons (*Cardona, L., 2016*). Les mullets ont une reproduction marine, les larves dérivent passivement, portées par les courants océaniques, jusqu'aux estuaires dans lesquels elles se développent, puis les mullets repartent en mer au stade adulte.

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) est une espèce diadrome catadrome, c'est-à-dire qui se reproduit en mer (en mer des Sargasses pour le cas particulier de l'anguille Européenne) et effectue sa phase de grossissement en estuaire ou en rivière. L'anguille Européenne est **euryhaline**, c'est-à-dire pouvant vivre dans des milieux de différentes salinités. La larve leptocéphale commence à se nourrir en mer puis, après la métamorphose en civelle, la majorité des individus cessent de s'alimenter pendant leur migration estuarienne (*Corolla et al., 2020*).

Ces deux espèces de poissons sont des espèces migratrices, non résidente de l'estuaire.

D'une manière générale les poissons d'eau douce sont moins riche en AGPI que les poissons marins. Cela est dû au fait que les poissons marins se nourrissent de zooplancton, riche en AGPI, tandis que les poissons d'eau douce consomment principalement de la matière végétale. (*Gómez-Limia et al., 2020*). Durant cette étude, les poissons ont été prélevé sur trois sites de l'estuaire de la Gironde.

3. Analyses conventionnelles des acides gras

Les **acides gras** sont souvent utilisés comme **biomarqueurs taxonomiques** pour les phytoplanctons (*Reuss and Poulsen, 2002*). Pour cela une lyse chimique est faite pour libérer les acides gras qui sont ensuite identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Le profil en acide gras des individus obtenu sert ensuite de marqueurs taxonomiques permettant d'identifier les espèces (*Strandberg et al., 2015*). Les diatomées sont par exemple caractérisées par des proportions très élevées de 16:1 et de très faibles niveaux d'AGPI à 18 carbones tels que le 18 :2, 18 :3 ou 18 :4 (*Taipale et al., 2013*), à la différence des algues vertes.

L'analyse des acides gras seuls permet également d'évaluer **l'état biologique** d'un individu, c'est-à-dire s'il est apte à se reproduire ou à migrer. En effet, les AG sont une source d'énergie essentielle au métabolisme permettant la croissance, la reproduction et la migration des poissons (*Tocher, 2003*).

Dans certaines études (*Christie W.W. et Han X., 2010*) les acides gras subissent une dérivation qui permet par la suite de connaître les positions exactes des insaturations et ainsi de déterminer avec exactitude la structure de l'acide gras détecté.

Les AGPI sont également étudiés dans le but de connaître l'apport nutritionnel des poissons tel que le mullet (*Galindo et al., 2021*).

Ainsi, l'analyse des acides gras est beaucoup utilisée et permet d'apporter nombre de détail sur les lipides, cependant, avec cette méthode, il n'est pas possible de déterminer de quelles catégories de lipides proviennent les acides gras. Ici, une autre approche est considérée, le but n'étant pas l'identification d'espèce ou l'observation de leurs capacités à se reproduire ou migrer, mais l'évaluation de leur état nutritif. Pour cela il est important de déterminer en premier lieu les catégories de lipides tels que les stérols et TAG qui permettent l'utilisation du ratio TAG/Chol.

III. Matériels et méthodes

1. Echantillonnage

Deux espèces de poissons sont échantillonnées *in situ* au filet (maille de 500 μm) : des mulets dorés (*Chelon auratus*) au stade post-larve et des anguilles européennes (*Anguilla anguilla*) au stade larvaire (i.e., civelle).

Les poissons sont échantillonnés sur trois sites différents de l'estuaire de la Gironde. Cinq individus ont été pêchés par site, pour chaque espèce, entre le 14 et le 17 mars 2022. Les pêches ont été faites systématiquement pendant la marée montante.

La figure 4 illustre les lieux d'échantillonnage. Deux sites sont en aval : Verdon-plage de la chambrette et Sain-Vivien, et un site est en amont : Breuil.

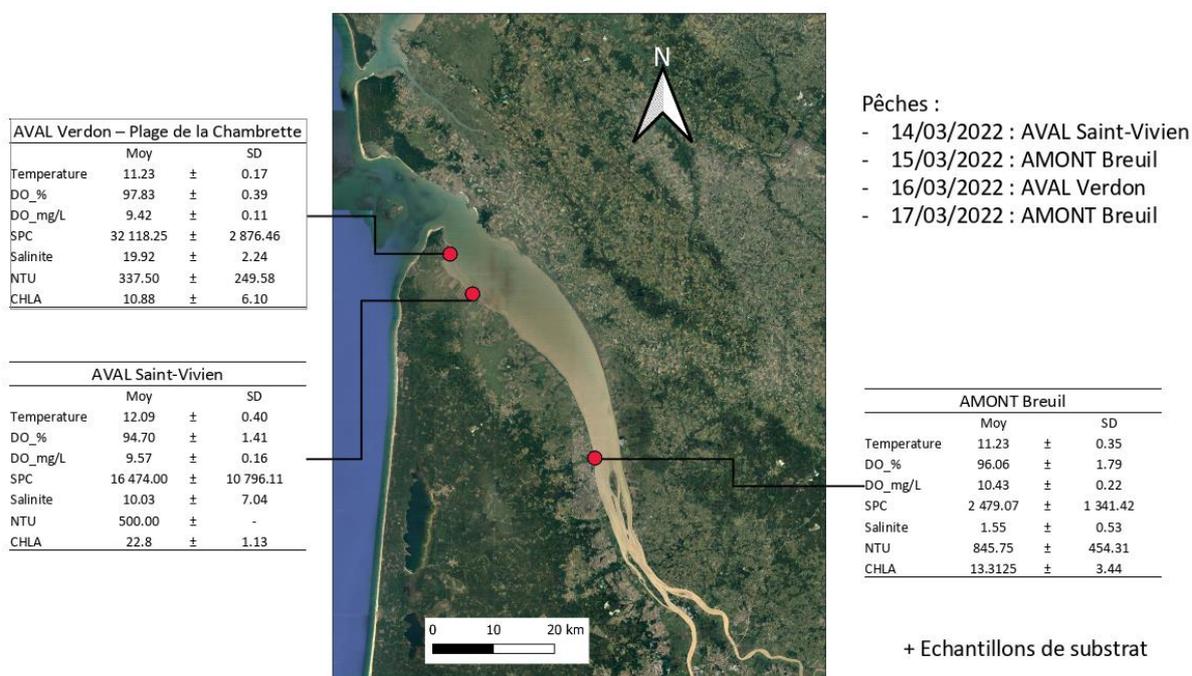


FIGURE 7 CARTE DE PRESENTATION DES SITES D'ECHANTILLONNAGE

Plusieurs paramètres physico-chimiques sont relevés avec une sonde YSI Exo-2 à chaque pêche : la température de l'eau en °C, la salinité en psu et la concentration en chlorophylle a en $\mu\text{g/L}$. (cf Annexe A5)

La concentration en chlorophylle a varie selon les sites. Celle-ci reflète les ressources nutritives disponibles des sites.

Aussi, plus les sites de prélèvement s'enfoncent dans les terres, plus la salinité diminue avec une salinité de 19.92 psu pour le Verdon qui est le plus proche du littoral contre 1.55 psu pour Breuil qui est le site le plus dans les terres. Les sites à l'aval sont en eaux salines tandis que le site en amont est en eau saumâtre.

Les sites en aval, au Verdon et à Saint-Vivien sont situés dans une zone potentielle de rétention, c'est-à-dire une zone dans laquelle les larves sont amenées par les courants dominants.

2. Extraction des lipides

Les larves sont conditionnées à l'azote liquide immédiatement après la pêche, puis transférées dans un congélateur à -80 °C. Par la suite, pour éviter la dégradation des échantillons, ceux-ci sont manipulés sur de la glace tout au long des extractions et des pesées. Aussi tous les produits (réactifs et solvants) sont mis au froid avant d'être mélangés.

Pour l'extraction des lipides, les larves subissent une lyse chimique et mécanique pour ouvrir les cellules et libérer les lipides. La lyse chimique est effectuée par ajout d'un mélange de méthyl *tert*-butyl éther et de méthanol, MTBE:MeOH (3 :1 , v :v), tandis que la lyse mécanique est faite à l'aide de billes de silice et d'une FastPrep-24™5G qui homogénéise et favorise la lyse. Les lipides sont ensuite récupérés par centrifugation, la phase lipophile se trouvant à la surface (cf fig 5). Au préalable, le MTBE ayant permis de dissoudre l'échantillon doit donc être évaporé et remplacé par un solvant adéquat car il ne constitue pas un bon solvant pour l'analyse. Ces étapes de lyse sont reproduites une deuxième fois avec le culot pour optimiser le rendement. Les échantillons sont passés aux ultrasons pendant 5 min avant la deuxième extraction pour homogénéiser en plus de favoriser la lyse des cellules. Les surnageants lipophiles (environ 1,1 mL) sont récupérés et regroupés finalement dans un même vial.

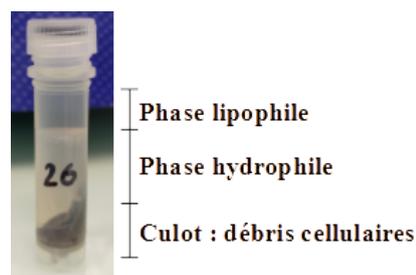


FIGURE 8 DIFFERENTES PHASES APRES CENTRIFUGATION

Pour contrôler la non-contamination des échantillons un contrôle négatif ne contenant que du solvant est préparé.

Ensuite, une gamme d'étalon est effectuée pour déterminer les différentes concentrations. Le cholestérol est présent en petite quantité, 150 µL de chaque échantillon sont donc évaporés puis resuspendu dans 200 µL de phase mobile (PMA/PMB). Les TAG sont quant à eux fortement concentrés, il faut donc diluer au 1/10 chaque échantillon pour encadrer la concentration obtenue avec la gamme étalon et ainsi permettre que celle-ci ne soit ni sous, ni sur exprimée. Pour cela 50 µL de chaque échantillon sont évaporés puis resuspendu dans 500 µL de phase mobile.

Des points de gamme, appelé contrôle qualité (QC), sont faits en doublons pour contrôler la dérive éventuelle lors de l'analyse. Un étalonnage externe est effectué afin de déterminer avec exactitude les concentrations en différent lipide obtenues.

Chaque échantillon et point de gamme est ensuite analysé par HPLC-MS/MS.

3. Méthodes analytiques

Les méthodes couplées HPLC-MS/MS ont été utilisées pour analyser les échantillons. Celles-ci sont la combinaison d'une chromatographie en phase liquide et d'une spectrométrie de masse en tandem. La spectrométrie de masse permet l'identification et la quantification d'ions provenant de molécules à analyser. Les composés à analyser sont mis en solution dans un solvant puis introduit dans un éluant. Ici, le solvant et l'éluant sont tous deux composés de phase mobile A/ phase mobile B, PMA/PMB (50/50, v/v). Cette phase mobile est ensuite poussée par une pompe à haute pression dans la colonne chromatographique entraînant ainsi les composés injectés¹. Le principe de l'HPLC est la migration des composés dans une colonne qui permet la séparation selon leur affinité avec le solvant. La vitesse d'élution dépend de l'affinité du composé avec la phase mobile (PM) et la phase stationnaire (PS). Un lipide ayant plus d'affinité avec la PM que la PS sortira plus vite qu'un lipide ayant plus d'affinité avec la PS que la PM. Une chromatographie de partage en phase inverse est utilisée. Les lipides migrent selon leur polarité, les plus polaires sortant en premier. Les résultats sont présentés sous forme de spectres de masse qui représentent l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z. Cette méthode est couplée à une méthode séparative, l'HPLC, en amont. Ici les résultats obtenus sont sous forme de chromatogrammes qui représentent l'aire des pics chromatographiques en fonction du temps de rétention (*Menet, 2011 ; Li et al., 2019*).

