



**HAL**  
open science

**Effets de l'alimentation végétale sur les capacités digestives de la truite arc-en-ciel et sur le microbiote associé à sa muqueuse digestive en fonction de son génotype**

Marion Borey

► **To cite this version:**

Marion Borey. Effets de l'alimentation végétale sur les capacités digestives de la truite arc-en-ciel et sur le microbiote associé à sa muqueuse digestive en fonction de son génotype. Alimentation et Nutrition. UPPA, 2017. Français. NNT: . tel-01567327

**HAL Id: tel-01567327**

**<https://hal.science/tel-01567327>**

Submitted on 22 Jul 2017

**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.

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR  
École doctorale 211-SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

Présentée et soutenue le 24 mai 2017  
par **Marion BOREY**

pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Spécialité : **Sciences agronomiques, biotechnologies agro-alimentaires**

---

## **Effets de l'alimentation végétale sur les capacités digestives de la truite arc-en-ciel et sur le microbiote associé à sa muqueuse digestive en fonction de son génotype**

---

### MEMBRES DU JURY

#### RAPPORTEURS

- Patrick PRUNET
- Thierry GIDENNE

Directeur de Recherche / INRA  
Directeur de Recherche / INRA

#### EXAMINATEURS

- Mathilde DUPONT-NIVET
- Diego MORGAVI

Directeur de Recherche / INRA  
Directeur de Recherche / INRA

#### DIRECTEURS

- Béatrice LAUGA
- Christine BUREL

Professeure / Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Ingénieure de recherche / INRA



## **REMERCIEMENTS**

Ce travail de thèse a été financé en partie par la Région Aquitaine, l'Institut National de recherche en Agronomie (INRA), et par le projet ANR Agreefish. Il a été mené grâce à un partenariat entre deux laboratoires d'accueil, l'unité UMR 1419 NuMéa (Nutrition Métabolisme Aquaculture) du laboratoire INRA de Saint-Pée-sur-Nivelle, et l'IPREM EEM (Equipe Environnement et Microbiologie) UMR CNRS 5254 de l'UFR des sciences et techniques de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA).

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans la contribution de nombreuses personnes que je remercie très sincèrement pour leur aide et pour leur soutien.

Mes remerciements à mes deux directrices de thèse Béatrice Lauga et Christine Burel pour leurs conseils méthodologiques tout au long de ce travail, leur aide dans l'analyse des données obtenues et leur relecture attentive. A leur soutien sans lequel je n'aurais pas pu passer les différents obstacles rencontrés. A leur ténacité face à mes défauts d'écriture, à leur curiosité et à leurs encouragements pour le recours à différentes analyses statistiques lors de l'interprétation des données.

Mes remerciements à Mathilde Dupont Nivet, Thierry Gidenne, Diego Morgavi et Patrick Prunet pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Mes remerciements à Sandrine Skiba, directrice de l'unité NuMéa pour son accueil au sein de l'unité NuMéa.

Mes remerciements à Anthony, Frank, Frédéric, Laurent, Nicolas, Patrick, Peyo, et Thierry, pisciculteurs des fermes expérimentales de Donzacq, de Lee Athas, de La Peima, et du plateau expérimental de Saint-Pée-sur-Nivelle. A leur accueil chaleureux à chacun des prélèvements, et à leur travail au quotidien pour l'approvisionnement en poissons et pour la collecte des données de performances zootechniques.

Mes remerciements à Anne C, Anne S, Cécile, Elisabeth, Marianne, Alexandre, Samuel, et Vincent, de l'unité NuMÉA et de l'EEM pour m'avoir initié aux différentes analyses biologiques utilisées lors de ce travail. A la qualité de leur formation, à leur patience devant mes faux pas et à leurs nombreux conseils pour m'aider à progresser.

Mes remerciements à François et Christian pour leur disponibilité et leur aide lors de l'analyse statistique des données.

Mes remerciements à Aurélie, Carole, Céline, Elisabeth, Marie-José, Maryse B et Maryse P, Pascale secrétaires en charge de la documentation et de l'administration. A leur suivi méthodique pour m'aider dans les tâches administratives et dans la recherche d'articles.

Mes remerciements à Karine D, Lucie, Iban, Gaïa, Eva, Karine R, Sara, Helene, Joël, Inge, Stéphane, Stéphanie, et aux personnes de l'unité d'Ecobiop pour leurs nombreux conseils.

Mes remerciements à Mathilde, Marie, Maridiane, Marine, et Anaïssa, pour leur motivation lors de leur stage d'études passé à mes côtés.

Aux joyeux acteurs de l'équipe de théâtre Agnès, Aurélie M, Aurélie T, Alexandre, Pascale, Christian, Jacques, Sabrina, et Séverine.

Mes remerciements à Anthony, Colin, Cynthia, Cyril, Ikram, Luis, Elisabeth, Sara, Elorri, Tengfei, Viviana, WeiWei, Samuel, Thérèse, Théo, Séverine, et Vanessa, Esmael, doctorants en Nutrition et en Microbiologie. A vos nombreux encouragements, votre écoute, et votre aide tout au long de la thèse.

A mes parents, pour leur soutien, leur patience, leur confiance et leur générosité.

A mes grands-parents, à Audrey, Julien, Mael et Leslie.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Liste des publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

Article publié :

Borey M, Panserat S, Surget A, Cluzeaud M, Plagnes-Juan E, Herman A, Lazzarotto V, Corraze G, Médale F, Lauga B, Burel C (2016). Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition. *Fish Physiology and Biochemistry* 42 (4): 1187-1202. doi: 10.1007/s10695-016-0208-4

Manuscrit en cours d'écriture:

Borey M, Aguire P, Panserat S, Plagnes-Juan E, Cluzeaud M, Médale F, Lauga B, Burel C. Long period response (48 Hours) of genes coding for proteins involved in the digestive process of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Fed a Single Meal

Borey M, Burel C, Paroissin C, Quillet E, Terrier F, Maunas P, Lauga B. Acute hypoxic challenge as an efficient test to reveal diverse adaptation strategies to fish meal and oil diet substitution by plant feedstuff in rainbow trout isogenic lines

Borey M, Rigal F, Burel C, Carbon A, Pennarun S, Quillet E, Terrier F, Lauga B. Disentangling the effect of full plant-based diet and host genotype on the diversity of mucosa microbiota using isogenic lines in the carnivorous rainbow trout

Borey M, Lauga B, Burel C, Geurden I, Médale F, Kerneis T, Labbe L, Terrier F, Sandres F, Quillet E, Dupont-Nivet M, Surget A, Pégourié P, Herman A, Aguirre P, Véron V, Cluzeaud M, Plagnes-Juan E. Impact of plant-based diets on the growth, feed utilization and digestive capacities of different isogenic lines of rainbow trout

## **Liste des communications dans des congrès nationaux et internationaux :**

Communications orales en congrès nationaux:

Borey, M, Carbon, A., Pennarun, S., Burel, C., Lauga, B. Déterminisme du génotype de truites arc-en-ciel sur son microbiota intestinale en fonction de son régime alimentaire. Septième colloque de l'AFEM «Association Française d'Ecologie Microbienne», 4-6 novembre 2015, Anglet, France.

Borey, M, Burel, C., Lauga, B. Effets de l'alimentation végétale sur les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du tractus gastro-intestinal et du microbiote associé chez la truite arc-en-ciel en fonction de son génotype. Séminaire aux journées Nem « Nutrition et Ecosystèmes Microbiens », 4 avril 2014. Clermont Ferrand, France.

Posters affichées en congrès internationaux et nationaux :

Borey M, Rigal F, Pennarun S, Carbon A, Dupond-Nivet M, Burel C, Lauga B. Diet and genetic background determine mucosa-associated microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). « Gut Microbiology, 20 years & counting... », 20-23 June 2016, Rowett, France.

Borey M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Cluzeaud M, Veron V, Surget A, Médale F, Lauga B, Burel C. Post-prandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of the composition of the diet. « Aquaculture Europe », 14-17 October 2014, San Sebastian, Spain.

Borey M, Rigal F, Pennarun S, Carbon A, Dupond-NIVET M, Burel C, Lauga B. L'alimentation et le génotype de l'hôte déterminent le microbiota associé à la muqueuse de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). « 5ièmes Journées de la Recherche Filière Piscicole JRFP », 5-6 juillet 2016, Paris, France.

Borey M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Veron V, Aguire P, Medale F, Lauga B, Burel C. Impacts de facteurs alimentaires sur le fonctionnement du tractus digestif chez la truite arc-en-ciel : indicateurs moléculaires et biochimiques. « JACI PHASE », 5-6 avril 2016, Tours, France.

# TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations .....	1
Introduction.....	3
1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	9
1.1 Aquaculture .....	9
1.1.1 Production aquacole.....	10
1.1.2 Réglementation sur l'usage de protéines d'origine animale.....	11
1.1.3 Réglementation sur l'utilisation d'antibiotiques .....	12
1.2 Physiologie de la truite autour de la nutrition .....	15
1.2.1 Ontogénie du système digestif.....	15
1.2.2 Recommandations nutritionnelles .....	19
1.2.3 Principales étapes de la digestion de la truite.....	20
1.2.4 Mesure de la digestibilité .....	25
1.3 Défis nutritionnels en aquaculture.....	26
1.3.1 Facteurs limitant l'incorporation des ingrédients végétaux dans les aliments pour poisson	26
1.3.2 Réponse des truites aux aliments végétaux .....	34
1.4 Stratégie d'adaptation des truites à l'alimentation végétale en mettant à profit leur variabilité génétique.....	41
1.4.1 Utilisation de lignées sélectionnées en élevage.....	41
1.4.2 Lignées isogéniques: un outil pour l'amélioration génétique .....	42
1.5 Le microbiote intestinal.....	45
1.5.1 Composition taxonomique du microbiote intestinal chez les poissons .....	46
1.5.2 Compartimentation du microbiote au sein du tube digestif de la truite .....	50
1.5.3 Stade de développement et évolution du microbiote .....	54
1.5.4 Fonctionnalité du microbiote intestinal .....	58
1.5.5 Variables capables de favoriser certaines espèces microbiennes .....	66
2 OBJECTIFS .....	73
3 MATERIEL ET METHODES .....	85
3.1 Matériel Biologique : la truite arc-en-ciel.....	85
3.2 Etudes préliminaires réalisées sur les truites conventionnelles .....	87
3.2.1 Protocole expérimental de suivi de cinétique de la transcription de gènes et de niveaux plasmatiques sur une période de 12h .....	87



3.2.2	Protocole experimental du suivi de cinétique de la transcription de gènes sur une période de 48h .....	88
3.3	Génétique et réponse au changement d'alimentation .....	89
3.3.1	Les lignées .....	89
3.3.2	L'alimentation .....	91
3.3.3	Etude de la transcription de gènes impliqués dans la digestion et l'absorption de nutriments .....	92
3.3.4	Etude du microbiote associé à la muqueuse digestive de l'intestin .....	94
3.3.5	Test « challenge hypoxique » : Effet de l'aliment et du génotype sur la physiologie de l'hôte	96
4	ARTICLE 1 : Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout ( <i>O. mykiss</i> ) and impact of diet composition.....	99
5	ARTICLE 2 : Long Period Response (48 Hours) of Genes Coding for Proteins Involved in the Digestive Process of Rainbow Trout ( <i>Oncorhynchus Mykiss</i> ) Fed a Single Meal .....	131
6	ARTICLE 3 : Acute hypoxic challenge as an efficient test to reveal diverse adaptation strategies to fish meal and oil diet substitution by plant feedstuff in rainbow trout isogenic lines	151
7	ARTICLE 4: Disentangling the effect of full plant-based diet and host genotype on the diversity of mucosa microbiota using isogenic lines in the carnivorous rainbow trout .....	185
8	ARTICLE 5: Impact of plant-based diet on the growth, feed utilization and digestive capacities of different isogenic lines of rainbow trout .....	233
9	DISCUSSION et PERSPECTIVES .....	293
9.1	Quels acteurs de la digestion et de l'absorption intestinale sont les plus impactés par le changement de régime alimentaire ? .....	295
9.1.1	Au stade alevin.....	295
9.1.2	Au stade juvénile.....	301
9.2	Quels sont les indicateurs d'écologie bactérienne potentiellement impliqués dans la bonne ou mauvaise aptitude des truites à répondre au changement de régime alimentaire.	304
9.2.1	Apport des lignées isogéniques pour déterminer l'impact de l'alimentation et du génotype sur les principaux indices de diversité .....	305
9.2.2	L'indice d'Eveness témoigne- t-il de l'aptitude des truites à tolérer une alimentation végétale ? .....	306
9.2.3	L'abondance de certains taxons particuliers peut-elle être évocatrice de leur implication dans l'aptitude des truites à bien répondre à une alimentation végétale ?.....	306
9.2.4	La mesure de $\beta$ -diversité peut-elle permettre d'identifier des individus plus aptes à tolérer une alimentation végétale ? .....	308

9.3	Quels caractères phénotypiques de la truite peuvent expliquer les dissimilarités observées entre les différentes communautés bactériennes.....	309
9.3.1	Le profil du mucus intestinal peut-il expliquer le profil des communautés bactériennes intestinales rencontrées sur la muqueuse de l'intestin des poissons ? .....	309
9.3.2	Des acteurs de l'immunité peuvent-ils expliquer le profil des communautés bactériennes intestinales rencontrées sur la muqueuse de l'intestin des poissons ? .....	310
9.4	Quels impacts fonctionnels peut avoir le changement de communauté bactérienne, provoqué par le changement d'alimentation, pour son hôte.....	312
9.4.1	Détermination de la contribution des acides gras libres à courte chaîne (SCFA) dans la réponse des truites au changement d'alimentation.....	312
9.4.2	Certaines bactéries du microbiote intestinal sont-elles impliquées dans l'homéostasie du cholestérol ?.....	313
9.4.3	Quels sont les bactéries de la communauté bactérienne présentes dans l'intestin qui sont métaboliquement actives ? .....	314
BIBLIOGRAPHIE .....		317