Il y a deux phases mobiles : la phase mobile A (acétonitrile/eau/1M tampon acétate d'ammonium, 600/390/10, v/v/v) et la phase mobile B (isopropanol/acétonitrile/1M tampon acétate d'ammonium, 900/90/10, v/v/v). La proportion en solvant organique des phases mobiles injectées dans la colonne varie : en début d'analyse cette proportion est plus faible pour que les composés migrent doucement, elle augmente ensuite jusqu'à 99 %. Le gradient de d'élution est effectué comme indiqué ci-dessous :

TABLEAU I : TEMPS ET POURCENTAGES DES GRADIENTS DES DIFFERENTES PHASES POUR L'ANALYSE DES TRIGLYCERIDES

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	50	50
0.3	50	50
5.3	1	99
7.3	1	99
8.3	50	50
9.8	50	50

La colonne utilisée a pour référence Kinetex C8 (2.6 µm, 100 × 2,1 mm, Phenomenex)

Le volume d'injection pour les échantillons et la gamme des TAG est de 20 µL tandis que celui des cholestérols est de 50 µL. Le débit de phase mobile est constant à 300 µL.min⁻¹.

4. Tests statistiques

Pour les deux espèces, les lipides ont été extraits sur 5 larves par site. Les variables d'intérêt (*i.e.*, concentration en Chol, TAG ou le ratio TAG/Chol) sont comparées entre les sites avec un test non-paramétrique de Krukal-Wallis à l'aide du logiciel R (version 4.2.0).

¹ <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>.

Le seuil de risque (α) choisi est de 0,05. Pour une p-value inférieure à 0,05 les valeurs sont considérées comme significativement différentes.

Ensuite, un test post-hoc fait une comparaison deux à deux des valeurs des sites pour identifier le site significativement différent.

IV. Résultats et Discussion

Une comparaison interspécifique n'est pas idéale en raison des différences de régimes alimentaires et de stratégies d'histoire de vie des espèces. En effet, l'anguille Européenne ne se nourrit pas lors de sa migration estuarienne et migre sur de longue distance, il est donc attendu que celle-ci ait une moins grande réserve d'énergie (TAG) que les mullets une fois arrivée dans l'estuaire.

Pour cette raison les espèces sont traitées successivement.

1. Teneur en TAG selon les sites

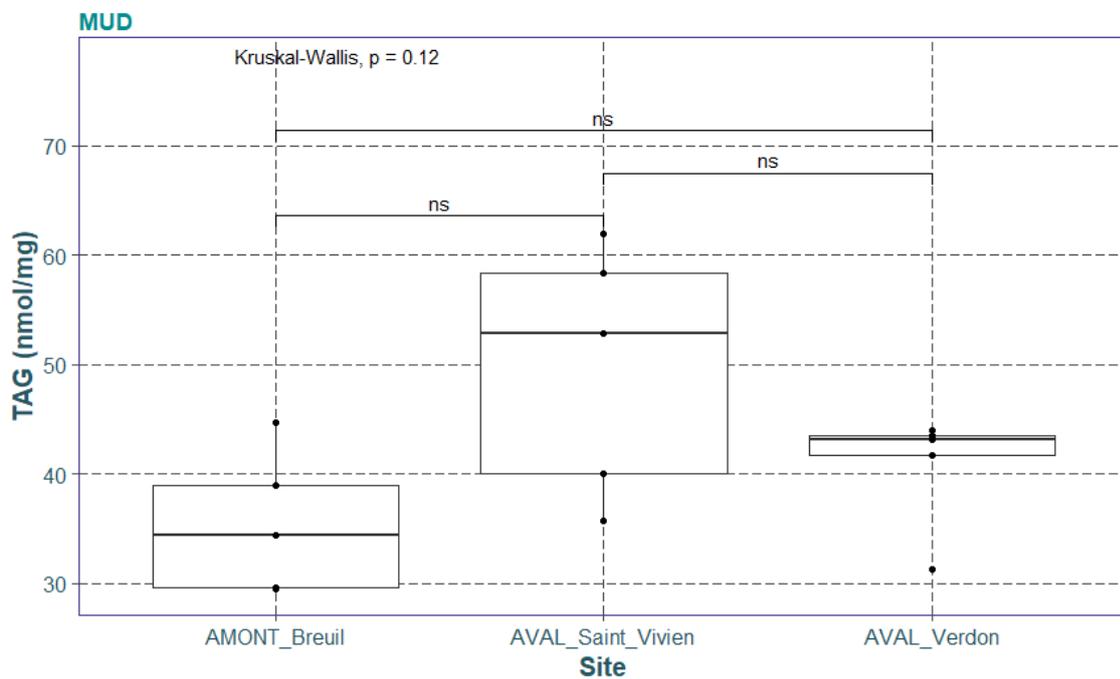


FIGURE 9 CONCENTRATIONS EN TAG (NMOL/MG) DANS LES MULETS AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

Une p-value de 0,12 est obtenue, indiquant que les valeurs en TAG dans les mullets dorés (MUD) ne diffèrent pas significativement selon les sites de pêche.

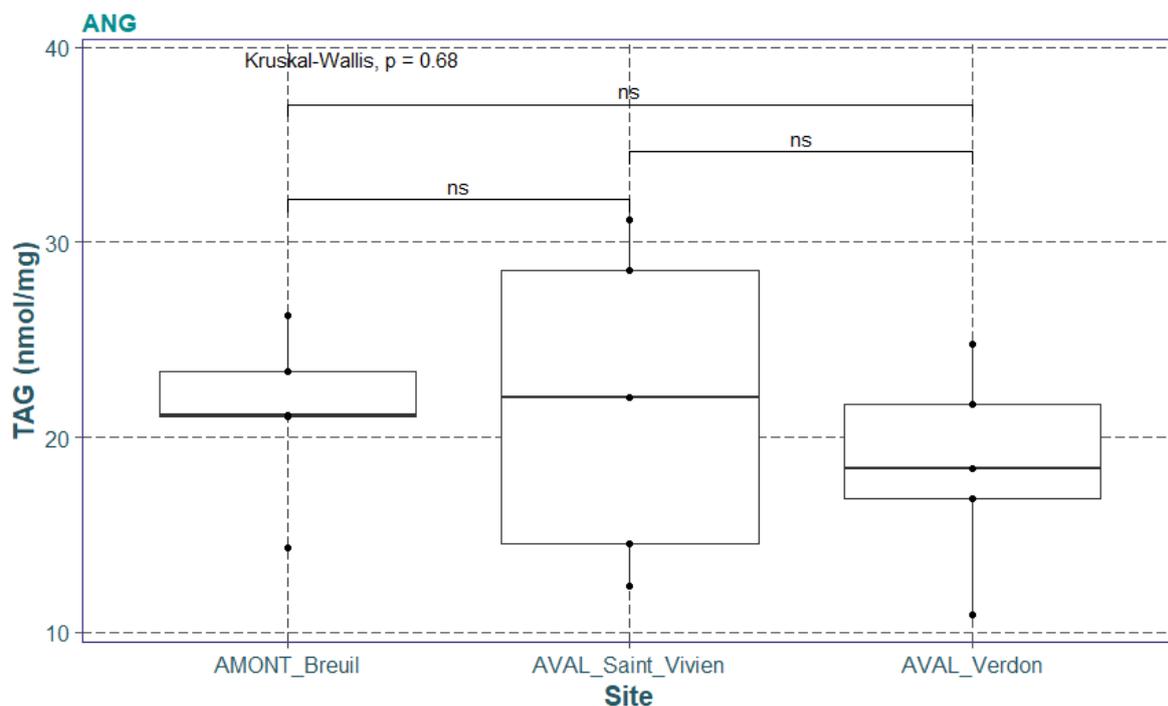


FIGURE 10 CONCENTRATIONS EN TAG (NMOL/MG) DANS LES ANGUILLES AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

Une p-value de 0,68 est obtenue, indiquant que les valeurs en TAG des anguilles (ANG) ne diffèrent pas significativement selon les sites.

Il était attendu que les sites se distinguent les uns des autres et qu'il soit possible de repérer un site plus riche en nutriment qui serait prioritaire dans un contexte de conservation des milieux. Cependant, la teneur en TAG ne fluctue pas en fonction des sites, bien que le site Saint-Vivien se distingue par une plus grande variabilité.

Cette variabilité peut être expliquée par le fait qu'il n'est pas possible de prouver une fidélité des poissons aux sites dans lesquels ils ont été échantillonnés. Ainsi, les larves ont pu se nourrir pendant leur migration océanique et tout au long de l'estuaire.

2. Teneur en Cholestérol selon les sites

Les cholestérols dosés sont ceux sous forme libre et sous forme de stéride. Les stérides sont présents en très petite quantité et n'influencent pas la quantité totale en cholestérol ici puisqu'ils sont en quantité 10 000 fois plus petite que le cholestérol libre.

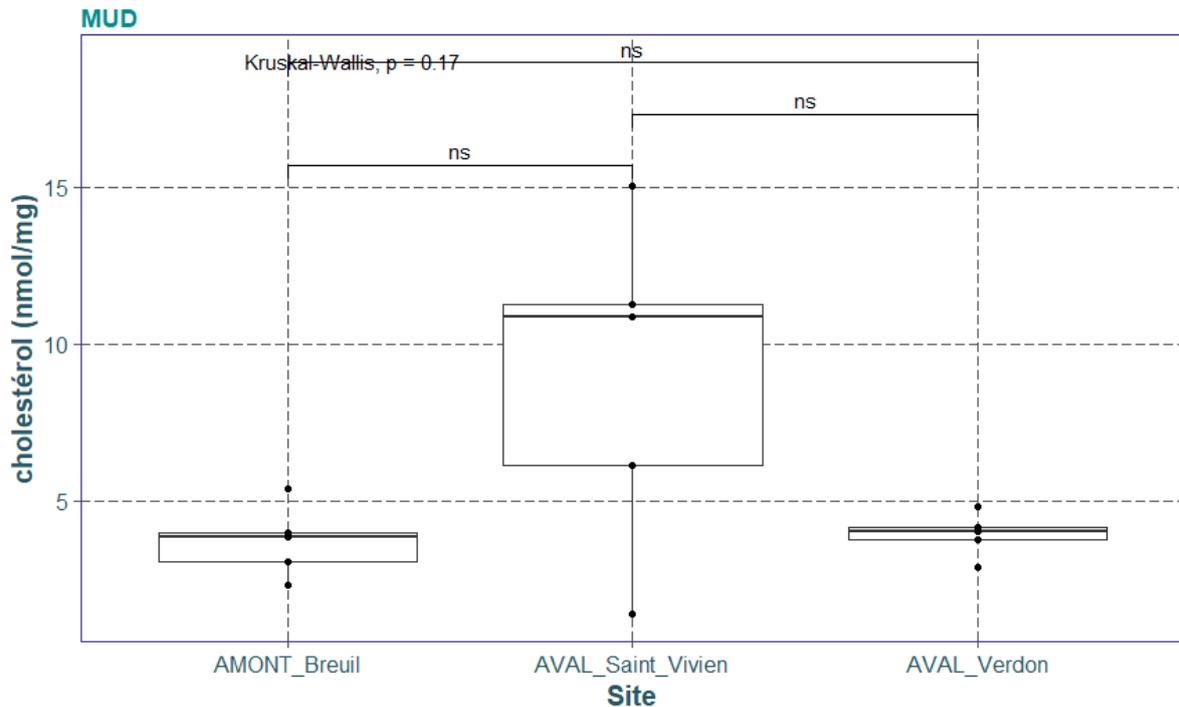


FIGURE 11 CONCENTRATIONS EN CHOLESTEROL (NMOL/MG) DANS LES MULETS AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

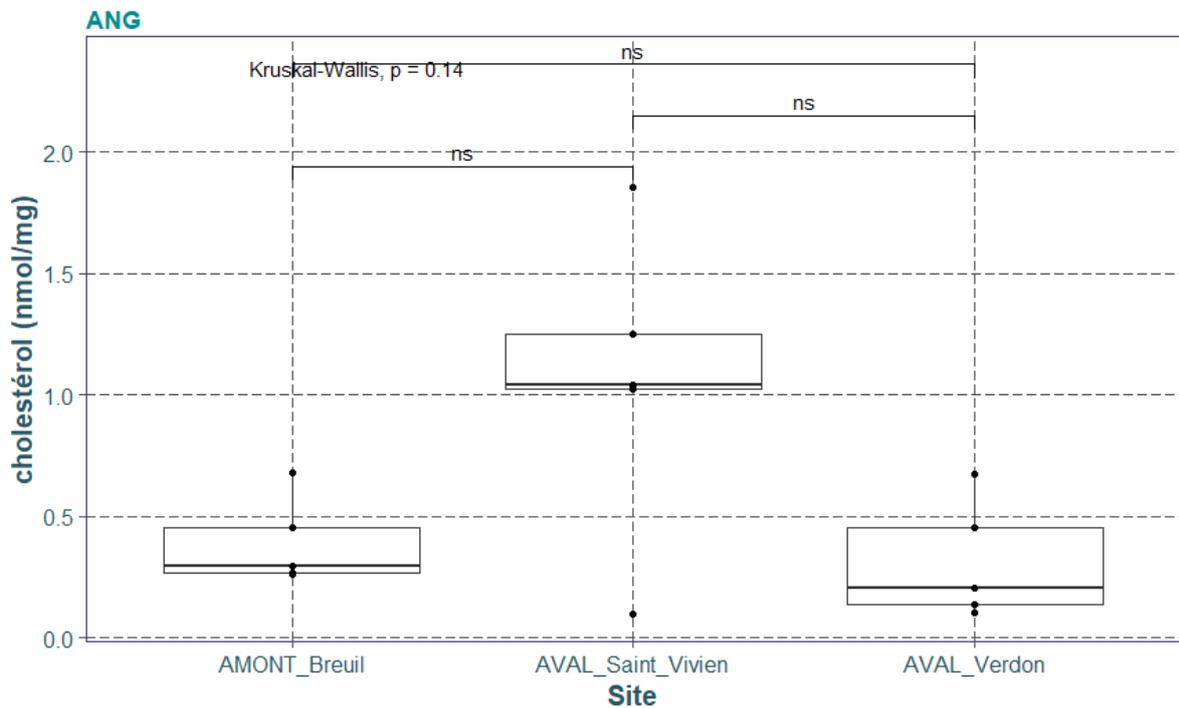


FIGURE 12 CONCENTRATIONS EN CHOLESTEROL (NMOL/MG) DANS LES ANGUILES AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

Des p-values respectives de 0,17 et 0,14 pour les mullets et les anguilles, indiqueraient que les valeurs en cholestérol, comme pour les TAG, ne diffèrent pas significativement selon les sites.

D'après *Håkanson (1989)*, le cholestérol étant un lipide de structure membranaire, il ne fluctue pas en fonction de l'apport nutritif et reste en quantité constante et proportionnelle à la taille du

poisson. Ainsi, le cholestérol seul n'est pas utile à la détermination de la condition nutritive des larves mais sert à effectuer le ratio TAG/ Chol.

Néanmoins, une tendance peut être observée chez les deux espèces puisque le site Saint-Vivien semble se détacher des autres sites, bien que les valeurs ne soient pas significativement différentes.

D'après *Lund et al. (2021)*, le cholestérol joue un rôle important dans la variation de la fluidité des bicouches lipidiques qui semble permettre une grande adaptabilité aux changements de salinité. La réorganisation des lipides et l'augmentation de la teneur en cholestérol permettraient ainsi de modifier la fluidité des membranes, ce qui augmenterait la tolérance chez certains poissons, tel que les anguilles, aux fluctuations de salinité et de température.

Saint-Vivien étant un site à l'aval de l'estuaire, il est soumis à une plus forte salinité que le site de Breuil en amont, ceci pourrait expliquer la différence entre ces deux sites. Cependant, le site du Verdon, également en aval et ayant la plus forte salinité, a une concentration en cholestérol plus proche de celle de Breuil (amont) que celle de Saint-Vivien (aval) (cf Annexe A5). C'est pourquoi la salinité ne semble pas pouvoir expliquer dans notre cas cette tendance. D'autre part, la température semble être corrélée avec la tendance observée. En effet, le site Saint-Vivien est le site ayant la température de l'eau la plus chaude avec 1°C supérieur aux deux autres sites (cf Annexe A5). *Hassett et Crockett (2009)* ont montré que la teneur en cholestérol augmente dans des copépodes lorsque la température du milieu aquatique augmente elle aussi. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que la température a un impact sur la teneur en cholestérol.

Il faudrait ainsi plus d'informations sur les différents sites pour déterminer la cause de cette différence. En effet, il a été montré que l'estuaire est pollué par du zinc, du cadmium, du mercure et d'autres métaux (*Baudrimont M et al., 2005*). Néanmoins, il faudrait plus d'information plus précise sur les sites afin de constater ou non une différence de concentration de polluant entre les sites.

3. Ratio TAG/Chol

Pour les deux espèces de poisson le ratio TAG/ Chol n'est pas significativement différent selon les sites avec des p-value de 0,17 pour le mulot et 0,16 pour les anguilles. (cf Annexes A1 et A2)

D'après *Mourente, G., (1993)*, dans un mulot doré juvénile il y a 1,5 fois plus de cholestérol que de TAG. Ce n'est pas ce qui est retrouvé ici puisque le TAG est largement plus présent que le cholestérol. En effet, les ratios moyens sont de 10 pour les mulots et 50 pour les anguilles. Cette différence peut être expliquée par les différences de stades des individus observés, les juvéniles ne pouvant pas être comparés à des larves.

Aussi, une différence peut être cachée si les concentrations en TAG et en Cholestérol fluctuent ensemble et se compensent. Or il a été observé que le cholestérol peut fluctuer, bien que cela ne soit pas causé par l'apport en nutriment.

De plus, il est difficile de déterminer si le ratio obtenu ici est comparable en termes de méthode puisqu'il n'est pas indiqué dans les anciens articles si la concentration en cholestérol correspond aux cholestérols totaux ou à une partie du cholestérol, comme le cholestérol libre.

Hakanson (1993) affirme que la teneur en TAG seule donne une indication sur la capacité des larves à survivre à un jeûne, contrairement au ratio TAG/Chol.

Aussi, les incertitudes du dosage des 2 classes de composés sont combiné ce qui semble jouer en défaveur de l'utilisation du ratio TAG/Chol. Il est donc possible de se demander si la normalisation des TAG par le cholestérol est réellement utile sachant que les TAG peuvent être exprimés en fonction du poids sec de l'individu. La masse sèche des individus ainsi que leur longueur sont très homogène pour chaque espèce et reste précis (cf annexe A4 et A5)

Pour conclure, le ratio TAG/Chol ne semble pas pertinent. *D. Costalago et al. (2014)* proposent l'indice ARN/ADN pour évaluer l'impact des changements environnementaux sur les conditions nutritionnelles, ce ratio serait donc complémentaire des données déjà présentes.

4. Répartition des espèces moléculaires

Les différentes espèces moléculaires les plus importantes des TAG ont été quantifiées indépendamment, pour chaque espèce. Celles-ci sont constituées de l'acide DocosaHexaénoïque DHA (22:6), de l' Acide EicosaPentaénoïque (EPA) (20:5), de l'Acide linoléiques (18:2), précurseur de l'ARA (20 :4), puis dans une moindre mesure les acides α - et γ -linoléiques (18:3).

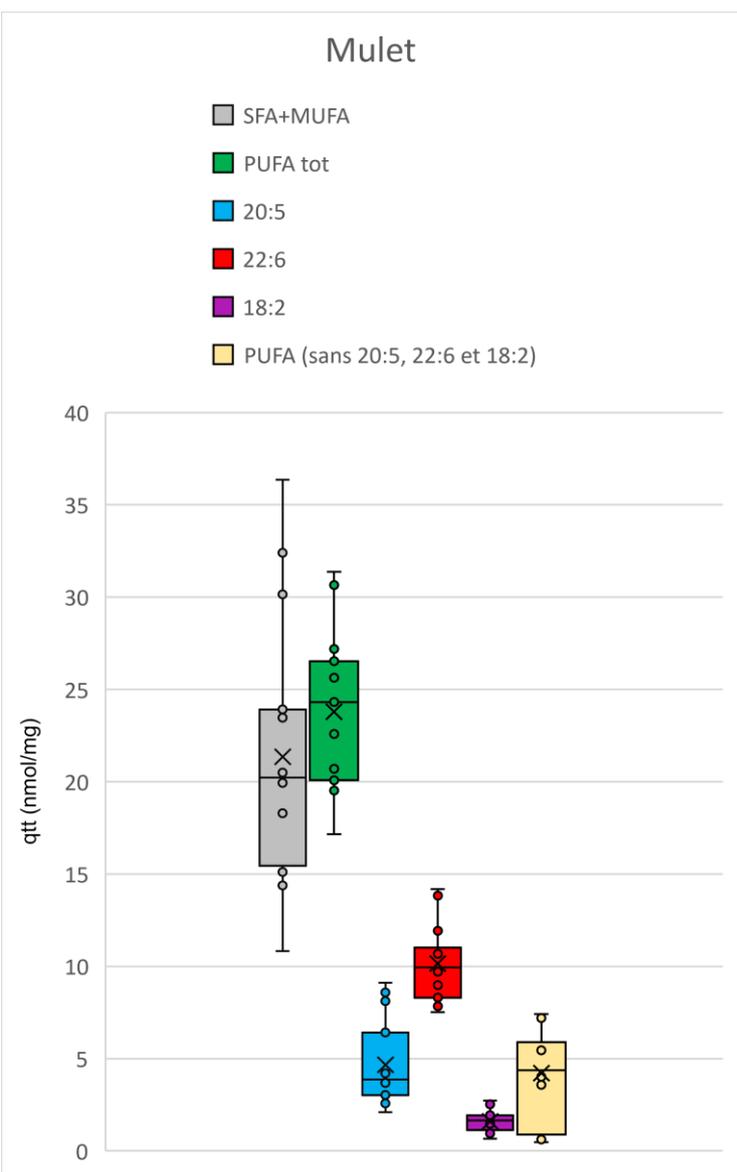


FIGURE 14 COMPOSITION EN ESPECE MOLECULAIRE ISSUS DES TAG DES MULETS

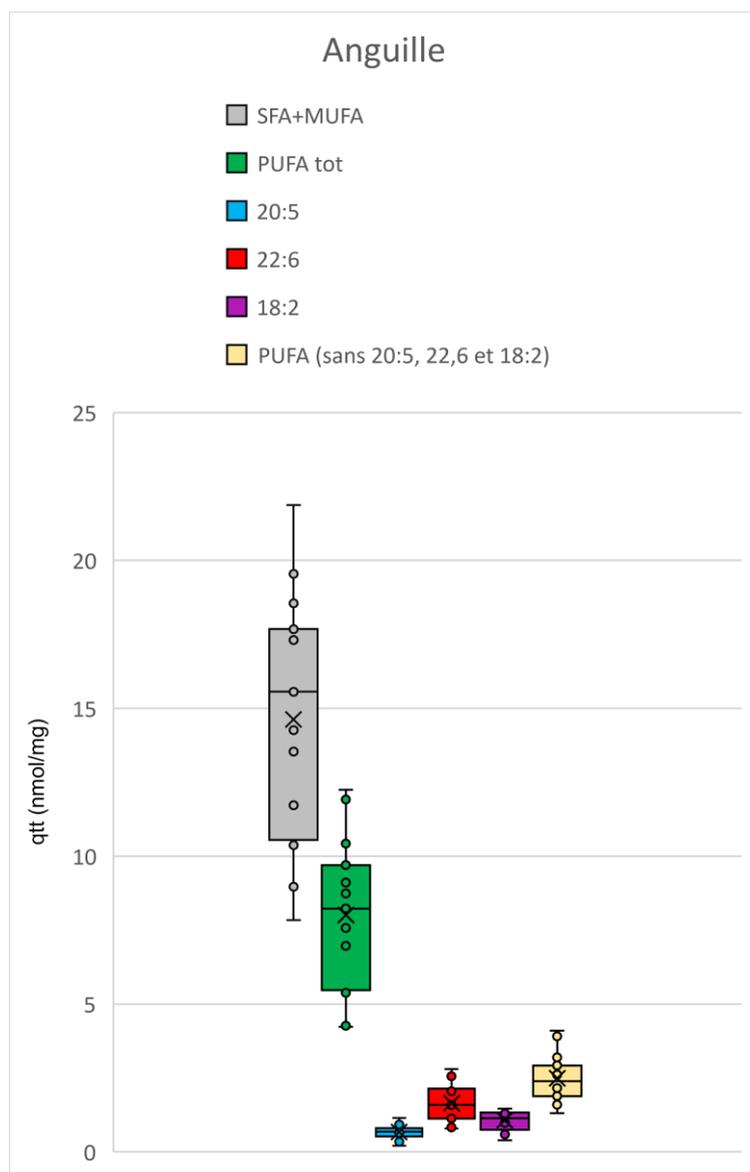


FIGURE 13 COMPOSITION EN ESPECE MOLECULAIRE ISSUS DES TAG DES ANGUILES

Ces espèces peuvent être classées en acides gras polyinsaturés, aussi dit PUFA, et en MUFA et SFA.