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution mondiale de la production de poisson issue de la pêche de capture et de l'aquaculture. Source (FAO) .....	11
Figure 2 : Photographie de larves de truite arc-en-ciel après éclosion .....	16
Figure 3: Diagramme représentant l'organisation de quatre systèmes digestifs types de poissons.....	17
Figure 4 : Coupe histologique d'estomac chez le poisson. ....	17
Figure 5 : Développement ontogénique du tractus digestif de la truite arc-en-ciel .....	18
Figure 6 : Schéma du tractus digestif de la truite arc en ciel ( <i>O. mykiss</i> ) au stade alevin et de ses organes associés.....	19
Figure 7 : Schéma représentant le mode d'obtention d'individu homozygote par gynogenèse mitotique.....	43
Figure 8 : Phyla bactériens rencontrés dans les communautés intestinales de 25 poissons ..	46
Figure 9 : Abondance des phyla bactériens rencontrés dans la lumière et sur la muqueuse intestinale de l'intestin distal de truites arc-en-ciel.....	48
Figure 10 : Abondance relative des principaux taxons bactériens (phyla et classes pour les Protéobactéries) observés sur la muqueuse de l'intestin de truites arc-en ciel au stade juvénile, nourries avec un aliment commercial .....	49
Figure 11 : Stratification de la muqueuse intestinale : microbiote associé au mucus intestinal .....	50
Figure 12 : Abondance des différents phylums bactériens observés dans le contenu intestinal de différents segments intestinaux chez la daurade .....	52
Figure 13 : Organisation spatiale du microbiote intestinal humain et facteurs modulant son implantation .....	53
Figure 14 : Assemblage de mucines (MUC2) de la couche de mucus externe et interne de l'intestin distal .....	59

Figure 15 : Structure chimique des principaux acides gras libres à courte chaîne (SCFA) synthétisés par les bactéries du microbiote intestinal. ....	64
Figure 16 : Chronologie des différentes expérimentations réalisées dans le cadre des travaux de thèse. ....	86
Figure 17 : Protocole d'élevage et de prélèvements de l'étude CINEDIG1 .....	88
Figure 18 : Protocole d'élevage et de prélèvements de l'étude CINEDIG2 .....	88
Figure 19 : Protocole d'obtention des lignées isogéniques mise en place par l'Unité Gabi du laboratoire INRA de Jouy-en-Josas, et par la pisciculture expérimentale de Sizun dans le Finistère .....	90
Figure 20 : Protocole d'élevage et de prélèvements pour les études de nutriginomique sur les lignées isogéniques de truites .....	92
Figure 21 : Méthodologie suivie dans le but de décrire le microbiote associé à la muqueuse de l'intestin distal des lignées isogéniques de truites de 10 mois en fonction de leur régime alimentaire .....	95

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Antibiotiques dont l'usage est approuvé chez les animaux aquatiques.....	14
Tableau 2: Caractéristiques des principales enzymes digestives.....	22
Tableau 3: Principaux facteurs antinutritionnels retrouvés dans les ingrédients alternatifs à la farine .....	29
Tableau 4 : Caractéristiques (en % de la MS) de la farine de poisson et des produits végétaux les plus utilisés comme sources protéiques dans les aliments aquacoles industriels en Europe. ....	32
Tableau 5 : Caractérisation du microbiote intestinal chez la truite arc en ciel élevée dans différentes conditions de température et de régime alimentaire.....	68
Tableau 6 : Formulation et composition des aliments distribués aux lignées de l'éclosion 2014.....	91

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AAI</b>	Acide aminé indispensable
AANI	Acide aminé non indispensable
ALA	Acide $\alpha$ -linoléinique
AESA	Autorité européenne de sécurité des aliments
ANR	Agence nationale de la recherche
APO-A1	Apolipoprotéine A1
APO-A4	Apolipoprotéine A4
APO-B	Apolipoprotéine B
ARA	Acide arachidonique
ATP	Adénosine triphosphate
<b>Bmal1</b>	Gène du rythme circadien
<b>CEE</b>	Communauté économique européenne
CNA	Conseil national de l'alimentation
CUD	Coefficient d'utilisation digestive
CVM	Center for Veterinary Medicine
<b>DGAL</b>	Direction générale de l'alimentation
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DHA	Acide docosahexaénoïque
D6D	Delta 6 desaturase
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
EPA	Acide eicosapentaénoïque
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
<b>GEV</b>	Genomic estimated breeding value
GLUT2	Glucose transporter 2
GPR41 G	G protein-coupled receptor 41
GPR43 G	G protein-coupled receptor 43
GWAS	Genome-wide association study

<b>Ifremer</b>	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
<b>INRA</b>	Institut national de la recherche agronomique
<b>LC-PUFA</b>	Long chain polyunsaturated fatty acid
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MTP</b>	Microsomal transfer protein
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>MUC1</b>	Mucine 1
<b>MUC2</b>	Mucine 2
<b>MUC3</b>	Mucine 3
<b>NRC</b>	National Research Council
<b>OECD</b>	Organisation de coopération et de développement économiques
<b>OTU</b>	Operational taxonomic unit
<b>PAT</b>	Protéines animales transformées
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PepT1</b>	Peptide transporter 1
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>PROSPER</b>	PROcédure de Sélection individuelle optimisée Par Epreuves Répétées
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated fatty acid
<b>QTL</b>	Quantitative trait loci
<b>RVD</b>	Récepteur vitamine D
<b>SCFA</b>	Short-chain fatty acid
<b>SGLT1</b>	Sodium-glucose transporter 1
<b>SNP</b>	Single-nucleotide polymorphism
<b>SYSAAF</b>	Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français
<b>TCR</b>	Translational Cancer Research
<b>TFF3</b>	Trefoil factor family peptide 3
<b>TGGE</b>	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
<b>TLR</b>	Toll-like receptors
<b>UE</b>	Union européenne

## INTRODUCTION

La hausse de l'effectif de la population mondiale, ainsi que l'augmentation de la consommation moyenne de poissons par habitant, suite à l'amélioration de la qualité de vie des personnes des pays en voie de développement, a engendré une explosion de la demande en poissons. Pour répondre à ce besoin, et pour préserver les ressources marines, l'aquaculture mondiale a connu depuis ces 30 dernières années un fort développement. Cet élevage de poissons carnivores et omnivores nécessite de distribuer aux poissons des aliments dont la composition est en adéquation avec leurs besoins nutritionnels. Une alimentation idéale, d'un point de vue nutritionnel, serait composée de petits poissons sauvages issus de la pêche en mer.

Cependant, tout comme la pêche, dont les captures sont destinées à l'alimentation humaine, la pêche minotière qui approvisionne le secteur de l'aquaculture en harengs, sardines, anchois, merlans bleus, chinchards et maquereaux est également soumise à des quotas. Il a donc été nécessaire de modifier la composition des aliments pour les poissons carnivores d'élevage, en diminuant leur teneur en farines et huiles de poisson, qui étaient jusqu'ici les principaux pourvoyeurs de protéines, acides aminés indispensables et acides gras oméga-3 de type DHA (acide docosahexaénoïque) et (EPA) acide eicosapentaénoïque. Jusqu'en 2001, les taux d'incorporation de farines et huiles de poisson n'ont pas beaucoup évolués (30-40% et 15-25%, respectivement) dans les aliments aquacoles, puis une baisse a été initiée et elle s'est accentuée au fil des années. En 2011, il ne restait plus que de 10 à 15% de farine de poisson et de 10 à 12% d'huile de poisson dans les aliments des espèces de poisson dites carnivores (Médale et al, 2013; Burel et Médale, 2014)

Du fait de leur disponibilité et de leur coût accessible, les végétaux sont devenus la principale source de protéines et d'huiles pour les poissons carnivores d'élevage, et permettent d'assurer le développement d'une aquaculture durable. Cette substitution des farines et des huiles de poisson par des farines et huiles d'origine végétale est cependant limitée par les capacités d'adaptations physiologiques des poissons carnivores à de tels régimes. Malgré des taux de substitution croissants, ces poissons acceptent rarement des aliments totalement dénués de farines et d'huiles de poisson. La prise alimentaire, la mortalité en période d'alevinage, et la croissance étant les principaux paramètres zootechniques impactés par cette substitution. Pour améliorer leur tolérance, la fabrication



d'aliments pour poissons a inclus des procédés de transformation des végétaux tel que le dépelliculage, la cuisson, l'extrusion<sup>1</sup>, l'extraction alcoolique, la maturation enzymatique, etc. Ces procédés permettent en effet de concentrer la teneur en protéines des farines végétales en éliminant le maximum de fibres, de diminuer leur teneur en facteurs antinutritionnels, de rendre leurs composés alimentaires plus digestibles, notamment les glucides et enfin d'améliorer leur palatabilité.

De nouvelles stratégies de sélection de poissons d'élevage basées sur leur aptitude à grandir lorsqu'ils sont alimentés avec des farines et des huiles de poisson sont également mises en place par le syndicat des sélectionneurs avicoles et aquacoles français (SYSAAF). L'objectif étant de proposer aux éleveurs, des poissons capables de grandir sous une alimentation végétale tout en maintenant un état de robustesse suffisant face aux principales maladies.

Les mécanismes biologiques à l'origine des baisses de performances zootechniques observées chez les truites nourries avec des farines et des huiles d'origine végétale sont nombreux : diminution de la prise alimentaire, forte mortalité observée en stade alevin, perturbation du métabolisme énergétique, augmentation du turnover protéique musculaire par autophagie, détérioration de la croissance musculaire et des capacités digestives. Des états d'inflammation intestinale sont parfois observés chez les salmonidés alimentés avec des farines végétales. Enfin, la substitution des aliments provoque une modification des communautés bactériennes intestinales, mais les conséquences fonctionnelles, bien que suspectées, restent encore méconnues. Chez les mammifères comme chez les poissons, le microbiote intestinal contribue à la maturation intestinale, et assure une protection contre l'implantation de bactéries pathogènes. Il pourrait donc être impliqué dans la tolérance aux végétaux chez certains poissons carnivores.

Afin de proposer aux truites des aliments alternatifs qui favorisent une croissance proche de celle observée lorsqu'elles bénéficient d'un régime traditionnel à base d'huiles et de farines de poisson, il est primordial de comprendre les mécanismes biologiques qui expliquent les baisses de performances observées. Ils se manifestent par une baisse de l'ingestion, des perturbations du métabolisme énergétique et de la cholestérolémie, une

---

<sup>1</sup> Le procédé d'extrusion, développé par Atkinson en 1970, consiste à faire passer de la farine déshuilée et

baisse de la croissance musculaire et augmentation de sa protéolyse, des détériorations des processus de digestion et d'absorption, et des modifications du microbiote intestinal. Ces indicateurs sont suivis lors de changement de formulation ou de stratégie alimentaire. Leur meilleure compréhension est importante, car elle permet d'adapter les formulations alimentaires, et d'orienter la transformation des matières premières. Il est en effet important de diminuer dans les aliments pour truites certains ingrédients ou composés d'origine végétale qui leur sont délétères et nuisent à leur croissance. L'amélioration des performances de croissance des truites en aquaculture peut également se faire par la sélection d'individus qualifiés bons répondants aux aliments végétaux.

Afin de mieux comprendre les relations entre les performances de croissance de l'hôte, ses capacités physiologiques digestives, son microbiote intestinal et le régime alimentaire, nous avons choisi d'étudier l'effet de deux régimes alimentaires différents : un régime totalement à base de farines et d'huiles végétales par opposition à un régime marin riche en farines de poisson et en huile de poisson. Cette étude a débuté par deux études préliminaires ayant pour objectif d'augmenter nos connaissances sur le fonctionnement du tractus digestif de la truite arc-en-ciel, puis le corps du travail a porté plus précisément sur les capacités digestives et sur le microbiote associé à la muqueuse digestive de l'intestin distal, chez trois lignées isogéniques de truites arc-en-ciel, identifiées comme divergentes dans leur réponse à l'alimentation végétale. L'utilisation de lignées isogéniques doit minimiser les variations inter-individus, sources de facteur confondant dans les analyses et doit permettre d'évaluer l'importance du bagage génétique. Finalement, un déterminisme génétique de l'hôte sur la nature du microbiote se traduirait, pour chaque régime donné, par une faible variation intra-lignée, et par une forte variation inter-lignée. L'étude a porté sur la réponse des truites élevées depuis leur premier repas, avec l'un et l'autre des deux régimes, au stade alevin et au stade juvénile.