Les box plots ci-dessus indique la quantité en PUFA et en MUFA et SFA (en nmol/mg) en distinguant les PUFA les plus représentés (20:5, 22:6 et 18:2) des autres PUFA.

Chez les mulets, il y a légèrement plus de PUFA que de MUFA et SFA (cf.fig 13), les deux concentrations étant respectivement de 24 nmol/mg et 21 nmol/mg. Parmi les PUFA, l'espèce moléculaire la plus présente est le DHA (22 :6), suivi de l'EPA (20 :5). Ainsi, le mulet semble synthétiser préférentiellement du DHA plutôt que de l'EPA.

Chez les anguilles il y a environ trois fois plus de MUFA et SFA que de PUFA, avec une concentration d'environ 15 nmol/mg contre 8 nmol/mg. Cette différence de proportion a également été constatée par *Parzanini et al. (2021)* sur des anguilles plus âgées. En effet, ce dernier a décrit les anguilles les plus grosses comme ayant une plus grande proportion en acides gras du type MUFA que PUFA. Les MUFA aideraient lors de la migration des anguilles plus

âgées. Il est cependant difficile de comparer les AG de tous les lipides aux espèces moléculaires des TAG obtenues ici.

Le PUFA identifié le plus présent est le DHA (22 :6), suivi du 18 :2 puis de l'EPA (20 :5). Il y a une plus grande variété d'espèce moléculaire dans les anguilles que dans les mullets. Pour cette raison il y a plus de PUFA non-identifiés, qui sont du 18:3 et 18:4, parmi des PUFA totaux.

Les acides gras DHA et EPA ne sont pas synthétisés *de novo* par les poissons, cette source vient exclusivement des microalgues ingérées par le poisson lui-même ou par ses proies. Les civelles ne se nourrissant pratiquement pas à ce stade, il paraît normal d'observer très peu de ces PUFA. A contrario, les larves de mullet se nourrissent d'algues benthiques qui leur apportent les acides gras nécessaires à la synthèse de l'EPA et du DHA.

Il a été vu que la composition en PUFA, SFA et MUFA totaux peut être influencée par la salinité (Vasconi et al., 2019).

Afin d'évaluer simultanément les différences de concentration en PUFA et de concentration en MUFA et SFA selon les sites, un graphique est tracé (Fig. 15). Celui-ci affiche en ordonnée la concentration en PUFA et abscisse les MUFA et SFA (en nmol/mg) correspondants de chaque échantillon.

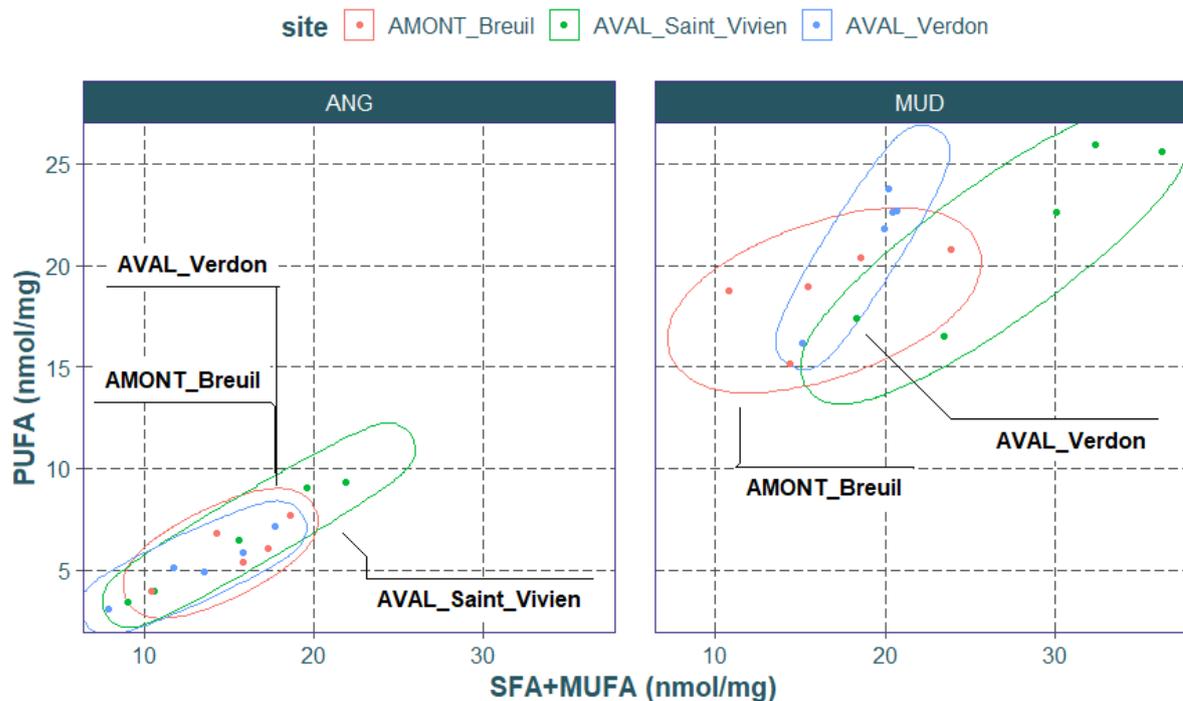


FIGURE 15 EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN PUFA EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SFA ET MUFA

Les concentrations en PUFA et MUFA et SFA semblent être corrélées et varier proportionnellement chez les anguilles. En effet, lorsque la concentration en PUFA augmente, celle en MUFA et SFA augmente également de manière linéaire. D'autre part, les sites ne semblent pas se distinguer les uns des autres.

A contrario, chez les mullets, le site Saint-Vivien semble encore une fois se démarquer des deux autres sites, notamment selon l'axe des abscisses correspondant à la concentration en MUFA et SFA. Les PUFA semblent donc être consommé préférentiellement au MUFA et SFA. Pour

vérifier cette hypothèse, un test de Kruskal-Wallis est effectué sur les valeurs des concentrations en MUFA et SFA des mulets (Fig. 16).

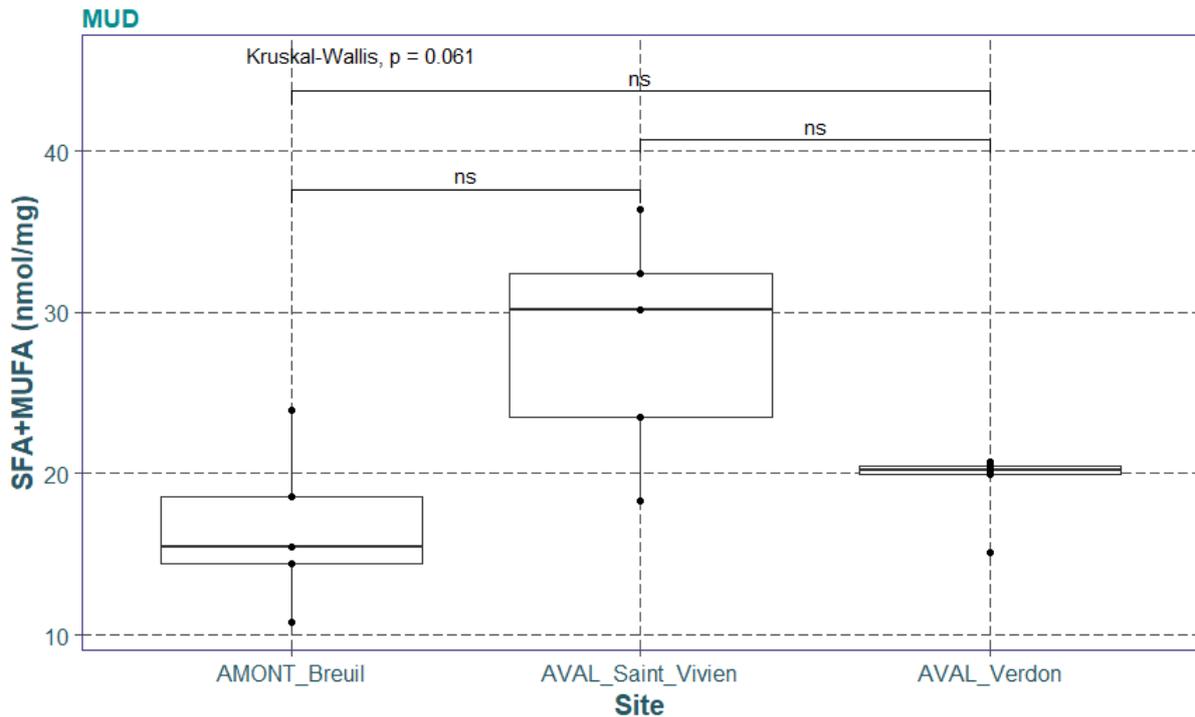


FIGURE 16 CONCENTRATIONS EN SFA ET MUFA (NMOL/MG) DES MULETS AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

Il est en effet possible d'observer une tendance avec le site Saint-Vivien qui semble avoir une plus grande teneur en SFA et MUFA que les deux autres sites. Néanmoins cette différence n'apparaît pas significative avec une p-value de 0,061, bien que très proche du seuil de risque de 5 %.

5. Ratio des espèces moléculaires

Après avoir observé que certains poissons synthétisent préférentiellement du DHA à l'EPA, il est possible de se demander si le ratio EPA/DHA varie en fonction des conditions du milieu. Pour cela, le ratio a été comparé entre les sites.

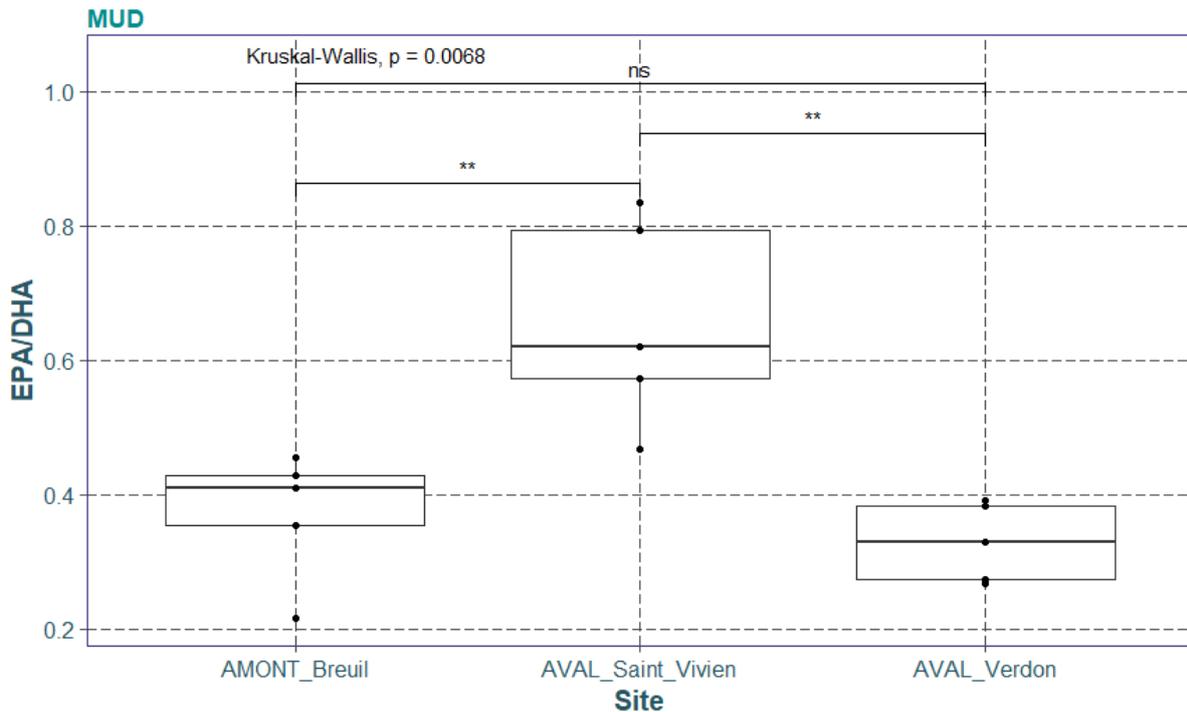


FIGURE 17 VALEURS DU RATIO EPA/DHA DES MULETS AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

La p-value étant de 0,0068, au moins un des sites est significativement différent des autres. Le test post-hoc permet de constater que c'est le site Saint-Vivien qui diffère des deux autres sites.

Ce ratio avait déjà utilisé par *Vasconi et al. (2019)* qui a montré une différence entre différentes espèces de poisson. L'EPA est apporté par les diatomées (*Guschina and Harwood, 2009*), il est ensuite métabolisé par le poisson pour former du DHA. Ainsi, au site Saint-Vivien la métabolisation de l'EPA en DHA semble moindre chez les mulets.

L'EPA et le DHA jouent un rôle dans l'immunité, la croissance et sont des anti-oxydants efficaces face à de multiples stress tels que la température, des pathogènes ou une pollution (*Kumar, N. et al., 2022*).

Ce même ratio ne fluctue pas selon les sites dans les anguilles (CF Annexe A3), cette différence vient de la stratégie de vie particulière des civelles.

Le ratio Oméga 3/Oméga 6 est un autre indicateur du contenu de l'alimentation des larves. L'oméga 6 est ici surtout représenté par l'AG 18:2 tandis que les omégas 3 sont représentés par le DHA et l'EPA.

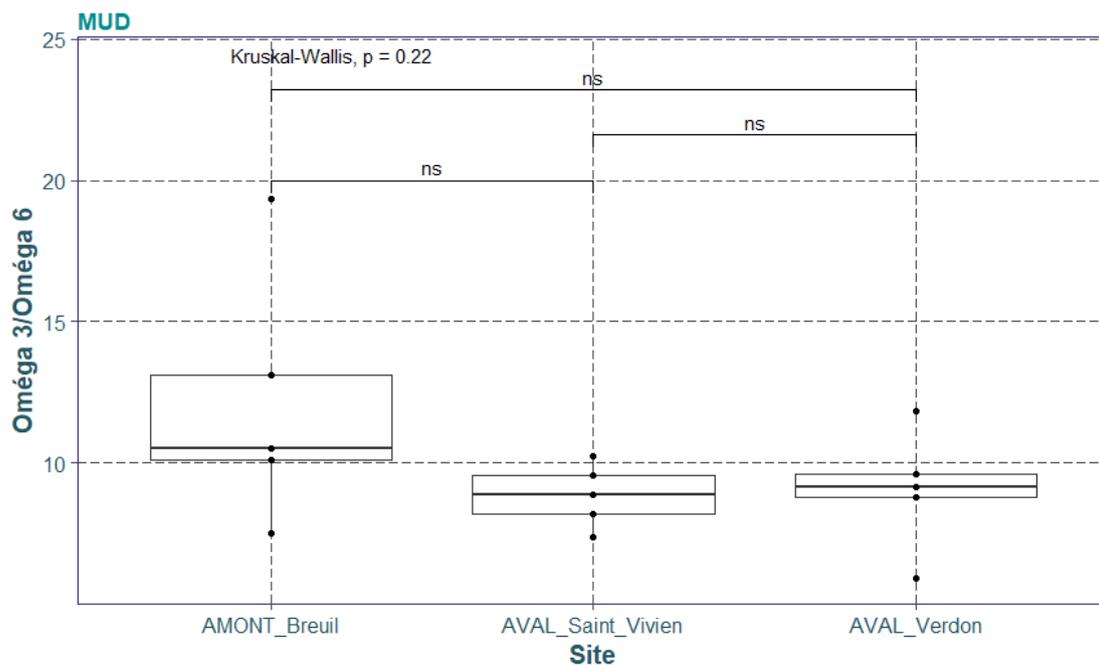


FIGURE 18 VALEURS DU RATIO OMEGA 3/OMEGA 6 DES MULETS AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

Une p-value de 0,22 est obtenue, indiquant que les valeurs du ratio des mulets ne diffèrent pas significativement selon les sites.

En outre, les valeurs du ratio se trouvant autour de 10, il y a largement plus d'oméga 3 que d'oméga 6 dans les mulets.

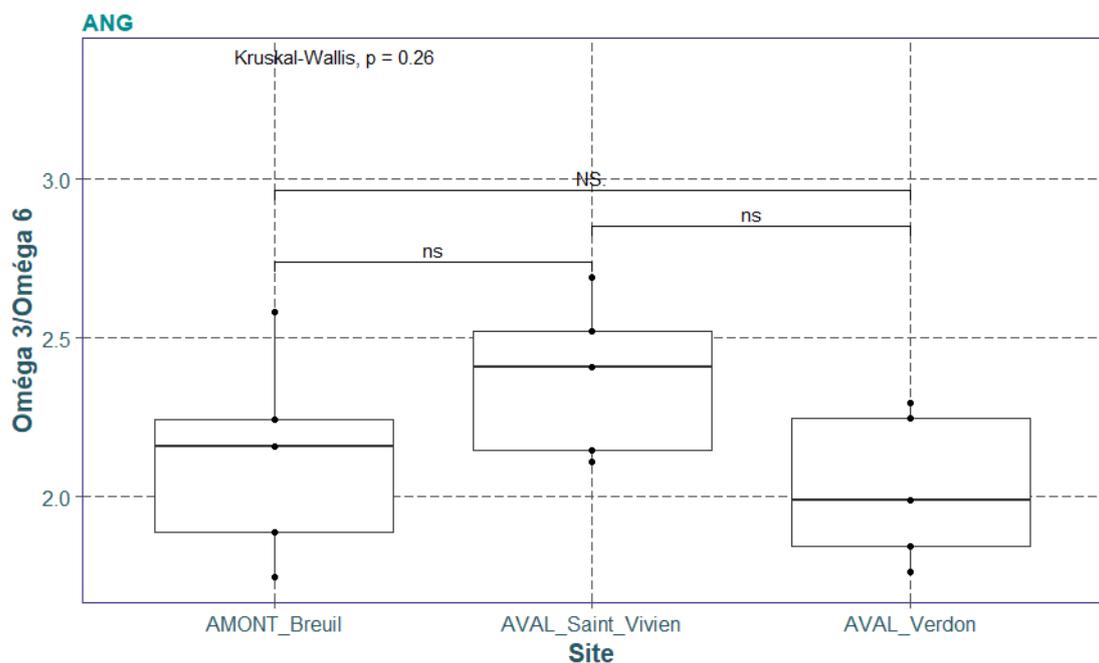


FIGURE 19 VALEURS DU RATIO OMEGA 3/OMEGA 6 DES ANGUILES AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES

Une p-value de 0,26 est obtenue, indiquant que les valeurs du ratio des anguilles ne diffèrent pas significativement selon les sites.

Les valeurs du ratio se trouvant entre 2 et 2,5, il y a légèrement plus d'oméga 3 que d'oméga 6 dans les anguilles. Cette proportion est vérifiée dans les indications nutritionnelles sur les anguilles adultes ².

Les omégas 6 sont majoritairement apportés par les algues vertes tandis que les omégas 3 sont apportés par les diatomées qui ne contiennent que de l'EPA (*Guschina and Harwood, 2009*). Il se pourrait qu'il y ait plus de diatomée que d'algues vertes dans l'estuaire de la Gironde. Néanmoins des prélèvements d'algues sur les sites sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Il serait donc pertinent d'échantillonner des biofilms et des algues en suspension afin de pouvoir observer les sources d'alimentation.

6. Les limites des méthodes

Tout au long du protocole et des analyses, des limites ont pu être notées.

Tout d'abord, il n'existe pas de référence matricielle pour les poissons qui permettrait de s'assurer que l'expérimentation s'est bien déroulée. En effet, cette référence matricielle permettrait d'avoir une valeur de référence connue dont il faudrait se rapprocher le plus possible pour assurer une bonne extraction. Néanmoins, il n'est pas nécessaire d'avoir autant de précision pour une analyse qualitative des lipides dans le cadre de ce stage.

D'autre part, aucun traceur n'a été ajouté avant l'extraction pour évaluer les pertes possibles en lipide au cours des manipulations. Celui-ci aurait permis d'obtenir un rendement. Ainsi, la quantification des lipides n'est pas très fiable étant donné que les pertes ne sont pas quantifiées, mais, en supposant que la perte est la même pour tous les lipides, les proportions sont exactes.

Le test Kruskal Wallis est peu robuste lorsque l'analyse est faite sur une petite quantité d'échantillon. Aussi un test paramétrique aurait été plus puissant qu'un test non-paramétrique. Il faudrait refaire l'expérimentation avec plus d'individus, sur plusieurs années pour déterminer si les différences ou similitudes persistent.

² <https://www.laurentberta.com/aliment/viandes-oeufs-poissons/poissons-crus/anguille-crue>

V. Conclusion

En raison de leur histoire de vie très différente, les deux espèces étudiées ont des teneurs en cholestérol et en TAG très distinctes. Les deux espèces se distinguent également par leur composition en acides gras issus des TAG. Pour cela, les espèces sont étudiées distinctement.

La ressource en nourriture ne semble pas être limitante dans les trois sites étudiés puisque la teneur en TAG totaux, c'est-à-dire les lipides de réserve, ne fluctue pas. Ainsi, aucun site ne paraît prioritaire à ce stade dans un contexte de conservation ou de restauration.

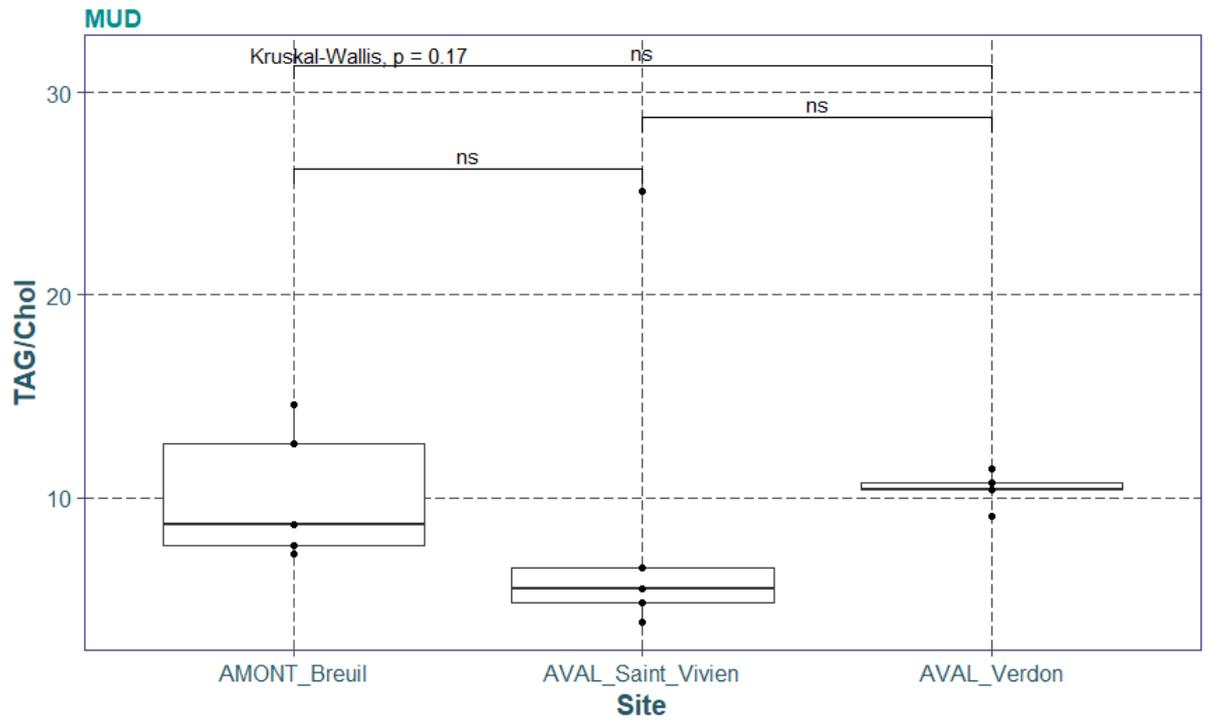
Cependant, le site Saint-Vivien semble se détacher des deux autres sites avec les concentrations en cholestérol puis en SFA et MUFA, et surtout un ratio EPA/DHA significativement supérieur. Par manque de donnée sur le terrain, il n'a pas été trouvé d'explications univoques à ces observations.

Pour compléter ces résultats il faudrait refaire l'analyse sur un poisson ayant une autre histoire de vie. Par exemple, les gobies qui sont des poissons résidents et entièrement dépendants des ressources disponibles au sein de l'estuaire, permettrait de connaître avec plus de certitude l'apport nutritif de l'estuaire seul. En effet, il n'est pas possible d'affirmer avec exactitude que les lipides de réserve obtenus par les poissons proviennent du site d'échantillonnage puisque les anguilles et les mulots ont migré depuis la mer avant leur capture sur les sites.