Cette thèse fait partie du projet AgreeFish, débuté le 1<sup>er</sup> mars 2014, et qui est un projet ANR commun entre plusieurs équipes de recherches françaises. L'objectif global de ce projet est d'apporter des recommandations en faveur de l'adaptation des poissons carnivores à l'inévitable transition alimentaire, en utilisant comme modèles d'étude, des lignées isogéniques de truites arc-en-ciel, dont les performances sont contrastées, et des lignées de truites arc-en-ciel sélectionnées sur leur meilleure utilisation de l'aliment végétal. Le but de ce projet étant de comprendre les mécanismes adaptatifs de la truite à court et long terme à un régime 100 % végétal. Les mécanismes biologiques plus particulièrement observés étant l'étude des neurotransmetteurs impliqués dans la prise alimentaire, le

microbiote digestif, les capacités de digestion, l'histologie du tube digestif, le transcriptome présent dans l'intestin, le foie et le cerveau, la réponse au stress et aux agents infectieux. Le but étant de disposer d'indicateurs phénotypiques ou génomiques pour améliorer l'efficacité de sélection des truites, et de disposer d'une population à la fois apte à croître sous une alimentation végétale, et robuste face à des changements touchant son environnement.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



# 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1 Aquaculture

Les premières domestications et élevages du poisson sont datés au IV<sup>e</sup> millénaire avant J-C en Egypte et en Chine, avec la production de carpes et de tilapias. En Europe, l'installation de la première écloserie date de 1741, l'intensification de l'élevage ne s'étant développé qu'à partir des années 1960 grâce à la fourniture d'aliments composés pour poissons. L'aquaculture se définit comme l'élevage d'organismes aquatiques dans les zones côtières et intérieures, appelant une intervention dans le processus d'élevage en vue d'en améliorer la production. L'aquaculture s'est diversifiée à tel point que, de nos jours, environ 600 espèces aquatiques sont produites dans 190 pays. L'aquaculture est pratiquée aussi bien par des paysans très pauvres dans les pays en voie de développement que par des entreprises multinationales. Au niveau mondial, la majorité de la production (88 % en quantité en 2010) est assurée en Asie, la Chine y contribuant en majeure partie, suivie par l'Inde, le Vietnam, l'Indonésie, le Bangladesh, la Thaïlande, le Myanmar, les Philippines, et le Japon (FAO 2012a). A titre comparatif, avec une croissance annuelle à 2,9 % (FAO 2014), sur cette même année, la production européenne a représenté 4,3 % de la production mondiale, la truite arc-en-ciel y contribuant à hauteur de 14 % (Justino et al. 2016). La Norvège est le principal pays à l'origine de cette croissance, mais l'Espagne, la France, le Royaume-Uni, la Grèce et l'Italie font également partie des principaux producteurs européens (FAO 2014). Les cyprinidés (essentiellement les carpes) dominent la production aquacole mondiale, suivis par les cichlidés (tilapias), les siluriformes (dont le pangasius), et les salmonidés (saumons atlantiques et truites arc-en-ciel) (FAO 2012b; Burel and Medale 2014). En France, la truite arc-en-ciel représente environ 68% de la production aquacole. La production de poissons est dominée par les poissons d'eau douce, qui représentent 63 % de la production mondiale, tous secteurs aquacoles confondus (FAO 2015; Lynch et al. 2016). Bien que l'aquaculture européenne dénombre plus de 70 espèces de poissons différentes, la truite arc-en-ciel, le saumon, la daurade, le bar et la carpe représentent 90 % de la production totale. La pisciculture d'eau douce est dominée par la truite arc-en-ciel, sa production ayant connu une croissance entre les années 1980 et 2000, puis une chute

jusqu'en 2012. Le déclin de sa production étant attribué aux difficultés financières engendrées par les réglementations environnementales (FEAP 2014; Bostock et al. 2016).

Originaire de la côte ouest de l'Amérique du Nord, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), tout comme la truite commune (*Salmo trutta*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*), est un genre de la sous-famille des salmonidés. Sa dénomination provient de son port d'une bande longitudinale irisée sur les flancs, la coloration générale du corps étant très variable suivant le stade considéré. La maîtrise de son élevage, de sa reproduction, ainsi que sa tolérance à de fortes densités (biomasse maximale de 35 kg/m<sup>3</sup> autorisée par la commission européenne en 2010), sous réserve d'une bonne oxygénation de l'eau, ont rendu possible l'intensification de sa production. Cette tolérance des truites, à de fortes densités, autorise des modes de production extensive, semi-intensive ou intensive. Par sa caractéristique anadrome, la truite arc-en-ciel peut être élevée en eau douce comme en eau de mer. Depuis les années 1992, la production de truites de mer a connu une forte croissance par rapport à celle d'eau douce, notamment au Chili et en Norvège, où des sites maritimes sont à la fois accessibles et favorables à l'élevage en cage. Le préférendum de température de la truite arc-en-ciel autour de 10° à 16°C rend sa survie et son exploitation possibles en France. L'introduction de la truite arc-en-ciel a débuté en 1879, en France, à partir d'individus issus d'une pisciculture de Californie située sur la rivière Mc Could, et a ensuite été suivie de nombreuses autres introductions avec pour perspective le développement de la pêche amateur et de son élevage aquacole (Keith and Dorson 2003; Jalabert and Fostier 2010).

### **1.1.1 Production aquacole**

Lors des trente dernières années, la production de poissons issue de l'aquaculture et destinée à l'alimentation humaine n'a cessé de se développer (Figure 1). Avec sa croissance mondiale annuelle de 8,6 %, de toutes les sources de protéines d'origine animale, l'aquaculture est le secteur qui a connu la plus forte progression (Allison 2011; FAO 2014).

De nos jours, la moitié de la consommation humaine de poissons provient de l'aquaculture (Troell et al. 2013; FAO 2014). Cet équilibre, entre production de poissons issus des produits de la pêche et ceux issus de l'aquaculture devrait prochainement disparaître. Effectivement, une augmentation de 35 % de la production aquacole est attendue d'ici les années 2022, contre 5 % pour les produits de la pêche. (Natale 2012; OECD/FAO 2013; Toufique and Belton 2014). Assurer une croissance de l'aquaculture apparaît comme

l'unique moyen de répondre à la demande toujours plus forte de poissons (Lee and Yoo 2014). La consommation annuelle moyenne de poissons par habitant a en effet doublé lors des 50 dernières années, passant de presque 10 kg par habitant dans les années 1960 à presque 19 kg en 2010 (FAO 2014).

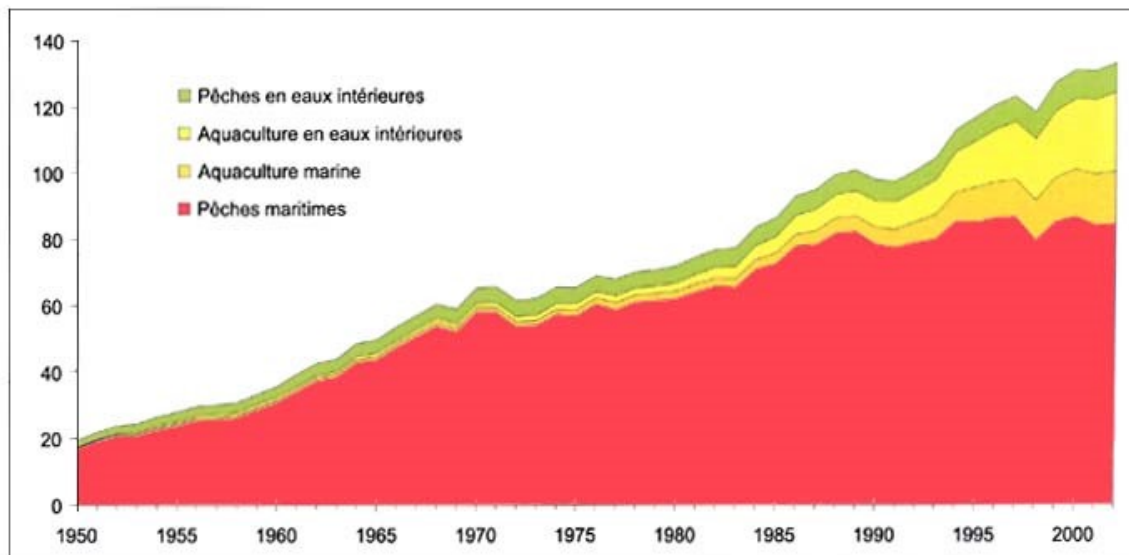


Figure 1 : Evolution mondiale de la production de poisson issue de la pêche de capture et de l'aquaculture.  
Source (FAO)

Bien qu'elle soit mise en avant pour sa capacité à préserver les ressources marines, l'aquaculture n'en demeure pas moins dépendante des poissons issus de la pêche. Les poissons carnivores et omnivores ayant besoin de protéines et d'huiles de haute valeur nutritive pour leur croissance (Troell et al. 2014). Les harengs, sardines et maquereaux pêchés en mer et destinés à la production d'aliments pour poissons constituent la pêche minotière. Comme la pêche conventionnelle, la pêche minotière est elle aussi soumise à des quotas pour éviter l'épuisement des ressources marines. Dès lors, étant donné le plafonnement des pêches minotières et l'augmentation de la production aquacole, un déficit en farine de poissons destinée aux aliments aquacoles s'est installé depuis les années 1970.

### 1.1.2 Réglementation sur l'usage de protéines d'origine animale

Le déficit en farines de poisson, dû aux quotas imposés sur la pêche minotière, nécessite de nourrir les poissons carnivores et omnivores avec des ingrédients alternatifs. Les protéines d'origine animale pourraient être utilisées en substitution, pourtant elles sont encore peu utilisées en aquaculture, notamment pour des raisons de réglementation. Cependant, la législation évolue et elles pourraient bientôt être incorporées dans les



aliments pour poissons. Les protéines animales transformées (PAT) sont définies par l'annexe I du règlement (UE) n°142/2011 en tant que protéines animales issues entièrement de matières de catégorie 3 (y compris les farines de sang et les farines de poisson) et transformées de manière à pouvoir être utilisées directement en tant que matières premières pour aliments d'animaux. Les sous-produits d'animaux étant des matières animales ou d'origine animale qui ne sont pas destinées à la consommation humaine. Parmi ces sous-produits, ceux de la catégorie 3 ne présentent aucun risque spécifique et regroupent des matières issues d'animaux sains, c'est-à-dire d'animaux issus de la chaîne alimentaire conventionnelle, abattus à des fins d'alimentation humaine, mais dont certains morceaux ne sont pas consommés pour des raisons commerciales (morceaux non nobles, pieds d'animaux tels que les pieds de porc, aspect visuel, etc.). Il ne faut pas confondre les PAT avec les farines animales issues de cadavres d'animaux jugés impropres à la consommation alimentaire.

En 2013, le comité permanent de la chaîne alimentaire de la Commission Européenne a voté pour la réintroduction des PAT des non ruminants dans l'alimentation des animaux d'aquaculture. Les protéines hydrolysées d'insectes sont maintenant autorisées par la Commission Européenne, dans l'alimentation des animaux d'élevage. L'AESA (Autorité européenne de sécurité des aliments, EFSA) a émis un avis scientifique le 5 octobre 2015 sur les risques inhérents à l'utilisation des insectes dans l'alimentation animale (CNA 2011; DGAL 2016). Une liste d'insectes autorisés a été définie en alimentation animale. Celle-ci comprend actuellement la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*), la mouche domestique (*Musca domestica*), le ténébrion meunier (*Tenebrio molitor*), le petit ténébrion mat (*Alphitobius diaperinus*), le grillon domestique (*Acheta domesticus*), le grillon domestique tropical (*Grylloides sigillatus*), et le grillon des steppes (*Gryllus assimilis*). Il est donc possible que dans les années à venir, de la farine d'insectes soit incluse dans la formulation des aliments pour poissons carnivores.

### **1.1.3 Réglementation sur l'utilisation d'antibiotiques**

Le secteur de l'aquaculture n'est pas seulement confronté à un défi d'ordre nutritionnel, mais également d'ordre sanitaire. Le recours excessif aux antibiotiques est problématique dans le secteur de l'aquaculture, et tout particulièrement dans les pays en voie de développement. En général, les antibiotiques sont incorporés dans les aliments et distribués aux poissons élevés en systèmes semi-intensifs et intensifs de façon préventive dans le but de traiter, voire d'empêcher l'apparition des fréquentes infections bactériennes,

qui se manifestent lors de forte densité en poissons, de teneur réduite en oxygène, et de forte concentration en ammoniac. Cet usage intensif d'antibiotiques dans les aliments pour poissons est préoccupant car il favorise le développement de populations bactériennes aux multiples résistances aux antibiotiques (Ottinger et al. 2016). Des règles de bonnes conduites régulent pourtant leur utilisation. Toutes productions animales confondues, le plan national Ecoantibio mis en place en 2012 par le ministère de l'agriculture, a donné pour objectif de réduire de 25 % en cinq ans l'exposition des animaux aux antibiotiques (synthèse Ecoantibio). Auparavant, en aquaculture, certaines classes d'antibiotiques incluant le chloramphénicol et les nitrofuranes étaient déjà interdites d'utilisation, depuis l'instauration du règlement (CEE) n° 2377/90 du conseil du 26 juin 1990, pour des raisons de sécurité alimentaire. Les seuls antibiotiques autorisés en Europe sont les tétracyclines, pénicillines, quinolones, sulfonamides et triméthoprimes. De plus, un seuil est imposé sur la quantité de résidus d'antibiotiques acceptable dans les produits d'origine animale.

Mais malgré ces restrictions imposées par la directive EC37/2010 de la commission européenne, des résidus de macrolide, ivermectine, imidazole, oxytétracycline, chloramphénicol, et de quinolone ont néanmoins été détectés dans des produits d'aquaculture (Justino et al. 2016). Etant donné ces pratiques irraisonnées, des bactéries multirésistantes aux antibiotiques ont finalement été retrouvées dans les piscicultures et dans leurs alentours (Aly and Albutti 2014).

Aux Etats-Unis, l'utilisation et la délivrance des antibiotiques destinés aux poissons d'aquaculture sont régis par la FDA (Food and Drug Administration) du CVM (Centre for Veterinary Medicine). L'administration d'antibiotiques est considérée comme illégale lorsqu'elle est délivrée aux animaux destinés à la consommation humaine de façon contraire aux recommandations prodiguées par la FDA. Le nombre d'antibiotiques approuvé par la FDA chez les espèces aquatiques est faible en comparaison de celui défini chez les bovins, porcins, ou chez les volailles. Par conséquent, de nombreuses maladies propres aux poissons ne disposent d'aucun traitement autorisé ( Tableau 1) (Storey 2005).