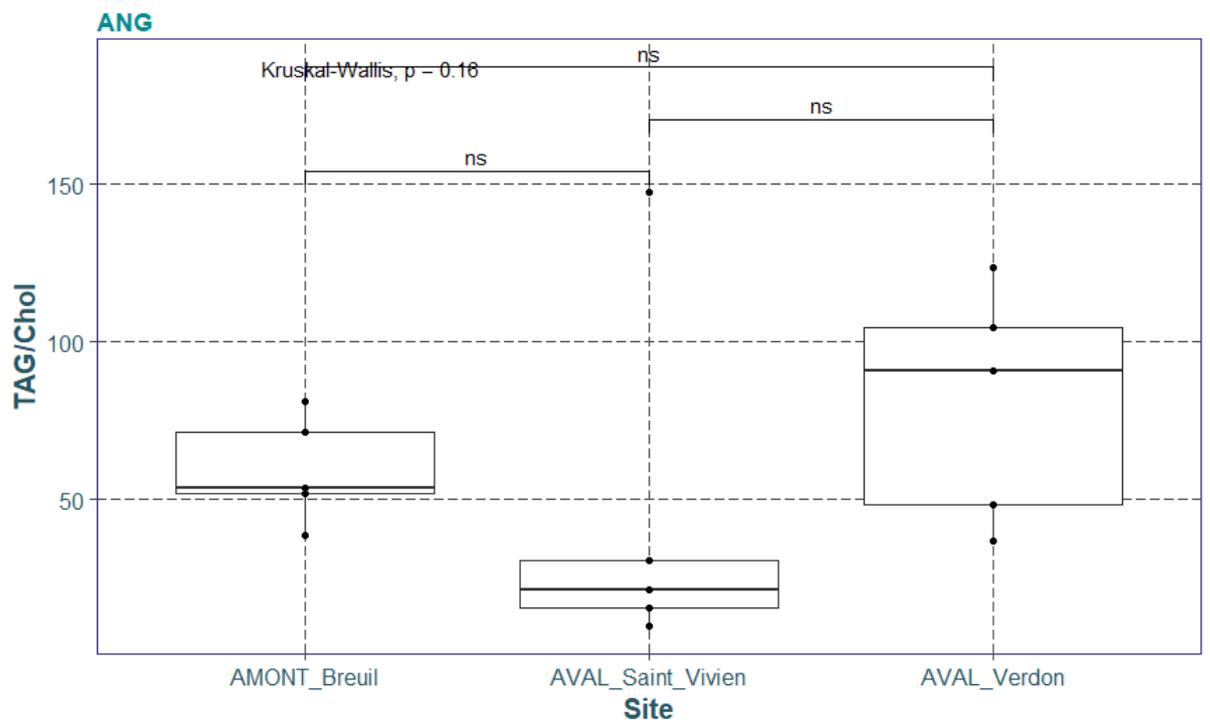
Les phospholipides étant les principaux constituants des membranes plasmiques, il serait par ailleurs possible d'étudier par la suite un indice du type TAG/phospholipide. Celui-ci serait peut-être plus robuste et discriminant que l'indice actuellement basé sur le cholestérol.

VI. Annexes

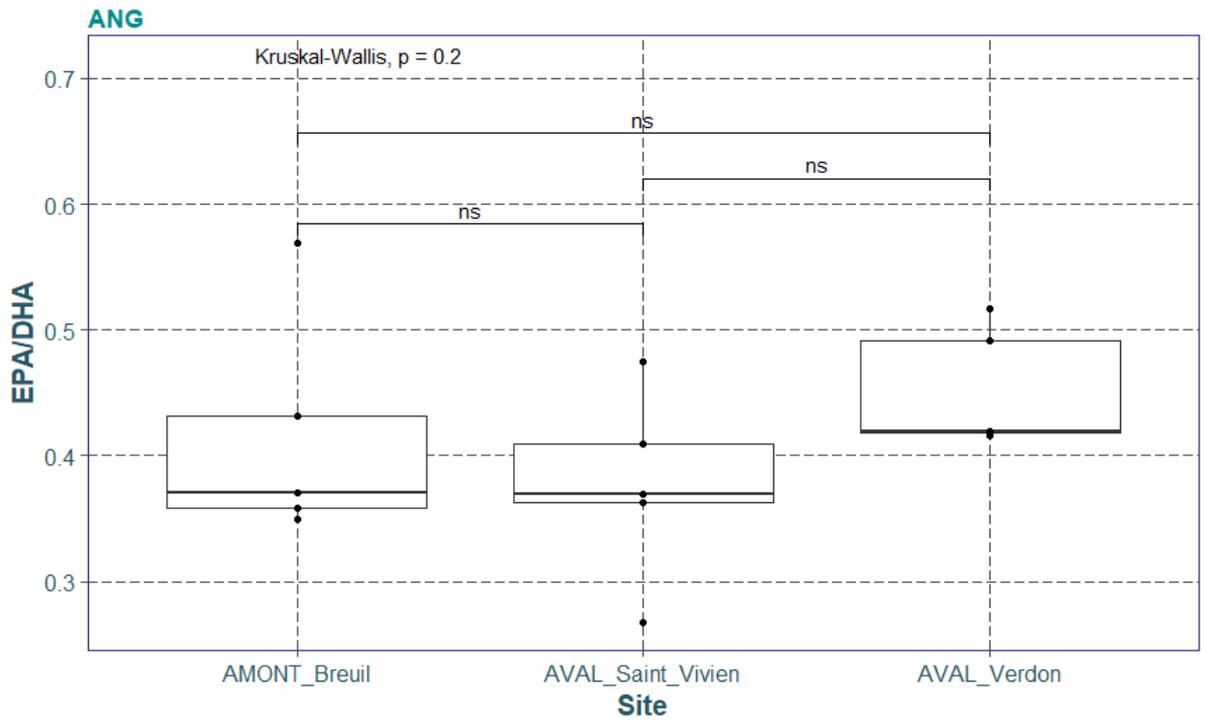
A) Résultats statistiques annexés



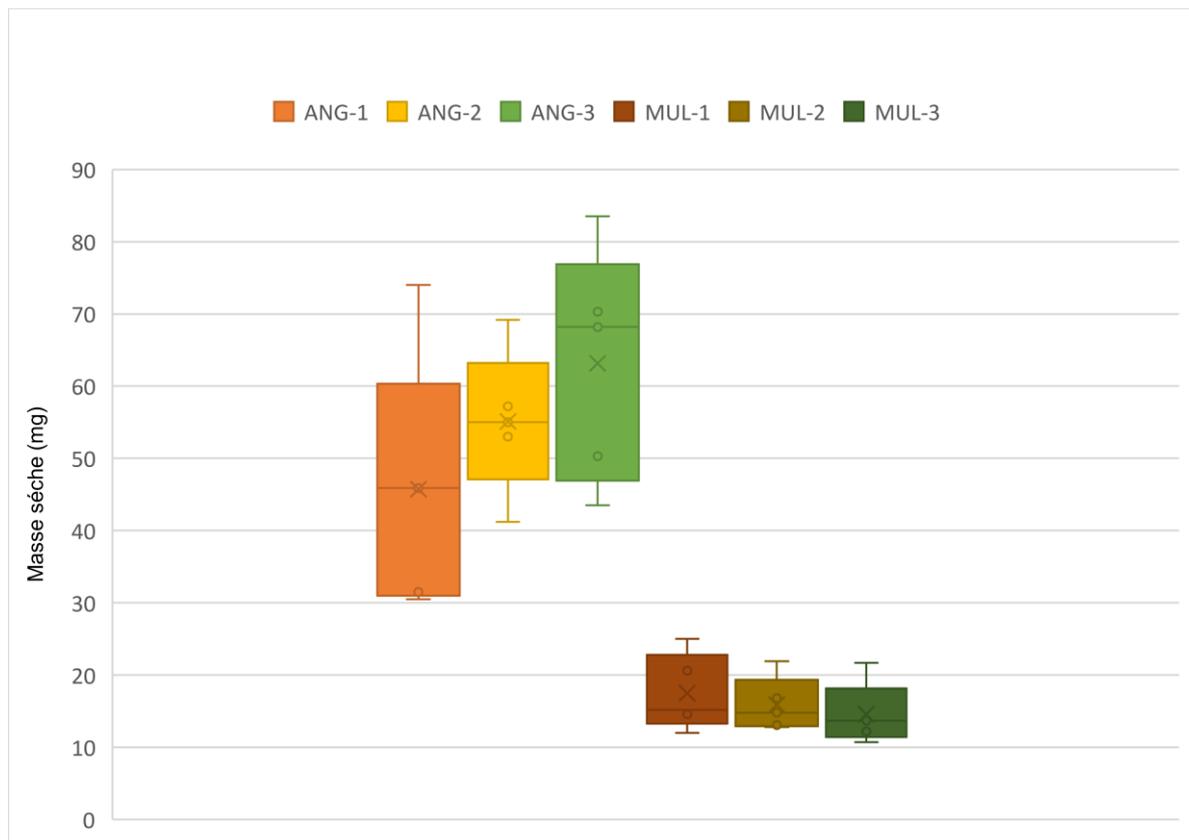
ANNEXE A1 VALEURS DU RATIO TAG/CHOL DES MULETS AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES



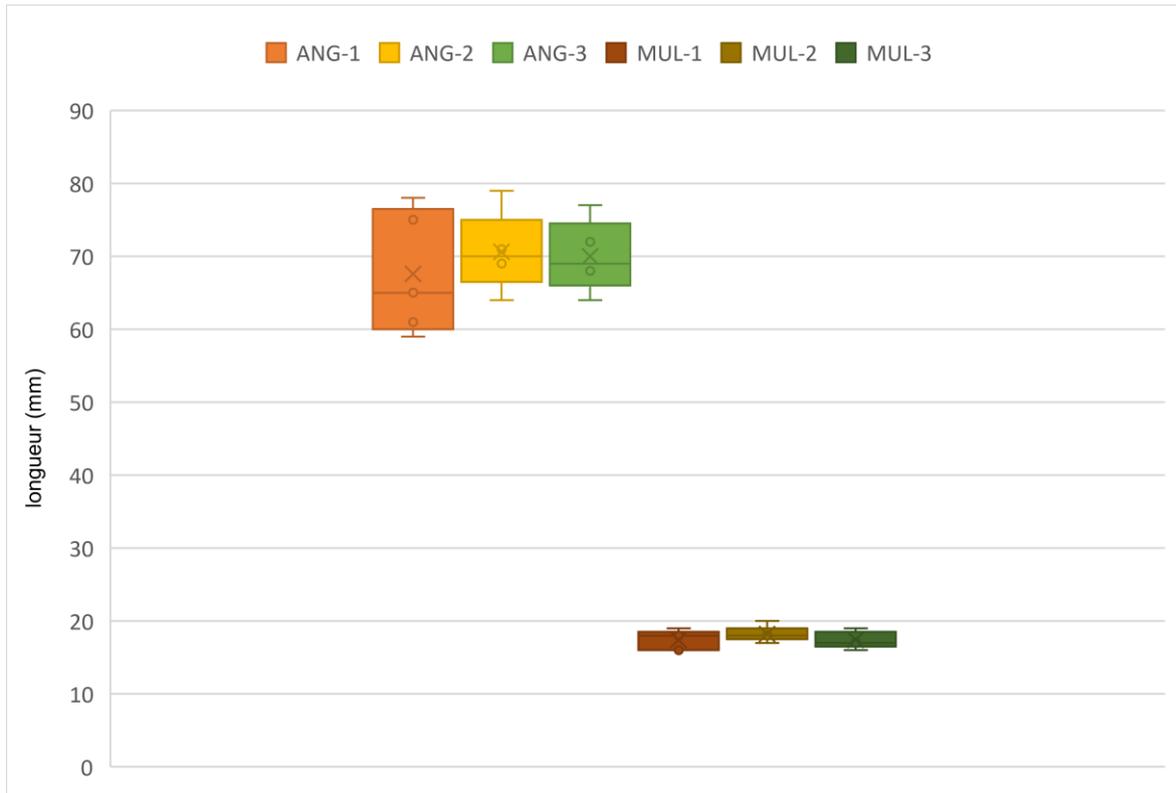
ANNEXE A2 VALEURS DU RATIO TAG/CHOL DES ANGLUILLES AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES



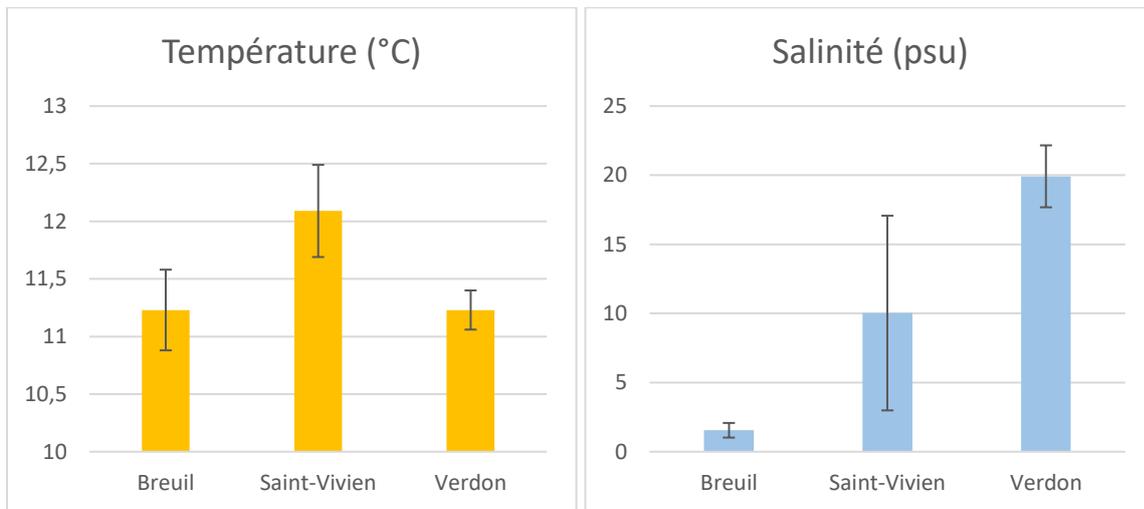
ANNEXE A3 VALEURS DU RATIO EPA/DHA DES ANGUILLES AVEC LES RESULTATS DES COMPARAISONS DEUX A DEUX SELON LES SITES



ANNEXE A4 VALEURS DES MASSES SECHES (EN MG) DES ANGUILLES (ANG) ET DES MULETS (MUL) SELON LES SITES (1, 2 ET 3)



ANNEXE A4 VALEURS DES LONGUEURS (EN MM) DES ANGUILLES (ANG) ET DES MULETS (MUL) SELON LES SITES (1, 2 ET 3)



ANNEXE A5 DONNEES PHYSICOCHIMIQUES DES SITES AVEC LA TEMPERATURE (°C) A GAUCHE ET LA SALINITE (PSU) A DROITE.

B) Protocole d'extraction des lipides

N° de version	Rédacteur(s)	Vérificateur(s)	Approbation « qualité »	Approbateur
	Mélissa EON 	Nicolas CREUSOT 		

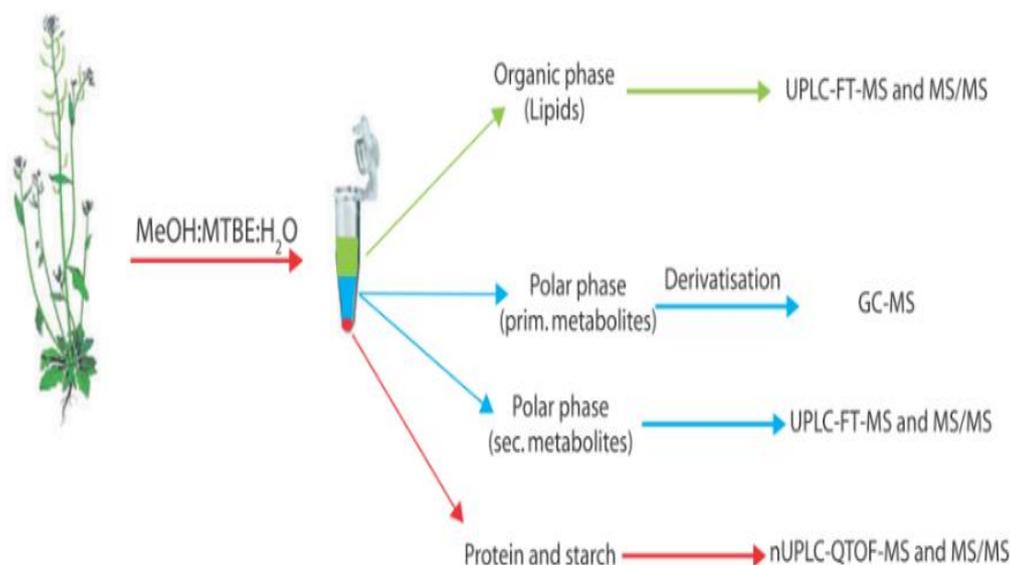
La signature d'un seul « Approbateur » est obligatoire.

OBJET & DOMAINES D'APPLICATION

Cette instruction a pour but de préciser les différentes étapes d'extraction des métabolites et des lipides sur une matrice algale ou biofilm préalablement lyophilisée et conservée au congélateur -80°C. Celle-ci est destinée à tout le personnel du laboratoire des biomarqueurs d'exposition des milieux aquatiques.

PRINCIPE

Utilisation d'un mélange MeOH/MTBE/H₂O pour l'extraction simultanée des métabolites primaires, secondaires et lipides. L'extraction se fait par combinaison d'une extraction liquide/solide et liquide/liquide qu'on réalise deux fois pour optimiser les rendements.



TERMINOLOGIE et ABREVIATIONS

IS : étalons internes

MeOH

MTBE

REP : réplicats

DOCUMENTS de REFERENCE

Giavalisco et al.2011 ; Sostare et al. 2018 ; Salem et al. 2017 ; Cajka and Fiehn 2016 ; Pezzati et al.2019 ; Tufi et al.2015

SOMMAIRE

<u>1</u>	<u>préparation de la manipulation</u>	35
<u>1.1</u>	<u>Matériels nécessaires</u>	35
<u>1.2</u>	<u>Conditions expérimentales</u>	35
<u>1.3</u>	<u>Préparation des mélanges d'extraction – Grade UPLC (ici pour 60 réplicats !)</u>	35
<u>1.4</u>	<u>Préparation des tubes à billes et vials</u>	35
<u>1.5</u>	<u>Préparation de la glace pilée ou blocs froids</u>	35
<u>1.6</u>	<u>Préparation des MELANGES pour leS dopageS:</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2</u>	<u>Extraction</u>	35
<u>2.1</u>	<u>Overview</u>	35
<u>2.2</u>	<u>Etapes préliminaires</u>	36
<u>2.3</u>	<u>Extractions</u>	36

3	Préparation des vials pour injection	37
4	Assurance qualité & précautions	38

Préparation de la manipulation

Matériels nécessaires

- Tubes 2mL avec jupe capuchon plat en PP + microbilles 0.5mm
- Balance de précision
- Fastprep (cf EABX_BIOMAR_702)
- Centrifugeuse réfrigérée (cf EABX_BIOMAR_704)
- Congélateur -80°C
- Blocs de glace et glaçons
- Micropipettes + pointes
- Vials ambrés 1.8mL avec étiquette pour cryoconservation
- Flacons verre 150mL
- Bain à ultrasons
- Solvants grade UPLC
- 2 béchers
- Etalons internes
- Paillasse avec hotte aspirante
- 100 mg de matrice pour « spike » (condition contrôle ou matrice référence)

Conditions expérimentales

- Prévoir 5-6 réplicats par échantillons expérimentaux
- Prévoir une condition **Procedural blank** = solvant (incluant ou non blanc terrain)

Préparation des mélanges d'extraction – Grade UPLC (ici pour 60 réplicats !)

- Préparer un mélange MTBE:MeOH (3:1 , v:v) => 150 mL stockés à 4°C pour une semaine
- Préparer un mélange H2O:MeOH (3:1 , v:v) => 100 mL stockés à 4°C pour une semaine

Préparation des tubes à billes et vials

Toutes ces étapes peuvent être faites la veille.

- Annoter l'ensemble des tubes
- Ajouter 150 mg (\pm 10mg) de billes 0.5mm dans chaque tube de 2mL
- Annoter l'ensemble des vials stock ambrés 1.8mL (en double pour fraction lipophile)
- Peser les vials stock ambrés vides avec bouchons (1.8 mL)

N.B. Pour les vials ambrés des étiquettes imprimables par ordinateur sont disponibles

Préparation de la glace pilée ou blocs froids

- Préparer de la glace à la machine à glace en continu tout le long de l'extraction
- Placer blocs froids au -80°C ainsi que des portoirs à microtubes

Extraction

Overview

N.B. Pas d'étalon interne ici.

Etapes préliminaires

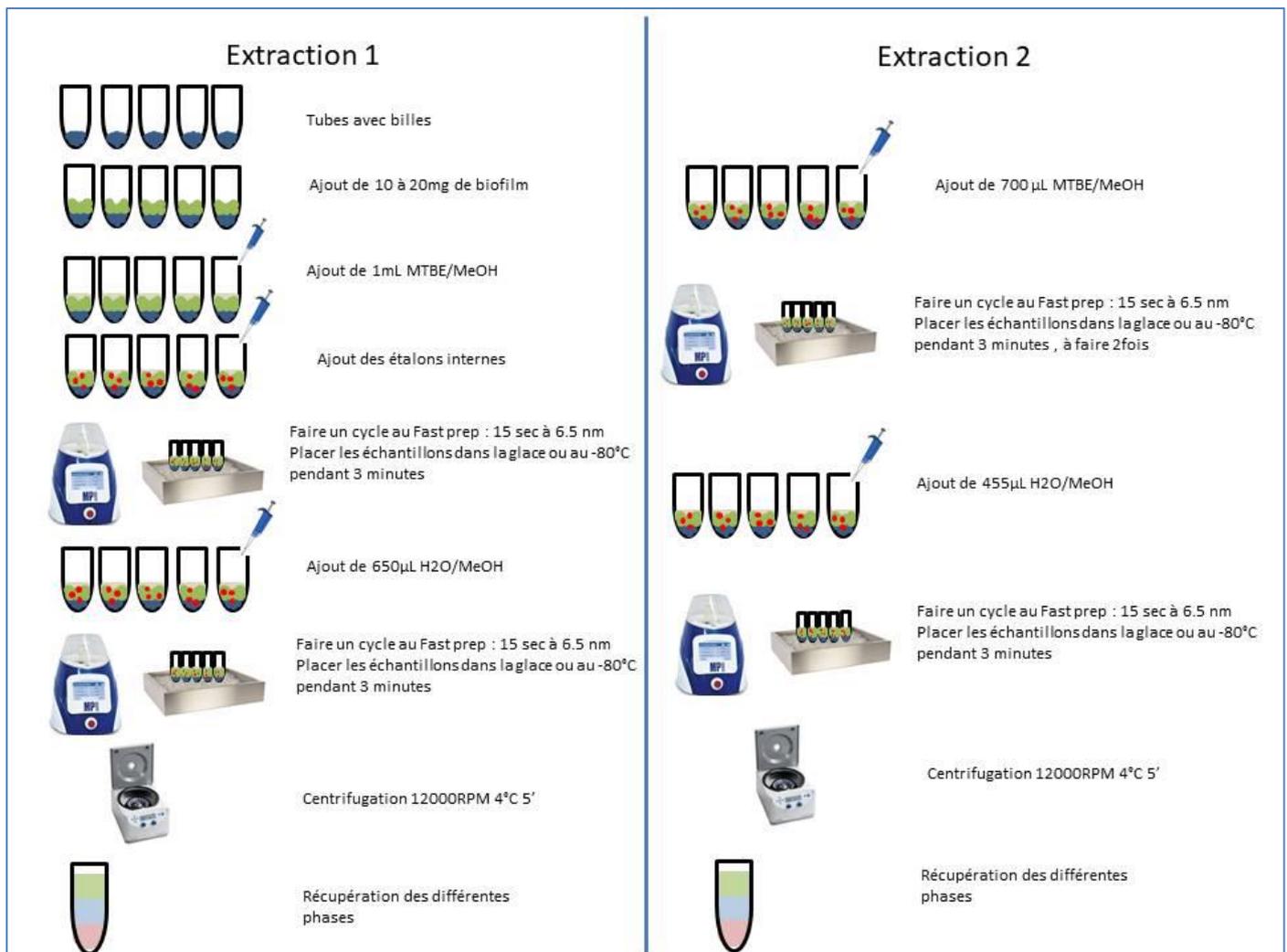
Sur glace, dans la salle des balances :

- Ajouter 10 ou 20 mg (+- 1mg) de matrice lyophilisée par tube contenant les microbilles
- Noter la masse exacte d'échantillon ajoutée
- Procedural blank : solvant seul