Tableau 1: Antibiotiques dont l'usage est approuvé chez les animaux aquatiques

Antibiotique	Espèce	Indications
Formalin	Poisson à nageoires	Contrôle des protozoaires externes et des trématodes
	oeufs	Contrôle des champignons ( <i>Saproleginaceae</i> )
Oxytetracycline	Salmonidés	Contrôle des ulcères provoqués par <i>Hemophilus piscium</i> , des furonculoses causées par <i>Aeromonas salmonicida</i> , des hémorragies bactériennes causées par <i>A. liquefaciens</i> , et des maladies à <i>Pseudomonas</i>
	Poisson-chat	Contrôle des septicémies hémorragiques bactériennes causées par <i>A. Liquefaciens</i> et des maladies à <i>Pseudomonas</i>
Sulfadiméthoxine	Salmonidés	Contrôle des furonculoses provoquées par <i>Aeromonas salmonicida</i>
	Poisson-chat	Contrôle des septicémies entériques provoquées par <i>Edwardsiella ictaluri</i>
Sulfamerazine	Truite arc-en-ciel	Contrôle des furonculoses

Source : (Storey 2005)

Le recours à l'antibiothérapie a néanmoins fortement diminué en Europe. Par exemple, en Norvège, son recours en salmoniculture (saumons et truites) est négligeable depuis dix ans en raison de l'amélioration des campagnes de vaccination. Les chiffres parlent d'eux même, les norvégiens ont produit 23 fois plus de saumons et de truites en 2004 qu'en 1985, et utilisé 25 fois moins d'antibiotiques lors de cette même période (Consensus Steering Committee).

## **1.2 Physiologie de la truite autour de la nutrition**

Selon la nature de leur régime alimentaire, les poissons peuvent être classés comme détritivores, herbivores, omnivores, ou carnivores. Les espèces détritivores se nourrissent de débris animaux et de végétaux, les espèces herbivores se nourrissent exclusivement ou presque de plantes, les espèces omnivores se nourrissent à la fois d'aliments d'origine animale et végétale, tandis que les espèces carnivores, comme la truite arc-en-ciel, consomment de la chair ou des tissus d'animaux vivants ou morts. Au sein de chacune de ces catégories, si leur nourriture est très, modérément, ou peu variée, les poissons sont caractérisés respectivement comme euryphages, sténophages, ou monophages (Moyle 1982). Les espèces euryphages ont des régimes alimentaires variés, les espèces sténophages ont un régime alimentaire étroit et spécialisé, tandis que les espèces monophages ne se nourrissent que d'un seul type d'aliment, qu'il soit végétal ou animal. Les truites font parties des poissons euryphages, et acceptent donc des régimes alimentaires larges à base de différents ingrédients. Cette caractéristique peut alors être exploitée lors des formulations alimentaires, en choisissant d'incorporer dans les rations pour truite différents ingrédients ayant un moindre impact environnemental. En effet les quotas imposés sur les produits de la pêche minière implique de nourrir les truites avec des ingrédients différents de ceux qui étaient traditionnellement utilisés en aquaculture, à savoir la farine et l'huile de poisson, sous réserve que l'aliment proposé soit adapté aux besoins nutritionnels de la truite.

### **1.2.1 Ontogénie du système digestif**

A l'opposé des poissons 'agastic' sans estomac, la truite fait partie des poissons 'altricial' dont l'estomac se développe et devient fonctionnel lors du stade larvaire. Le tractus digestif de la truite se développe progressivement chez la larve à partir d'un court tube rectiligne et fermé au niveau de ses deux orifices : la bouche et l'anus. La larve puise ses réserves énergétiques au niveau de son sac vitellin avant l'ouverture de la bouche et le début de la prise alimentaire (Figure 2). Le contenu du sac vitellin est riche en acides aminés libres, protéines, glycogène et lipides (Mellinger 1995).



Figure 2 : Photographie de larves de truite arc-en-ciel après éclosion

Source: Berdan [http://www.nikonsmallworld.com/images/galleries/2010/main/HM\\_Berdan\\_18164\\_1.jpg](http://www.nikonsmallworld.com/images/galleries/2010/main/HM_Berdan_18164_1.jpg)

Le tractus digestif final des truites juvéniles est segmenté et constitué de cellules différenciées (Figure 3). Au début de l'ingestion, suite à l'ouverture de la bouche, le tractus digestif est constitué d'un bucco-pharynx, d'un œsophage, d'une ébauche d'estomac, d'un intestin proximal, d'un intestin distal et d'un anus. L'intestin proximal étant séparé de l'intestin distal par un muscle sphinctérien. A partir du premier repas, le système digestif s'allonge et s'invagine dans la cavité abdominale, conduisant à une augmentation de la durée du transit intestinal (Figure 5). Les villosités intestinales et la bordure en brosse des entérocytes se développent, conduisant à une augmentation de la surface d'absorption intestinale. L'épaisseur de l'intestin augmente via le développement musculaire de la muqueuse entourant la couche d'épithélium intestinal (Ronnestad et al. 2013). Suite à ce premier repas, l'épithélium de l'estomac se différencie, les glandes de la muqueuse de l'estomac se développent à partir du 20<sup>ième</sup> jour suivant l'éclosion (Sarieyyüpoğlu 2000), ce qui permet l'instauration d'une première phase de digestion gastrique (Figure 4). Avant que l'estomac ne soit fonctionnel, chez la larve, la digestion est assurée par les enzymes pancréatiques active à pH basique et secrétées dans l'intestin (Zambonino-Infante et al. 2008).

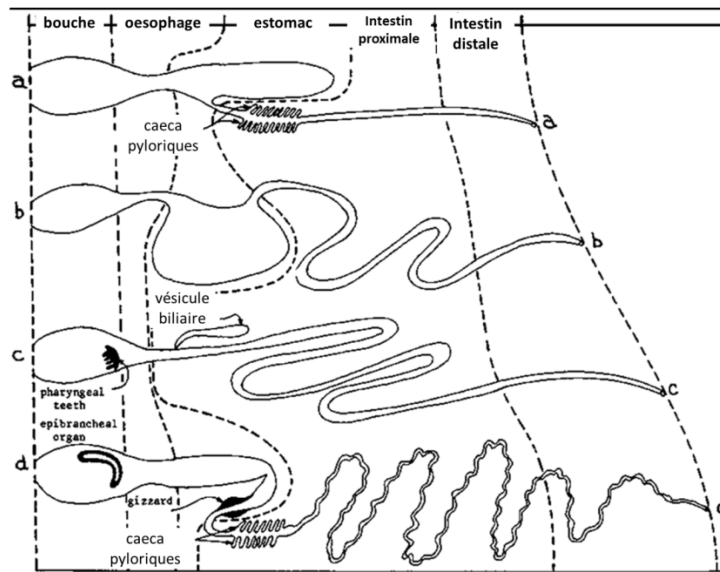


Figure 3: Diagramme représentant l'organisation de quatre systèmes digestifs types de poissons

- (a) Euryphage carnivore (saumon, truite, morue, morue charbonnière, flétan)
- (b) Euryphage omnivore (catfish, tilapia),
- (c) Euryphage omnivore (carpe, goldfish),
- (d) Sténophage planctivore.

Source : (Smith 1989)

Le développement des glandes de l'estomac met donc un terme au mode de digestion larvaire. La sécrétion d'acide et de pepsinogène dans la lumière de l'estomac s'établit progressivement suite à l'apparition de ces glandes (Douglas et al. 1999; Darias et al. 2005).

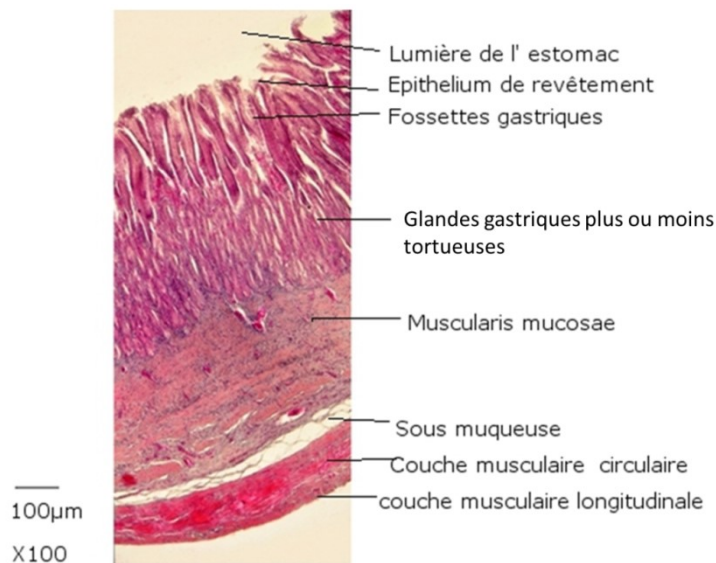


Figure 4 : Coupe histologique d'estomac chez le poisson.

Source : Mikroskopia

Les caeca pyloriques se mettent en place entre l'extrémité postérieure de l'estomac et antérieure de l'intestin. En tant qu'organes de digestion et d'absorption, leur présence augmente le volume de l'intestin et la surface d'absorption intestinale. Chez la truite, le pancréas exocrine est diffus, et se met en place au niveau des tissus qui entourent les caeca pyloriques et autour du foie (Sahlmann et al. 2015). La maturation des entérocytes, en plus d'avoir lieu via le développement des microvillosités, se fait également par l'insertion d'enzymes peptidiques (aminopeptidase N) sur cette bordure en brosse, ce qui est indicateur d'un mode de digestion mature (Zambonino-Infante et al. 2008). Après cette étape de métamorphose, il y a peu de changements morphologiques au niveau du système digestif, en dehors du turnover cellulaire, du développement et de la desquamation continue des villosités intestinales.

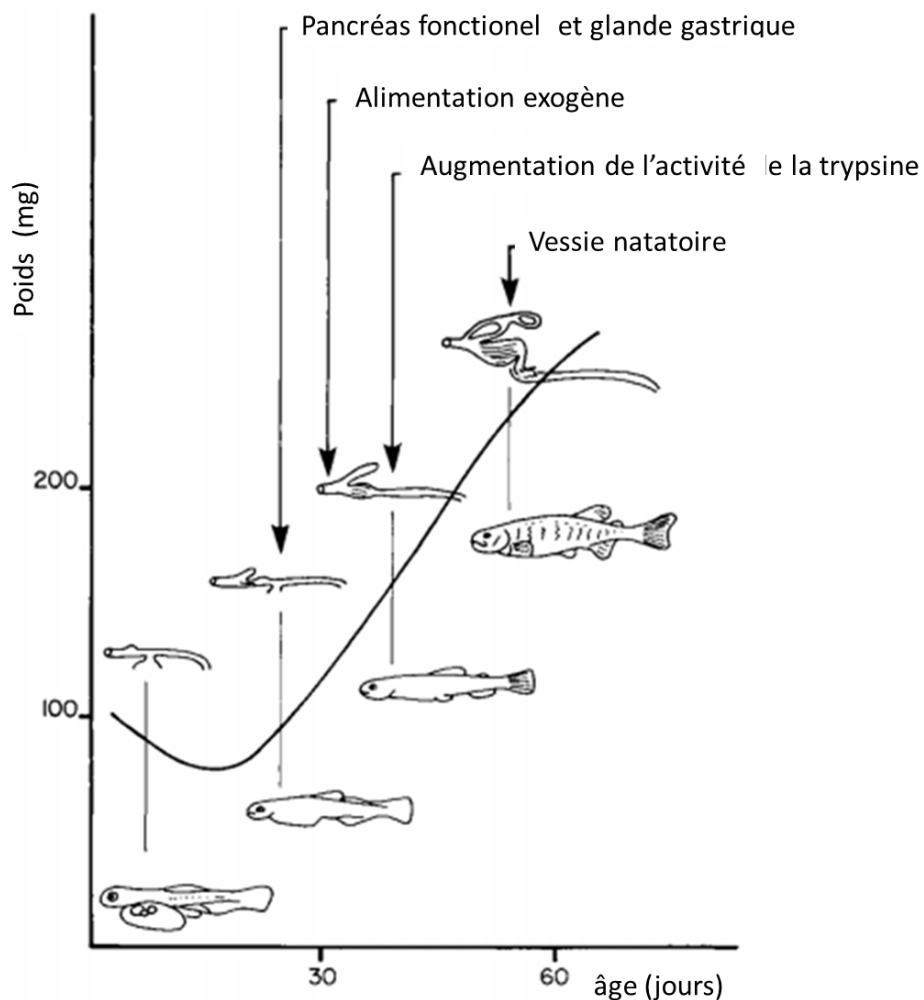


Figure 5 : Développement ontogénique du tractus digestif de la truite arc-en-ciel  
Source : (Dabrowski 1984b)

Chez la truite juvénile, l'appareil digestif est constitué d'un estomac qui débouche dans les caeca pyloriques, puis d'un intestin proximal et d'un intestin distal. Le foie et sa vésicule biliaire sont reliés à l'intestin proximal, ce qui permet la sécrétion de bile dans le chyme intestinal (Figure 6).

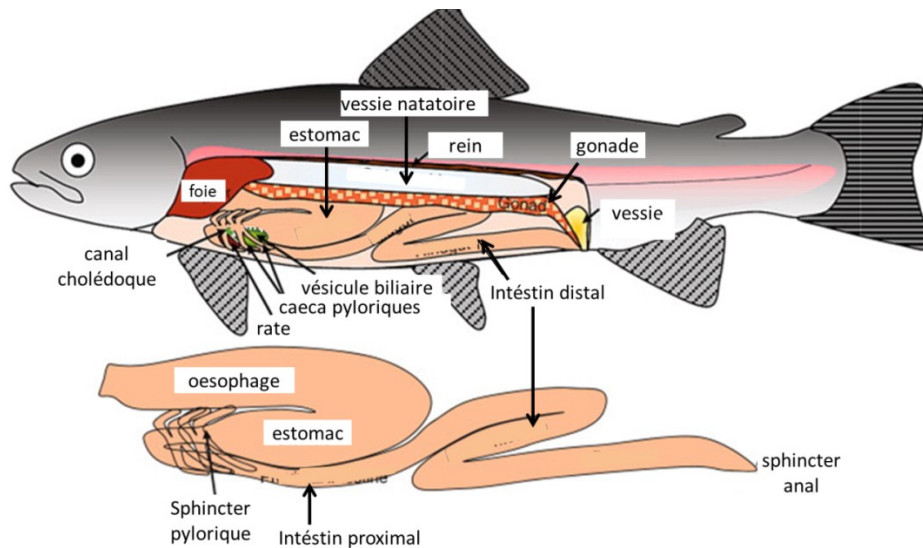


Figure 6 : Schéma du tractus digestif de la truite arc en ciel (*O. mykiss*) au stade alevin et de ses organes associés.

Source : (Olssen 2011)

### 1.2.2 Recommandations nutritionnelles

Compte tenu des faibles capacités de la truite arc-en-ciel à utiliser les glucides alimentaires (Médale et Guillaume 1999), les rations qui lui sont distribuées doivent être riches en protéines et en lipides. Les recommandations nutritionnelles pour la truite quant à la teneur en protéines, lipides, glucides et minéraux, ainsi qu'en acides aminés, triglycérides, et phospholipides sont disponibles dans un document produit par le « National Research Council » américain (NRC 2011). En production, les protéines doivent représenter de 38 à 44 % de la ration durant la phase de croissance. Les sources protéiques doivent apporter les 10 acides aminés indispensables (AAI), qui, à l'exception de l'arginine, sont les mêmes chez les poissons et chez les mammifères. Chez les poissons deux acides aminés semi-indispensables ne peuvent être synthétisés qu'à partir d'AAI : la cystéine et la tyrosine. La rétention azotée est généralement optimale lorsque l'apport est réparti à parts égales (ratio 46/54) entre AAI et acides aminés non indispensables (AANI) (Green et al. 2002).



Pour répondre à ces besoins, les poissons étaient nourris avec des aliments riches en farines de poisson, qui sont des farines animales obtenues à partir des produits de la pêche minotière provenant essentiellement du Chili, et à partir de la récupération des déchets de l'industrie du poisson destiné à l'alimentation humaine. Leur obtention nécessite 5 étapes de transformation : 1) tout d'abord la cuisson des poissons conduit à la coagulation des protéines qui sont récupérées dans une farine et dissociées de l'eau et des huiles obtenues, 2) ensuite, le pressage permet de réduire la teneur en liquide de la farine, le produit obtenu étant appelé un gâteau de presse, 3) les fractions liquides issues du pressage sont décantées pour recueillir des suspensions solides et par un procédé de centrifugation les huiles sont séparées des eaux, 4) l'évaporation des eaux conduit à l'obtention d'un concentré de protéines qui sera ajouté au gâteau avec les matières solides obtenues lors de la décantation, 5) enfin, le séchage et le broyage du gâteau permettent d'obtenir la farine de poisson.

La rétention protéique de la farine de poisson est élevée chez les poissons qui sont des convertisseurs très efficaces des aliments. Pour remplacer les farines de poisson, différentes farines végétales sont mélangées pour obtenir des farines dont les apports nutritionnels se complètent afin de couvrir au mieux les besoins en AAI et AANI. Les taux d'incorporation des farines végétales ont augmenté, à tel point qu'en 2011, les farines de poisson ne représentaient plus que de 10 à 15 % des farines utilisées dans les aliments industriels pour poissons carnivores (Burel and Medale 2014).

### **1.2.3 Principales étapes de la digestion de la truite**

#### **1.2.3.1 Phase stomacale**

La phase de digestion gastrique constitue la première phase de la digestion des aliments avalés. Sa durée est plus ou moins longue suivant l'espèce de poisson, l'âge du poisson, la température des bassins et la nature de l'aliment distribué. Par exemple, sur des truites de 96 g nourries à hauteur de 3,4 % du poids vif, l'évacuation du contenu stomacal débute quatre heures après le repas, le quart des nutriments ingérés a été libéré dans l'intestin au bout de huit heures, et la totalité de l'estomac est vide au bout d'une journée (Windell and Norris 1969). Il a été constaté que la substitution de la farine de poisson par de la farine végétale allonge la durée de la phase gastrique chez la truite (Yamamoto et al. 1988).

La digestion des lipides et des protéines débutent dans la lumière de l'estomac via l'activité de la lipase gastrique et de la pepsine. La pepsine étant synthétisée sous forme de précurseur inactif, le pepsinogène, dans les cellules principales de l'estomac. La pepsine agit principalement sur les liaisons peptidiques engageant des acides aminés aromatiques ou des diacides (Márquez et al. 2013).

La digestion dans l'estomac n'assure pas seulement une émulsification et une hydrolyse des lipides en diglycérides, monoglycérides ainsi qu'en acides gras libres, elle provoque une cascade d'informations qui active le système digestif. L'arrivée dans le duodénum d'acides gras libres stimule le processus de sécrétion pancréatique. L'expression des enzymes de l'estomac peut également être régulée en fonction de l'efficacité de l'absorption intestinale des nutriments. Un processus de compensation se met par exemple en place chez les humains. Des patients, souffrant d'insuffisance pancréatique exocrine chronique, présentent en effet une augmentation d'un facteur de 3 à 4 de leur synthèse de lipase gastrique, comparés à des patients en bonne santé (Layer and Keller 2005). Chez les humains, la lipase gastrique montre une plus forte affinité pour la position sn-3 des triglycérides, contrairement à la lipase pancréatique qui a une affinité pour les liaisons sn-3 et sn-1. (Canaan et al. 1999) . L'estomac est également le principal organe d'absorption du calcium, du magnésium, du potassium, et du sodium qui se dissolvent à pH acide (Bucking and Wood 2007).

### **1.2.3.2 Sécrétion des enzymes pancréatiques**

Le tissu pancréatique contribue à la synthèse d'enzymes et des bicarbonates qui seront ultérieurement sécrétés puis activés dans la lumière intestinale, en sortie d'estomac pour assurer le processus de digestion des aliments. A contrario des cellules pancréatiques endocrines, localisées sous le foie au niveau des corps de Brockmann (Jonsson 1991), les cellules pancréatiques exocrines de la truite, qui sont des cellules acineuses, ont la particularité d'être diffuses et localisées autour du foie et au sein du tissu adipeux entourant les caeca pyloriques (Sahlmann et al. 2015). Plusieurs petits canaux relient ces amas de tissus pancréatiques à la lumière digestive intestinale (Einarsson and Davies 1997). Les cellules acineuses pancréatiques synthétisent plusieurs proenzymes. Les protéases synthétisées comportent le trypsinogène, le chymotrypsinogène, l'élastase, la collagénase, des carboxypeptidases et des carboxylestérases. Les enzymes pancréatiques participent également à la digestion des glucides via l' $\alpha$ -amylase, à la digestion des lipides via la lipase

pancréatique, l'estérase et la phospholipase, et à la digestion des acides nucléiques via la ribonucléase.

Les caractéristiques des principales enzymes digestives sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2: Caractéristiques des principales enzymes digestives

Enzyme	synthèse	Lieu d'activité	pH	Substrat	Produits
Pepsine	E	Lumière E	acide	Endoprotéase non spécifique	peptides
Trypsine	PE	Lumière I	neutre	Endoprotéase spécifique de liaisons peptidiques engageant des aa basiques	peptides
Chymotrypsine	PE	Lumière I	neutre	Endoprotéase spécifique de liaisons peptidiques engageant des aa hydrophobes	peptides
Elastase	PE	Lumière I	neutre	Endoprotéase spécifique de liaisons peptidiques engageant la glycine ou l'alanine	peptides
Collagenase	PE	Lumière I	neutre	Collagène	peptides
Leucine aminopeptidase N	I	BB	neutre	Exopeptidase, clive la leucine	peptides et leucine
Carboxypeptidase	PE et I	BB	neutre	Exopeptidase	peptides et acides-aminés
Gastric lipase	E	Lumière E	acide	Triacylglycérol	diacylglycerol et monoglycerol
Pancreatique lipase	PE	Lumière I	acide	Lipides	
Phospholipase	PE	Lumière I	neutre	Phospholipides	Acides gras et lysophospholipide
$\alpha$ -amylase	PE	Lumière I	neutre	amidon	Poly et monosaccharides

Organe de synthèse : E (Estomac), PE (tissus pancréatique Exocrine), I (Intestin), BB (Bordure en brosse)

### 1.2.3.3 Sécrétion biliaire

La bile contient des détergents physiologiques synthétisés à partir du cholestérol dans le foie, stockés dans la vésicule biliaire, puis sécrétés dans l'intestin au travers du canal cholédoque, lorsque le bol alimentaire arrive dans l'intestin. La bile est composée de sels biliaires (taurocholate, acide cholique, et acide allocholique), de biliverdine et de bilirubine. La biliverdine et la bilirubine sont des produits du catabolisme de l'hème des globules rouges qui donne à la bile sa couleur verte (Smith 1989; Grosell et al. 2000). La réplétion et la couleur de la bile dans la vésicule biliaire sont des indicateurs de sa dernière vidange. Une vésicule pleine de bile de couleur verte à noire étant évocatrice d'une durée relativement élevée de stockage, probablement due à une absence prolongée de prise alimentaire

(McCormick and Podoliak 1984). Une fois dans la lumière digestive, les sels biliaires, la bilirubine, et la biliverdine activent la lipase pancréatique et émulsionnent les lipides en permettant leur assemblage en chylomicrons. Les chylomicrons étant ensuite absorbés au niveau des entérocytes. Lorsque le bol alimentaire arrive dans l'intestin, les cellules de l'épithélium intestinal de type endocrine sécrètent de la cholécystokinine (CCK), qui est un neurotransmetteur contribuant au déclenchement de la vidange de la vésicule biliaire (Seth et al. 2010).

#### **1.2.3.4 Phase intestinale**

Les endoprotéases alcalines issues des sucs pancréatiques se mélangent au suc digestif sous forme de proenzymes, et deviennent actives. Chez les poissons, ces protéases incluent la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et la collagénase. Ce sont des protéases à sérine qui hydrolysent les liaisons peptidiques engageant de la lysine ou de l'arginine pour la trypsine, des acides aminés aromatiques pour la chymotrypsine, et des acides aminés aliphatiques pour l'élastase. Les protéines sont découpées en peptides, avant de rejoindre la couche de mucus intestinal de l'épithélium digestif, et d'être finalement découpées en dipeptides au niveau des acides aminés ayant une extrémité aminée libre, par l'exopeptidase membranaire des entérocytes : l'aminopeptidase N. Les dipeptides et acides aminés, ainsi libérés près de la bordure en brosse des entérocytes, rejoignent ensuite le cytosol des entérocytes via le transporteur membranaire PepT1 (Santigosa et al. 2008). Les dipeptides qui ont pénétré dans le cytosol des entérocytes sont finalement hydrolysés en acides aminés libres par la peptidase cytosolique dénommée leucine-alanine peptidase ou prolidase suivant les bases de données considérées (Yoshimoto et al. 1983; Cahu and Infante 1995a).

L'intestin est également le lieu de la digestion des glucides. L' $\alpha$ -amylase issue du tissu pancréatique hydrolyse les liaisons glucosidiques de type  $\alpha$ -1-4 présentes dans l'amidon et libère de plus courts fragments de maltose. La truite arc-en-ciel synthétise peu d' $\alpha$ -amylase et digère difficilement l'amidon lorsqu'il n'est pas transformé (Hidalgo et al. 1999). Cependant, son extrusion lors de la préparation des aliments en facilite l'hydrolyse intestinale en maltose. La maltase située sur la bordure en brosse des entérocytes hydrolyse ensuite le maltose qui a rejoint le mucus intestinal en simples fragments de glucose. Le glucose entre ensuite dans le cytosol des entérocytes par l'intermédiaire du transporteur SGLT1, puis dans la circulation sanguine via le transporteur GLUT2 situé sur le pôle basal des entérocytes. Le glucose n'est pas le substrat majeur à l'origine de la production métabolique

d'énergie chez la truite, l'acide aminé glutamate est en effet utilisé de façon préférentielle pour la production d'ATP.

La digestion intestinale des lipides nécessite une étape d'émulsification en micelles par les sels biliaires. La lipase pancréatique hydrolyse les triglycérides au niveau des liaisons sn-3 et sn-1 des esters du glycérol, ce qui génère des mono- et des di-acylglycérol (Canaan et al. 1999). Les triglycérides libres qui ont été reformés dans le cytosol des entérocytes se regroupent sous forme de chylomicrons dans le cytosol grâce à l'action d'une enzyme d'assemblage lipoprotéique la MTP (Microsomal Transfert Protéine). Les chylomicrons entérocytaires constituent ensuite un assemblage de triglycérides avec des apolipoprotéines de type APO-B (Wong et al. 2009; Goodman 2010). Les phospholipides, quant à eux, sont hydrolysés par la phospholipase A2 pancréatique.

#### **1.2.3.5 Absorption intestinale**

Le transport des nutriments de la lumière intestinale vers le sang au travers des entérocytes peut se faire par pinocytose, simple diffusion, transport actif, ou par échange d'ions (Smith 1989). La pinocytose rend possible le transport de larges composés complexes ou d'enzymes digestives. Ces composés sont alors hydrolysés ultérieurement. Le transport actif de nutriments est dépendant des transporteurs de peptide PEPT1, de glucose SGLT1 et GLUT2, et de la phosphatase alcaline qui déphosphoryle les lipides et contribue à leur absorption par réaction de transphosphorylation (Kuz'mina and Gelman 1997; Villanueva et al. 1997). Chez les mammifères, sept systèmes de transport actif d'acides aminés ont été identifiés sur la bordure en brosse de la muqueuse intestinale. L'alanine system' a une large spécificité et permet le transport de beaucoup d'acides aminés (Chan and Wang 1993). Le 'leucine system' dispose également d'une large spécificité, mais fait néanmoins preuve d'une préférence pour les acides aminés qui ont les plus long radicaux libres, et pour les acides aminés aromatiques. Le système L spécifique des acides aminés neutres transporte la méthionine, la leucine, l'isoleucine, la valine, la tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane, et la glutamine (Barker and Ellory 1990). Le 'phenylalanine system' est spécifique de la méthionine et de la phénylalanine (Chan and Wang 1993). Le 'cationic system' transfère des acides aminés cationiques comme l'arginine et la lysine. Le 'anionic system' transfère des acides aminés comme l'asparagine et la glutamine. Certaines études suggèrent qu'il existe des systèmes similaires chez le poisson (Smith 1989).