Afin de garantir la chaîne du froid :

- Pour 15' : Placer les tubes et solution MTBE/MeOH à -80°C ; solutions de H2O/MeOH à -20°C
- Lancer le Fast Temp sur la centrifugeuse (4°C)

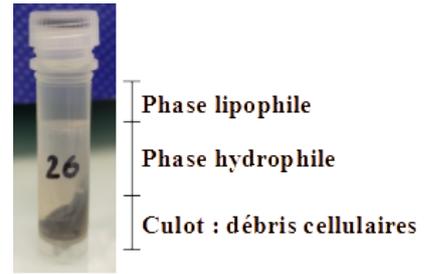
Extractions



- Extraction 1

- Sous hotte et sur glace : Ajouter **1 mL de MTBE:MeOH (3:1)** par tube
- Faire un cycle au Fast prep : 15 sec à 6.5 nm
- Placer les échantillons dans la glace ou au -80°C pendant 3 minutes
- Faire un second cycle au Fast prep : 15 sec à 6.5 nm
- Placer les échantillons dans la glace ou au -80°C pendant 3 minutes
- Sous hotte et sur glace : Ajouter **650 µL de H2O:MeOH**
- Faire un troisième cycle au Fast prep : 15 sec à 6.5 nm

- Placer les échantillons dans la glace ou au -80°C pendant 3 minutes
- Centrifugation : 12000 RPM, 4°C , 5'
- Sous hotte et sur glace récupérer les phases sous la hotte dans vials stocks (ambrés 1.8mL) (**500 μL lipophile** dessus) à l'aide d'une micropipette. Jeter la phase hydrophile.
- Conserver le culot pour extraction 2



- Extraction 2

- Sous hotte et sur glace : Ajouter **700 μL de MTBE:MeOH (3:1)** par tube
- Faire un cycle au Fast prep : 15 sec à 6.5 nm
- Placer les échantillons dans la glace ou au -80°C pendant 3 minutes
- Faire un 2d cycle au Fast prep : 15 sec à 6.5 nm
- Placer les échantillons dans la glace ou au -80°C pendant 3 minutes
- Sous hotte et sur glace : Ajouter **455 μL de H₂O:MeOH**
- Faire un 3d cycle au Fast prep : 15 sec à 6.5 nm
- Placer les échantillons dans la glace ou au -80°C pendant 3 minutes
- Centrifugation : 12000 RPM, 4°C , 5'
- Sous hotte et sur glace, récupérer les phases sous la hotte dans les mêmes vials stocks (**600 μL lipophile** dessus)



-Fin de manip

- Peser les vials stocks ambrés après transfert des extraits
 - Théoriquement : 1,1 mL lipo
- Stocker l'ensemble des vials à -80°C

Préparation des vials pour injection

Préparation des échantillons

- Cholestérol (libre et stérile) (aucune dilution) : Prélever 50 μL de chaque échantillon, évaporer à sec chaque vial puis resuspendre avec 200 μL de PMA/PMB (50 :50).
Vinj = 50 μL
- TAG (dilution au 1/10) : Prélever 50 μL de chaque échantillon, évaporer à sec chaque vial puis resuspendre avec 500 μL de PMA/PMB (50 :50).

V_{inj} = 20µL



Préparation des gammes

- Préparer du gamme étalon de cholestérol libre :

[] ppm	0	5	7,5	10	15	25	50	75	100
V Sol Fille cholesterol 100 µg/mL (µL)	0	10	15	20	30				
V Sol mère cholesterol 1000 µg/mL (µL)						5	10	15	20
	evaporation à sec								
Volume PMA/PMB 50/50	200	200	200	200	200	200	200	200	200

- Préparer une gamme étalon de stéride :

[] ppm	0	5	7,5	10	15	25	50	75	100
V Sol Fille stéride (Chol 18:0) 100 µg/mL (µL)	0	10	15	20	30				
V Sol mère stéride (Chol 18:0) 1000 µg/mL (µL)						5	10	15	20
Volume PMA/PMB 50/50	200	190	185	180	170	195	190	185	180

- Préparer une gamme étalon de TAG :

[] ppm	0	0,1	0,5	1	2	5	10	50
V Sol Fille Tristéa. 100 µg/mL (µL)			2,5	5	10	25	50	250
V Sol Fille Tristéarine 1 µg/mL (µL)		50						
Volume PMA/PMB 50/50	500	450	497,5	495	490	475	450	250

Assurance qualité & précautions

- ✓ Tous les réactifs utilisés y compris l'eau doivent être de grade UPLC.
- ✓ Le nettoyage de la verrerie doit se faire selon le protocole de la laverie du laboratoire en utilisant les solvants de grade UPLC ou la calcination au four 8h à 450°C.
- ✓ Tous les déchets générés doivent être recyclés selon le document qualité en vigueur au laboratoire EABX_GEN_706.
- ✓ Les consignes de sécurité, le port des EPI et l'utilisation des EPC doivent être respectés EABX_CHI_701.
- ✓ La traçabilité des échantillons est primordiale, il est donc nécessaire d'optimiser la dénomination des échantillons et leur rangement ainsi que tous les réactifs et solutions stocks.
- ✓ Un suivi gravimétrique des solutions stock est réalisé.
- ✓ La conservation des échantillons se faisant par le froid il est primordial que le maximum des étapes se fassent sur de la glace.

- ✓ Noter sur un cahier de laboratoire l'ensemble des pesés ainsi que les volumes et nature d'IS ajoutés.

C) Photos du protocole

ANNEXE C1 PHOTO DES LARVES ECHANTILLONNEES



ANNEXE C2 PHOTO D'UN TUBE D'ECHANTILLON AVEC LES BILLES ET UN MULET LYOPHILISE



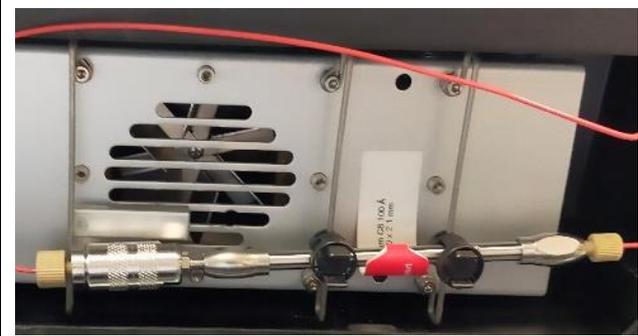
ANNEXE C4 PHOTO DU SYSTEME D'EXTRACTION VISIPREP AYANT SERVI A L'EVAPORATION



ANNEXE C3 PHOTO DES ECHANTILLONS AU -80 °C



Annexe C5 Photo de la Colonne C8



ANNEXE C6 PHOTO DE L'HPLC-MS/MS



Bibliographie

- Aldred, E.M., Buck, C. and Vall, K. (2009) 'Chapter 10 - Lipids', in Aldred, E.M., Buck, C., and Vall, K. (eds) *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 73–80. doi:10.1016/B978-0-443-06898-0.00010-4.
- Baudrimont M, Schäfer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Boudou A, Blanc G. (2005) Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci Total Environ*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.07.009. PMID: 15626396.
- Blanco, A. and Blanco, G. (2017) 'Chapter 5 - Lipids', in Blanco, A. and Blanco, G. (eds) *Medical Biochemistry*. Academic Press, pp. 99–119. doi:10.1016/B978-0-12-803550-4.00005-7.
- Cuvelier, C. *et al.* (2004) 'Fatty acids: Nomenclature and dietary sources', *Annales de Médecine Veterinaire*, 148, pp. 133–140.
- Cuvelier, C. (no date) 'Comparaison des performances zootechniques, de la qualité de la viande et des caractéristiques de la graisse intramusculaire chez des taurillons Blanc Bleu Belge, Limousin et Aberdeen Angus à l'engraissement', p. 316.
- 'Fatty-acids-Nomenclature-and-dietary-sources.pdf' (no date). Available at: https://www.researchgate.net/profile/Jean-Francois-Cabaraux/publication/286727141_Fatty_acids_Nomenclature_and_dietary_sources/links/5dc14b01299bf1a47b16292a/Fatty-acids-Nomenclature-and-dietary-sources.pdf?origin=publication_detail (Accessed: 13 April 2022).
- Galindo, A. *et al.* (2021) 'Polyunsaturated fatty acid metabolism in three fish species with different trophic level', *Aquaculture*, 530, p. 735761. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735761.
- Giraldo, C. *et al.* (2013) 'Lipid components as a measure of nutritional condition in fish larvae (*Pleuragramma antarcticum*) in East Antarctica', *Marine Biology*, 160(4), pp. 877–887.
- Gómez-Limia, L. *et al.* (2020) 'Fatty acid profiles and lipid quality indices in canned European eels: Effects of processing steps, filling medium and storage', *Food Research International*, 136, p. 109601. doi:10.1016/j.foodres.2020.109601.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L. (2009) 'Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry', in Kainz, M., Brett, M.T., and Arts, M.T. (eds) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York, NY: Springer, pp. 1–24. doi:10.1007/978-0-387-89366-2_1.
- Håkanson, J.L. (1989) 'Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*', *Marine Biology*, 102(2), pp. 143–151. doi:10.1007/BF00428274.
- Hassett, R.P. and Crockett, E.L. (2009) 'Habitat temperature is an important determinant of cholesterol contents in copepods', *The Journal of Experimental Biology*, 212(1), p. 71. doi:10.1242/jeb.020552.
- Li, L.-H. *et al.* (2019) 'Analytical methods for cholesterol quantification', *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), pp. 375–386. doi:10.1016/j.jfda.2018.09.001.
- Lochmann, S. *et al.* (2011) 'Lipid class composition as a measure of nutritional condition in individual larval Atlantic cod (*Gadus morhua*)', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, pp. 1294–1306. doi:10.1139/f95-126.

- Lund, I. *et al.* (2020) ‘Assessment of lipid uptake and fatty acid metabolism of European eel larvae (*Anguilla anguilla*) determined by ¹⁴C in vivo incubation’, *Aquaculture*, 531, p. 735858. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735858.
- Menet, M.-C. (2011) ‘Principes de la spectrométrie de masse’, *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(437), pp. 41–53. doi:10.1016/S1773-035X(11)71211-4.
- Neury-Ormanni, J. (no date) ‘Impact de la saisonnalité et d’une contamination pesticide environnementale sur des relations biotiques entre la micro-méiofaune et les microalgues d’un biofilm d’eau douce’, p. 209.
- Nieves-Soto, M. *et al.* (2021) ‘Effect of the enrichment time with the tuna orbital oil emulsion on the fatty acids profile of juveniles of *Artemia franciscana*’, *Aquaculture and Fisheries*, 6(1), pp. 69–74. doi:10.1016/j.aaf.2020.03.008.
- Omega-3 fatty acids effectively modulate growth performance, immune response, and disease resistance in fish against multiple stresses / Elsevier Enhanced Reader* (no date). doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737506.
- Osman, H., Suriah, A.R. and Law, E.C. (2001) ‘Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters’, *Food Chemistry*, 1(73), pp. 55–60. doi:10.1016/S0308-8146(00)00277-6.
- Pane, J.D. (no date) ‘Variations ontogéniques et spatio-temporelles des écophases larvaires des poissons: évaluation de la condition nutritionnelle et détermination des périodes critiques’, p. 289.
- Prigge, E. *et al.* (2012) ‘Dietary effects on fatty acid composition in muscle tissue of juvenile European eel, *Anguilla anguilla* (L.)’, *Helgoland Marine Research*, 66, pp. 51–61. doi:10.1007/s10152-011-0246-3.
- Reuss, N. and Poulsen, L. (2002) ‘Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland’, *Marine Biology*, 141(3), pp. 423–434. doi:10.1007/s00227-002-0841-6.
- Strandberg, U. *et al.* (2015) ‘Inferring phytoplankton community composition with a fatty acid mixing model’, *Ecosphere*, 6(1), p. art16. doi:10.1890/ES14-00382.1.
- Taipale, S. *et al.* (2013) ‘Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes’, *Aquatic Microbial Ecology*, 71(2), pp. 165–178. doi:10.3354/ame01671.
- Tocher, D.R. (2003) ‘Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish’, *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), pp. 107–184. doi:10.1080/713610925.
- Vasconi, M. *et al.* (2019) ‘Authentication of farmed and wild european eel (*Anguilla anguilla*) by fatty acid profile and carbon and nitrogen isotopic analyses’, *Food Control*, 102, pp. 112–121. doi:10.1016/j.foodcont.2019.03.004.