#### 1.2.4 Mesure de la digestibilité

Il est possible d'estimer *in vivo* la digestibilité des composants d'un aliment (protéines, lipides, glucides et minéraux) à partir de la mesure de la richesse de ces nutriments dans l'aliment et dans les déjections récupérées (Choubert et al. 1979) Une estimation *in vitro* peut également être réalisée par digestion enzymatique de l'aliment en utilisant des extraits d'enzymes digestives de truite (Rungruangsak-Torrissen et al. 2002).

Le coefficient apparent de digestibilité des nutriments varie significativement au cours de la journée, ce qui nécessite que l'étude de la digestibilité se fasse à partir de prélèvements récoltés sur une période de trois semaines, après une période d'adaptation des truites aux bassins de mesures (Sevgili et al. 2015). Le coefficient apparent d'utilisation digestive (CUDa) qui permet de quantifier la digestibilité d'un nutriment donné est défini par la formule suivante :

$$CUDa(\%) = \frac{\text{ingéré} - \text{fécal}}{\text{ingéré}} \times 100$$

Il a été ainsi montré que les capacités digestives de la truite ne sont pas constantes au cours des différents stades de leur vie : si pour un même aliment, la digestibilité protéique est similaire chez des poissons de 10 à 100 g, sa valeur est beaucoup plus faible chez des poissons de moins de 6g. Les capacités digestives varient aussi au cours du nyctémère (Sevgili et al. 2015).

## **1.3 Défis nutritionnels en aquaculture**

Etant donné l'insuffisante disponibilité et le coût élevé des farines et huiles de poisson, des ingrédients de substitution ont dû être utilisés, pour fournir aux poissons carnivores d'élevage des aliments ayant une quantité suffisante en protéines et en huiles, et ayant également un profil en acides aminés et en acides gras adapté à leur besoin et permettant d'obtenir une bonne qualité de chair. Le défi imposé aux fabricants d'aliments pour truites est donc de mettre au point des formulations qui assurent une teneur en protéines d'environ 40 %, en lipides de 10 à 20 %, pour les juvéniles. Ces aliments doivent contenir une quantité suffisante en acides aminés indispensables, peu de facteurs antinutritionnels, et ne pas occasionner au niveau zootechnique de retard de croissances trop importantes ou des refus alimentaires. Il est aussi nécessaire de trouver une source de lipides qui soit apte à remplacer les huiles de poisson riches en oméga-3 de type PUFA (Eldar Åsgard Bendiksen et al., 2010).

De nombreuses matières premières ont été testées et parfois utilisées à grande échelle : les farines de plumes, farines de sang, levures de bière, algues, farines de céréales et de légumineuses, huiles végétales, ou encore lécithines de soja étant parmi les principales (Hertrampf and Piedad-Pascual, 2000; Halver and Hardy, 2002; Gatlin et al., 2007; Miller et al., 2008; Glencross, 2009; Naylor et al., 2009; Turchini et al., 2009, 2011; Hardy, 2010; Welch et al., 2010; Stone et al., 2011a,b FROM Eldar Åsgard Bendiksen et al., 2010 ). Les matières premières d'origine végétale comme le soja, le colza, le pois, le blé, ou le lupin ont été majoritairement choisies en raison de leur accessibilité économique. Cependant, le profil des protéines et des huiles végétales n'est pas forcément adapté aux besoins des poissons carnivores, ce qui nécessite un effort d'adaptation de la part des fabricants d'aliment pour poissons carnivores lors de la formulation et de la transformation des matières premières d'origine végétale.

### **1.3.1 Facteurs limitant l'incorporation des ingrédients végétaux dans les aliments pour poisson**

#### **1.3.1.1 Profil en acides aminés**

Les protéines contenues dans les végétaux ne sont pas totalement équilibrées en acides aminés essentiels (déficit en méthionine, lysine, histidine, thréonine et arginine principalement) et elles comportent également de nombreux facteurs antinutritionnels

(inhibiteurs de protéase, lécithines, saponines, oligosaccharides, phytates, glucosinolates, fibres, etc). Ceci nuit à leur utilisation et limite le taux de leur incorporation (Kaushik 1990; Francis et al., 2001; Opstvedt et al., 2003; Mundheim et al., 2004; Torstensen et al., 2005,2008; Aksnes et al., 2006; Espe et al., 2006, 2007; Gatlin et al., 2007; Hevrøy et al., 2008; Miller et al., 2008; Turchini et al., 2009, 2011; Crampton et al., 2010; Pratoomyot et al., 2010 FROM Eldar Åsgard Bendiksen et al., 2010 ).

L'incorporation d'ingrédients d'origine végétale dans les aliments pour poissons a induit de nombreuses perturbations physiologiques chez les poissons. Les farines et huiles végétales dans les aliments engendrent un refus alimentaire qu'il est possible de palier par l'ajout d'attractants (Tulli 2007). La supplémentation en acides aminés essentiels de synthèse, comme attractant, a en effet permis d'améliorer la prise alimentaire. Cet ajout en acides aminés se rapprochant du besoin nutritionnel des truites, il en résulte une plus forte croissance des poissons nourris avec des aliments à forte teneur en végétaux. Cependant, les acides aminés rajoutés sous forme libre ont une absorption intestinale beaucoup plus rapide que celle des autres acides aminés présents dans les protéines. Ce décalage d'absorption intestinale des différents acides aminés crée alors un déséquilibre temporel dans le profil plasmatique en acides aminés. Ce déséquilibre peut perturber la croissance des poissons, étant donné le rôle signalétique joué par les acides aminés sur l'autophagie et sur la sensibilité à l'insuline (Rolland et al. 2016).

### **1.3.1.2 Facteurs antinutritionnels**

Les végétaux contiennent de nombreux facteurs antinutritionnels de façon constitutive ou alors suite à leur transformation (Tableau 3). Leur teneur peut être réduite lors de la préparation de l'aliment, particulièrement lors de la montée en température pendant l'extrusion, ou alors par dépelliculage des graines pour réduire la présence de fibres, ou par extraction alcoolique pour dissoudre et écarter les facteurs antinutritionnels solubles dans l'alcool. De plus lors de la cuisson des végétaux en présence d'eau, une réaction de Maillard peut se produire entre les sucres et les protéines ce qui conduit à la formation de cétosamines et diminue l'absorption intestinale des acides aminés (Machiels and Istasse 2002).

- **Inhibiteurs trypsiques**

De nombreuses céréales et légumineuses contiennent des inhibiteurs de protéases comme la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase, l'élastase ou de l' $\alpha$ -amylase. Le



soja est la céréale la plus riche en inhibiteur de Kunitz, qui est un inhibiteur trypsique. Mais il est possible de réduire considérablement cet inhibiteur par la cuisson-extrusion de la céréale. En cas d'alimentation avec du soja non transformé, les facteurs antitrypsiques présents en grande quantité peuvent provoquer une hypertrophie du pancréas comme cela a été rapporté chez la carpe (*Catla Catla*) (Patnaik et al. 2005). Cette hypertrophie a été attribuée à une réponse physiologique de l'organisme face à une absorption protéique intestinale diminuée.

- **Tanins**

Les tanins ont la propriété de précipiter sous forme de complexes protéiques les protéines solubilisées de l'aliment, réduisant sa digestibilité protéique. Leur teneur peut être diminuée par dépelliculage, traitement alcalin (Francis et al. 2001), ou lors de l'extrusion (Mukhopadhyay et al. 2007).

- **Acide phytique**

Les phytates chélatent certains minéraux (phosphore, calcium, cuivre, zinc, fer) ainsi que les protéines, ce qui diminue leur biodisponibilité. L'ajout de phytase, permettant de remédier à ce problème, est très utilisé en aquaculture (Gilani et al. 2012).

- **Glucosinolates**

Les glucosinolates sont des thioglucosides communément retrouvés chez les crucifères comme le colza. Leurs présences dans l'aliment entraînent un hypofonctionnement de la thyroïde chez les poissons (Burel et al. 2001). La sélection génétique menée sur les plantes a permis d'obtenir des variétés de colza avec de faible teneur en glucosinolate (Francis et al. 2001).

Tableau 3: Principaux facteurs antinutritionnels retrouvés dans les ingrédients alternatifs à la farine et à l'huile de poisson

Source végétale	Facteurs antinutritionnels présents
Tourteau de soja	Inhibiteur de protéase, lécithine, acide phytique, saponine, phytoestrogène
Tourteau de colza	Inhibiteur de protéase, glucosinolate, acide phytique, tanin
Farine de lupin	Inhibiteur de protéase, saponine, phytoestrogène, alcaloïdes
Farine de pois	Inhibiteur de protéase, lécithine, tanin, cyanogènes, acide phytique, saponine
Tourteau de coton	Acide phytique, phytoestrogène, gossypol, acide cyclopropenoïque
Farine de sésame	Acide phytique, inhibiteur de protéase
Huile de tournesol	Inhibiteur de protéase, saponine, inhibiteur d'arginase

Source : (Francis et al. 2001)

Tous ces facteurs antinutritionnels présents dans les différents aliments à base de végétaux peuvent nuire à la croissance des poissons s'ils sont présents en trop grande quantité. Des recommandations ont déjà été proposées pour ne pas dépasser les teneurs maximales acceptables, en facteurs antinutritionnels, dans les aliments pour poissons. (Krogdahl et al. 2010). Cependant ces valeurs restent à confirmer (Burel and Medale 2014). En effet, les études qui ont été réalisées ont davantage tendance à décrire l'impact de facteurs antinutritionnels apportés isolément, alors que dans les aliments, tous ces facteurs peuvent agir en synergie (Francis et al. 2001). De nouvelles études sont donc nécessaires pour disposer de recommandations sur les teneurs maximales en facteurs antinutritionnels à ne pas dépasser dans les aliments pour poissons (Staessen 2014).

### 1.3.1.3 Profil glucidique

Les produits végétaux sont riches en glucides (Tableau 4). Certaines céréales comme le pois, et la féverole sont riches en amidon, tandis que d'autres plantes comme le soja et le colza, ainsi que le lupin sont riches en fibres (pectine, pentosane, hémicellulose, cellulose, lignine).

- **L'amidon**

En plus de la substitution de la farine de poisson par d'autres ingrédients, l'incorporation d'amidon à hauteur maximale de 20 % dans l'aliment permet d'assurer une cohésion des granulés par son côté liant, ainsi qu'une épargne protéique, en réduisant la part des acides aminés utilisés à des fins énergétiques chez les poissons (Kousoulaki et al. 2015). Les besoins élevés des truites en protéines s'expliquent en partie : la truite, en tant que poisson carnivore, utilise physiologiquement les acides aminés comme source d'énergie, et non pas le glucose, comme c'est le cas chez la plupart des mammifères. Néanmoins le relais du glucose, comme substrat énergétique des truites, à la place des acides aminés a été rendu possible. Bien que la truite digère difficilement l'amidon des végétaux en raison de sa faible capacité enzymatique en  $\alpha$ -amylase, la cuisson de l'amidon, lors de la préparation des aliments, en améliore l'hydrolyse et l'absorption (Bergot and Breque 1983). Cependant, l'hyperglycémie post-prandiale observée chez les truites nourries avec des aliments, dont la teneur en amidon dépasse 20 % de la matière sèche, limite l'incorporation (Polakof et al. 2011).

L'amidon est très présent dans de nombreux végétaux, notamment dans les céréales et les protéagineux. Le blé contient jusqu'à 65 % d'amidon en matière sèche, le pois 45,4 %, tandis que les oléagineux comme le tourteau de soja n'en contiennent que 2,7 % (Tableau 4). Étant donné la faible activité de l' $\alpha$ -amylase, les poissons de haut niveau trophique digèrent peu l'amidon natif (Bergot and Breque 1983). Son coefficient d'utilisation digestive varie en effet de 30 à 40 % (NRC 2011). Lors de la transformation des céréales, les procédés de prégélatinisation ou d'extrusion entraînent une décristallisation et une dépolymérisation de l'amidon, ce qui permet d'en améliorer la digestibilité et d'assurer une épargne protéique. C'est-à-dire que la truite se sert de ce substrat, comme source d'énergie, ce qui épargne les acides aminés et les rend davantage disponibles pour la croissance musculaire (Polakof et al. 2012). Malgré l'amélioration de la tolérance à l'amidon par ces procédés bromatologiques, son incorporation à des taux supérieurs à 20 % est déconseillée, étant donné qu'il entraîne une hyperglycémie postprandiale et des perturbations métaboliques associées (Enes et al. 2011; Panserat et al. 2013).

- **Les fibres**

Les fibres sont des glucides résistant au processus de digestion et d'absorption dans le petit intestin. Elles régulent la viscosité du digestat, la vitesse du transit alimentaire et sont les substrats à l'origine des acides gras libres à courte chaîne (SCFA) produits par le microbiote intestinal. Bien qu'il y ait encore peu d'études sur l'absorption des SCFA chez le poisson, leur passage dans le sang et leur implication ultérieure dans le métabolisme hépatique ont déjà été décrits chez la carpe *Crinodus lophodon* et chez le Hareng *Odax cyanomelas* (Clements et al. 1994) .

Les fibres peuvent être classifiées en fibres solubles ou insolubles, selon leurs propriétés physico-chimiques. Les fibres solubles, essentiellement constituées de pectines, inulines, fructanes et certains types d'hémicelluloses forment des gels visqueux dans l'eau, et sont facilement fermentées par la microflore du gros intestin. Elles ralentissent la vitesse de transit du bol alimentaire. A l'opposé, les fibres insolubles, essentiellement constituées de lignine, cellulose, et certains types d'hémicelluloses ne forment pas de gel lors de leur mise en solution dans l'eau, et leur fermentation microbienne est limitée. Ces fibres provoquent une accélération de la vitesse du transit. En moyenne, les fibres présentes dans les végétaux sont constituées au tiers de fibres solubles, et aux deux tiers de fibres insolubles (Lattimer and Haub 2010).

Par conséquent, bien qu'elles fassent parti des facteurs antinutritionnels, les fibres sont bénéfiques pour la croissance des poissons lorsque leur inclusion est inférieure à environ 8 % de la matière sèche de l'aliment. Elles ont un effet de lest qui régule la vitesse de transit du bol alimentaire (NRC 2011). Bien que la truite ne dispose pas d'enzymes lui permettant de digérer les fibres, il a été montré que l'ajout de xylanase, b-glucanase, ou de protéase à l'aliment permet d'améliorer la digestibilité de ces composés (Dalsgaard et al. 2014).

Tableau 4 : Caractéristiques (en % de la MS) de la farine de poisson et des produits végétaux les plus utilisés comme sources protéiques dans les aliments aquacoles industriels en Europe.

Ingrédients	Protéines	Lipides	Amidon	Fibres
Farine d'anchois	71	8,2	-	-
Farine d'hareng	78	9,1	-	-
<i>Oléagineux</i>				
Tourteau de soja	46-54	0,9	2,7	23
Concentré de soja	63-69	0,5	-	-
Tourteau de colza	41	4	1,5	23
Tourteau de tournesol	36	1,9	-	43
<i>Céréales</i>				
Blé entier	11-15	1,8-2,0	65	14
gluten	81-90	1,7	-	-
gluten de maïs	63-70	2,4	-	-
<i>Protéagineux</i>				
Poids (dépelliculé extrudé)	28	1,6	45,4	7,7
Lupin (blanc doux)	33	7,3	1,4	42
Féverole	29	1,7	43	9,3

Source : (Burel and Medale 2014)

#### 1.3.1.4 Profil protéique

De nombreux végétaux dont les céréales (blé, maïs), légumineuses (soja, pois, lupin) et brassicacées (colza) sont utilisés comme sources de protéines végétales. Au-delà de leur teneur en facteurs antinutritionnels, les protéines issues des végétaux ont un profil et des propriétés particulières. Etant donné leur poids moléculaire élevé et leur forme globulaire, les protéines végétales se déplient et se dissolvent plus lentement dans l'eau que les protéines linéaires d'origine animale. Elles ont tendance à former des gels lors de leur dissolution, et possèdent un pouvoir d'adsorption plus faible. L'ensemble de ces particularités physico-chimiques ne facilite donc pas leur accessibilité aux enzymes digestives (Bos and Dunnewind 2003). Certains procédés de transformation permettent cependant d'atténuer ces particularités physico-chimiques.

L'hydrolytation acide en présence de carbonate de calcium des protéines végétales, sous forme de co-précipité, augmente par exemple leur digestibilité ainsi que leur valeur nutritionnelle et diminue leur teneur en facteurs antinutritionnels (Alu et al. 2012). Les protéines végétales n'étant pas équilibrées en acides aminés indispensables, (le riz et le blé sont par exemple déficients en lysine, et le soja en acides aminés soufrés comme la

méthionine (Alu et al. 2012)), l'ajout d'acides aminés cristallins permet de combler ce déficit. Cet ajout entraîne néanmoins un décalage temporel entre l'absorption des acides aminés essentiels rajoutés sous forme libre, et celle des autres acides aminés constitutifs des protéines végétales. Cette absorption par vague n'est pas physiologique, et engendre finalement un autre type de déséquilibre en acides aminés, comme le montre l'augmentation de transaminases hépatiques, chez des truites nourries avec un aliment contenant de la farine de soja et supplémenté avec des acides aminés de synthèse (Wacyk et al. 2012). L'amélioration des traits agronomiques a débuté dans les années 1950, en Suisse, par hybridation, avec pour premier objectif d'améliorer les rendements agricoles (Fossati et al. 2002). L'amélioration des végétaux s'est ensuite faite par des manipulations génétiques à partir des années 1980. Les objectifs de ces programmes d'amélioration agronomique se sont alors diversifiés et ont inclus la création de variétés de végétaux répondant aux besoins nutritionnels des animaux dont les poissons. Certains essais ont tenté d'augmenter la teneur en lysine et en tryptophane du riz et du maïs. Cependant, les graines de riz et de maïs obtenues présentaient certaines caractéristiques empêchant leur utilisation à l'échelle industrielle. Plus récemment, ces programmes ont recherché des gènes d'intérêt, chez des variétés sauvages, afin de procéder à leur réintroduction chez des espèces domestiquées (Wenefrida et al. 2009).

#### **1.3.1.5 Profil lipidique : triglycérides et phospholipides**

La composition en acides gras des huiles végétales et des huiles de poisson sont très différentes. Les huiles de poisson sont caractérisées par leur forte teneur en acides gras à longue chaîne poly-insaturée oméga-3 de type LC-PUFA (long chain polyunsaturated fatty acids). En revanche, toutes les huiles végétales ne sont pas riches en acide gras insaturé de type oméga-3 ou oméga-6. L'huile de lin, de colza, de carthame et d'olive font partie des huiles qui en contiennent le plus. Cependant, leur composition en acides gras, diffère de celle rencontrée dans les huiles de poisson. Etant donné leur accumulation par bioconcentration, à partir d'ingestion d'algues productrices de ces acides, les huiles de poisson sont riches en acides gras LC-PUFA de type eicosapentaénoïque (C20:5  $\omega$ 3, EPA), et docosahexaénoïque (C22:6  $\omega$ 3, DHA). En revanche, les acides gras de type oméga-3 ou oméga-6 présents dans les huiles végétales sont de type linoléique (C18:2  $\omega$ 6, LA) ou alpha-linolénique (C18:3  $\omega$ 3, ALA), et ont une chaîne carbonée plus courte et moins insaturée qui les rendent différents des acides LC-PUFA. Cette différence de composition impacte par la suite le profil des filets de truites nourries avec des aliments à base d'huile végétale (Turchini

et al. 2010). Des manipulations transgéniques sur les végétaux ont permis de créer des variétés d'oléagineuses productrices d'acides eicosapentaénoïque (EPA) , docosahexaénoïque (DHA) ou arachidonique (ARA) (Napier 2007).

L'ensemble de ces particularités des farines et des huiles d'origine végétale (facteurs antinutritionnels, forte teneur en amidon, plus faible teneur en acides gras de type oméga 3) induit certaines réactions au niveau du tractus digestif de la truite. Les capacités digestives de la truite sont parfois perturbées par l'incorporation d'ingrédients d'origine végétale dans la ration.

#### **1.3.1.6 Variabilité du profil en protéine et glucose d'une même céréale**

Suivant le pays d'origine, le type de sol, et le climat au moment de la culture, une même céréale ne contiendra pas la même teneur en protéines, amidon, fibres, produits extractibles à l'éther et minéraux, et sa valeur énergétique sera également variable. La composition chimique observée chez différentes variétés de triticales peut par exemple varier de 60,8 à 67,7 % de la matière sèche (MS) pour l'amidon, et de 11,8 à 15,2 % de la MS pour les protéines (Fras et al. 2016). De plus, une étude des fibres présentes dans le blé, entreprise sur 230 variétés de blé tétraploïde, a montré que leur contenu en  $\beta$ -glucanes variait de 0,18 à 0,89 % de la MS. L'analyse, au préalable, de la composition chimique des lots de céréales est par conséquent nécessaire avant d'établir la formulation alimentaire d'un aliment, en fonction des recommandations établies par le NRC (Lee et al. 2016).

### **1.3.2 Réponse des truites aux aliments végétaux**

#### **1.3.2.1 Croissance et efficacité alimentaire**

L'impact des aliments végétaux sur la croissance des salmonidés dépend de leur taux de substitution. La farine de poisson peut être remplacée à hauteur de 80 à 95 % sans que la croissance des salmonidés n'en soit affectée. Cependant, lors de remplacement total, la substitution engendre une diminution du taux de croissance et une diminution de l'efficacité alimentaire, même si un équilibre adéquat entre les différents acides aminés est respecté (Gómez-Requeni et al. 2004; Panserat et al. 2008; Dupont-Nivet et al. 2009; Le Boucher et al. 2012; Le Boucher et al. 2013a).

#### **1.3.2.2 Prise alimentaire**

L'incorporation partielle de farines végétales, comme le concentré de soja, en remplacement de la farine de poisson n'a pas d'effets significatifs sur la prise alimentaire,

toutefois, celle-ci diminue en cas de substitution totale des farines (Medale et al. 1998; Yamamoto et al. 2002). De nombreux constituants présents dans les végétaux, tels que certains glucosinolates, la saponine et l'acide phytique sont à l'origine de ce refus d'alimentation (Collins et al. 2013). La déficience des végétaux en méthionine est aussi en cause. La teneur en glucides n'a quant à elle, pas d'effets notables sur la prise alimentaire des truites arc-en-ciel. Des solutions, par amélioration génétique, peuvent être utilisées pour augmenter la prise alimentaire d'aliments riches en végétaux par les truites. L'utilisation de différentes lignées isogéniques de truites, qui diffèrent sur leur capacité à maintenir une croissance normale, lorsqu'elles sont nourries avec des aliments d'origine végétale, a montré que le génotype de l'hôte a un effet significatif sur la prise alimentaire de cette espèce en aliments d'origine végétale (Grima et al. 2008). Ceci implique qu'il est possible d'améliorer ce comportement par sélection génétique. Malheureusement, l'héritabilité de ce caractère est faible ( $h=0,1$ ). Plusieurs cycles de sélections génétiques, sur différentes générations, sont donc nécessaires pour pouvoir améliorer l'acceptabilité de ces aliments chez des lignées de truites sélectionnées (Kause et al. 2006). Des solutions peuvent également être apportées lors de la formulation des aliments pour poissons. L'ajout de facteurs d'appétance à base de glucosamine, taurine, bêtaïne, glycine, alanine et plus particulièrement de l'acide aminé méthionine sous forme cristalline, qui n'est pas présente en quantité suffisante, dans les régimes totalement constitués de soja, comme source protéique, améliore la prise alimentaire des poissons (Medale et al. 1998; Yamamoto et al. 2002) .

### **1.3.2.3 Rejets azotés et phosphorés**

Les effluents de pisciculture détériorent la qualité des eaux douces et marines (Ottinger et al. 2016). La présence excessive d'azote et de phosphates dans l'eau entraîne une eutrophisation. Il est de ce fait crucial de trouver des formulations alimentaires qui provoquent le moins de déchets azotés et phosphorés possibles dans l'environnement. A la fois pour améliorer l'indice d'efficacité alimentaire et donc le coût d'engraissement des poissons, mais également pour préserver la qualité des eaux douces et marines. La diminution des rejets azotés et phosphorés est devenue d'autant plus difficile, que les aliments à base de végétaux, qui sont maintenant utilisés à grande échelle en aquaculture, contiennent des teneurs élevées en phosphore sous forme phytique, dont l'assimilation est faible sous cette forme (Baruah et al. 2004; Sajjadi and Carter 2004; Morales et al. 2011) . De plus, à rations iso énergétiques et iso protéiques, les truites nourries avec des aliments issus



de farines de poisson libèrent moins de déchets azotés que leurs congénères nourries avec des rations à base de végétaux (Zhang et al. 2012a).

#### **1.3.2.4 Incidence sur les filets**

L'impact de l'incorporation de ces matières premières dans les aliments pour poisson, peut également être évalué sur les profils lipidiques de la chair de poisson obtenue suite à leur utilisation. Les défis pour les fabricants d'aliments pour poissons n'étant pas uniquement de proposer des aliments capables d'assurer une forte croissance chez les poissons qui les consomment, mais également de promouvoir la présence en quantité suffisante d'acides gras oméga-3 de type LC-PUFA dans la chair, (Suárez et al. 2014). La substitution d'huile de poisson par des huiles végétales à faible teneur en LC-PUFA conduit à une baisse de la teneur en LC-PUFA dans les filets (Turchini and Francis 2009). Il est donc recommandé d'inclure de nouvelles sources de LC-PUFA dans les aliments pour poisson, et certaines algues riches en LC-PUFA sont potentiellement de bonnes candidates. Il a, par exemple, été observé que l'incorporation de macroalgues de type *Macrocystis pyrifera*, dans les aliments pour truites, augmente significativement la teneur en acides gras de type PUFA dans la chair (Dantagnan et al. 2009). De plus, des dépôts lipidiques se forment autour des tissus viscéraux lors de l'utilisation d'aliments végétaux. Cette graisse péri-viscérale peut représenter 2 à 25 % du poids de la truite, ce qui diminue le rendement des carcasses. Etant donné qu'elle n'est pas valorisée par la suite, il faudrait étudier davantage les mécanismes biologiques impliqués dans son apparition, pour tenter d'y remédier (Weil et al. 2013).

#### **1.3.2.5 Impact d'une alimentation riche en végétaux sur les capacités digestives de la truite**

L'évaluation des nouvelles formulations alimentaires ne se fait pas uniquement en évaluant leur digestibilité et les performances zootechniques qu'elles engendrent chez la truite. Afin de vérifier si elles sont bien tolérées, leurs effets sur les capacités digestives de la truite sont également étudiés. Cela se fait par la mesure de l'expression d'enzyme et/ou de transporteurs impliqués dans la digestion et l'absorption des nutriments. L'activité enzymatique des protéases, lipases, et glucosidases présentes dans le chyme est utilisée comme indicateur de fonctionnalité digestive (Ueberschär 1993).

Souvent, pour étudier la réponse digestive des truites à un ingrédient particulier ou à un mélange, l'impact sur leur capacité digestive d'aliments contenant une gamme de cet ingrédient ou du mélange à tester, est comparé à celui d'un aliment contrôlé de type commercial ou à base de farine et d'huile de poisson. Ce type d'évaluation peut se faire

également pour tester l'effet de la programmation nutritionnelle ou de certains procédés bromatologiques. La programmation nutritionnelle étant une stratégie qui consiste à exposer des alevins à certains aliments, pendant une courte période, afin d'améliorer leur tolérance à certains ingrédients lorsqu'ils y seront exposés au stade juvénile (Geurden et al. 2007). Les principaux procédés bromatologiques étudiés en nutrition aquacole sont l'extrusion ou la dissolution alcoolique lors de la transformation des végétaux. Ces procédés permettent en effet de préhydrolyser l'amidon et de diminuer la teneur en certains facteurs antinutritionnels.

Différentes études de mesure d'activité enzymatique, de mesure d'expression de gènes ou de protéines, ont été réalisées chez la truite. Le stade de l'animal, le type de probiotique administré (Koca et al. 2015), le taux de substitution des farines ou des huiles de poisson, la nature et le procédé de transformation de l'ingrédient testé, ainsi que le type de substitution (substitution double ou simple en farine et huile de poisson) sont des paramètres importants à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats. Les principaux effets observés chez la truite sur l'expression des principales enzymes et des principaux transporteurs impliqués dans la digestion et l'absorption de nutriments sont décrits ci-après.

- **Pepsine**

L'activité enzymatique de la pepsine est augmentée par l'ajout dans l'aliment du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate qui est un métabolite précurseur d'acide gras libre à courte chaîne (SCFA) (Najdegerami et al. 2015), ainsi que par la substitution à hauteur de 60 % de la farine de poisson par des protéines dérivées de levures (Hunt et al. 2014).

- **Trypsine**

L'activité de la trypsine a déjà été augmentée par l'ajout dans l'aliment de la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* (Heidarieh et al. 2013), du prébiotique alphanumane composé de mannan-oligosaccharides et de  $\beta$ -glucanes (Nazari et al. 2016), ainsi que par la substitution de la farine de poisson par des protéines de levure à hauteur de 40 à 60 % (Hunt et al. 2014). L'inclusion dans l'aliment de farine de soja toastée ou non toastée, et otée de certains facteurs antinutritionnels par extraction alcoolique, a également été suivie d'une augmentation de l'activité de la trypsine. Cependant, il est rapporté que cette tendance pourrait s'expliquer en partie par le fait que les prélèvements ont été réalisés dans l'intestin

distal, qui est le lieu de réabsorption des enzymes par pinocytose. Une inflammation intestinale, provoquée par la farine de soja, a pu diminuer cette réabsorption endogène et conduire à l'augmentation observée de l'activité de la trypsine en comparaison de celle mesurée chez les poissons nourris sans farine de soja (Romarheim et al. 2006; Romarheim et al. 2008). L'effet opposé a déjà été observé lors de substitution partielle de la farine de poisson par de la farine de pois et/ou de sang (Wulff et al. 2012), ou par du concentré de lupin (Zhang et al. 2012b), ou par un mélange de farine de maïs, colza, blé, et de pois (Santigosa et al. 2008).

- **Amylase**

L'activité de l' $\alpha$ -amylase a déjà été augmentée par ajout dans l'aliment de lécithine d'œuf (Azarm et al. 2013), de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate qui est un métabolite précurseur de SCFA (Najdegerami et al. 2015), ainsi que de la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* (Heidarieh et al. 2013). La programmation nutritionnelle, par exposition d'alevins de truites à un régime hyperglucidique pendant une courte période, induit également, à l'état juvénile, une augmentation d'activité de l'amylase lors de challenge hyperglucidique (Geurden et al. 2007).

- **PEPT1**

Des régimes avec une plus forte teneur en amidon (Kamalam et al. 2013) ou avec davantage de protéines sous forme de dipeptides ou d'acides aminés libres, que sous forme de protéines, induisent une plus forte transcription du transporteur PEPT1 (Ostaszewska et al. 2010a). Cependant, chez les poissons carnivores comme la truite, le remplacement de la farine de poisson par des farines végétales retarde l'absorption protéique. Une absorption au niveau de l'intestin distal prend alors le relai lorsque l'absorption protéique au niveau proximal est incomplète (Santigosa et al. 2011b).

- **Aminopetidase N**

L'inclusion dans l'aliment de farine de soja toastée ou non toastée, et ôtée de certains facteurs antinutritionnels par extraction alcoolique, est suivie d'une diminution de l'activité de la leucine aminopeptidase (Romarheim et al. 2006). L'ajout de lécithine d'œuf à

l'aliment se traduit par une augmentation de l'activité de l'aminopeptidase N chez l'alevin (Azarm et al. 2013).

- **GLUT2**

Une comparaison de la transcription du transporteur de glucose GLUT2 entre deux lignées de truites (lignée grasse versus lignée maigre) a montré que la transcription de GLUT2 était plus importante chez les truites de la lignée grasse (Kamalam et al. 2013).

- **Phospholipase**

L'ajout de lécithine d'œuf à l'aliment se traduit par une augmentation de l'activité de la phospholipase A2 chez l'alevin (Azarm et al. 2013).

- **Transporteurs de lipides**

Des régimes à forte teneur en amidon sont associés à une augmentation de la transcription d'ApoA1. Une comparaison de deux lignées de truites (lignée grasse versus lignée maigre) a montré que la transcription des protéines ApoA4, Elovl2, Elovl5 et D6D impliquées dans la formation de chylomicron et dans la bioconversion d'acides gras était plus importante chez les truites de la lignée maigre (Kamalam et al. 2013).

- **Maltase**

La programmation nutritionnelle par exposition d'alevins de truites à un régime hyperglucidique pendant une courte période induit, à l'état juvénile, une augmentation d'activité de la maltase lors de challenge hyperglucidique (Geurden et al. 2007).

- **Sécrétion biliaire et vacuoles lipidiques**

Le changement d'alimentation se traduit par une perturbation de la synthèse des acides biliaires chez les salmonidés. Les matières premières végétales induisent une baisse de la synthèse du cholestérol et de ses acides biliaires, une atrophie de la vésicule biliaire ainsi que des retards de croissance (Romarheim et al. 2008; Murashita et al. 2013). La faible efficacité alimentaire du concentré de soja et de blé, observée sur la truite, a été en partie liée à cette baisse de synthèse d'acide biliaire. Il a été possible de l'améliorer par l'ajout de sels biliaires dans l'aliment. De plus, ce traitement s'accompagne d'une plus forte activité enzymatique de la maltase.

L'accumulation de vacuoles lipidiques est observée au sein des entérocytes de truites nourries avec des aliments contenant de l'huile de soja, ce qui laisse suggérer un ralentissement dans le flux lipidique au niveau de l'absorption intestinale (Olsen et al. 2003).

## **1.4 Stratégie d'adaptation des truites à l'alimentation végétale en mettant à profit leur variabilité génétique**

### **1.4.1 Utilisation de lignées sélectionnées en élevage**

La sélection des poissons sur critères de performance a commencé dans les années 70 avec des essais menés sur la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique en Norvège (Gjedrem 1978), en France (Chevassus 1976), en Allemagne et aux Etats-Unis (Kincaid 1977). La station expérimentale INRA-IFREMER de Sizun en Bretagne a également travaillé sur l'optimisation de truites arc-en-ciel en incluant la fécondité et les effets maternels dans les critères de sélection. La PROCédure de Sélection individuelle optimisée Par Epreuves Répétées (PROSPER) ainsi créée a permis un gain de poids de 120 % en seulement 5 générations. L'ensemble des professionnels impliqués dans ce processus de sélection des salmonidés en France a rejoint le syndicat des sélectionneurs avicoles en 1991, pour se regrouper au sein du syndicat SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français). La sélection de truites françaises a maintenant une renommée mondiale, 60 % des œufs de truite arc-en-ciel éclos en Europe proviennent d'une station affiliée au SYSAAF (Haffray et al. 2004).

A titre expérimental, les programmes de sélection incluent maintenant la tolérance aux végétaux dans les critères d'évaluation des poissons. Effectivement, les truites d'élevage sont nourries avec des aliments comportant des taux de plus en plus élevés de substitution en farines et huiles de poisson par des végétaux, mais ne parviennent pas à maintenir des taux de survie et croissance comparables à ceux enregistrés sur des truites nourries avec des aliments conventionnels. D'importantes variabilités des performances individuelles de survie et de croissance sont fréquemment observées parmi les différents individus de lots de poissons nourris avec des aliments substitués. Ce qui a alors fait surgir l'hypothèse qu'il pourrait exister au sein des populations d'élevage une variabilité génétique à l'origine de ces variabilités phénotypiques. Il est ainsi devenu opportun d'exploiter cette variabilité lors de la sélection pour accélérer l'adaptation des cheptels au changement de formulations alimentaires. Cette variabilité individuelle est également exploitée dans le but de promouvoir le bien-être animal et la pérennité de l'aquaculture, et pour comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de l'adaptation aux végétaux (Le Boucher et al. 2012).

L'amélioration génétique des truites vise à perfectionner les performances de croissance, les taux corporels lipidiques et protéiques, les rendements de carcasse, la résistance aux maladies, ainsi que la flexibilité nutritionnelle (Le Boucher et al. 2013a). L'indexation des animaux lors de la sélection peut se faire sur leur performance zootechnique, ce qui nécessite une longue période de suivi, ou via la génomique, à partir de marqueurs génétiques dénommés haplotypes (Meuwissen et al. 2001). Certains haplotypes étant corrélés avec de meilleures performances sur les critères retenus dans la sélection. Cette information obtenue à partir du génome permet de calculer l'estimation génomique de la valeur d'élevage (GEBV Genomic Estimated Breeding Value), qui peut ensuite être utilisée pour prévoir les performances d'un individu en absence de données phénotypiques (Roex et al. 2015).

#### **1.4.2 Lignées isogéniques: un outil pour l'amélioration génétique**

Les lignées isogéniques de truites constituent un modèle biologique expérimental adapté à la recherche du déterminisme génétique sur la réponse des truites à l'alimentation végétale. Elles ont été créées à partir d'une population fondatrice (souche INRA Sy) avec pour objectif de disposer de lignées 'consanguines' homozygotes, stables et reproductibles. De telles lignées, précurseurs d'individus femelles homozygotes, ont été obtenues par gynogenèse (Figure 7). Certains de ces individus femelles subissent une réversion de sexe par traitement hormonal, ce qui permet d'obtenir des individus néo-males homozygotes de même patrimoine génétique que les œufs dont ils sont issus. La souche de parents homozygotes à conserver, est alors entretenue par croisement de ces individus femelles et néo-males (Ihssen et al. 1990; Komen and Thorgaard 2007; Dupont-Nivet et al. 2009). Des croisements entre des individus homozygotes au patrimoine génétique différent ont ensuite conduit à l'obtention des lignées isogéniques hétérozygotes.

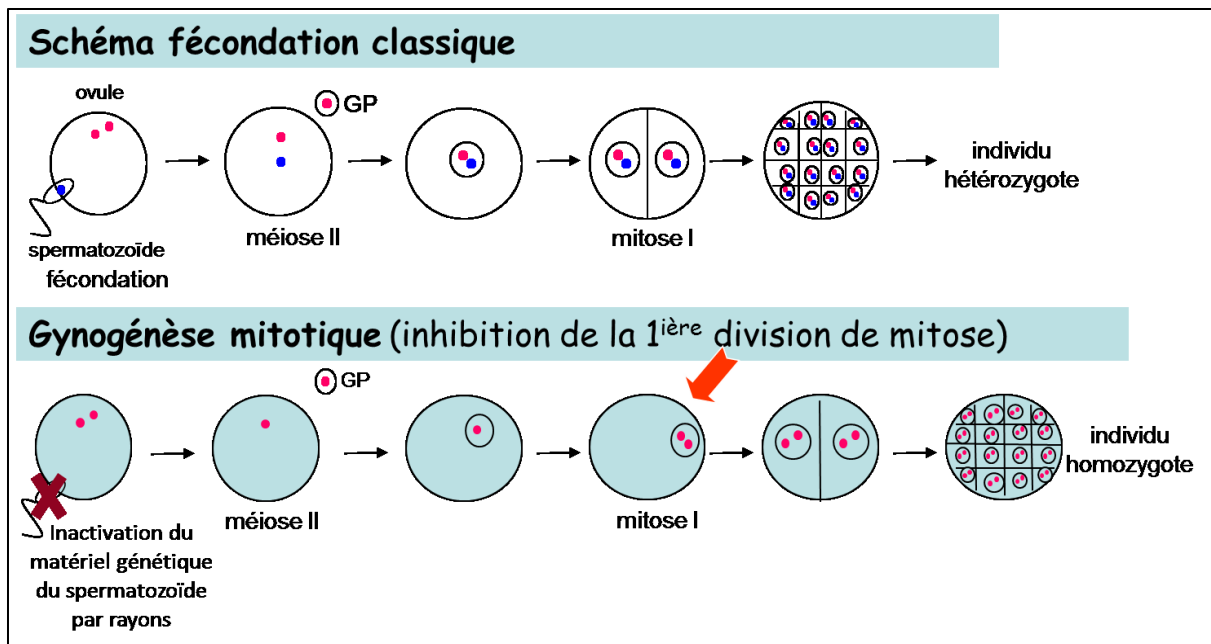


Figure 7 : Schéma représentant le mode d'obtention d'individu homozygote par gynogénèse mitotique  
GP globule polaire

Adaptation de Quillet (Séminaire ANR)

Ces outils biologiques rendent possible l'investigation du déterminisme génétique et de sa variabilité sur la croissance. Le passage à l'état homozygote permet, si le nombre de lignées est suffisamment grand, d'augmenter la variabilité génétique entre individus au sein d'une population. C'est-à-dire qu'il existe plus de diversité génétique et phénotypique entre les individus homozygotes qu'entre les individus normaux (a fortiori, qu'entre familles de pleins frères standards). L'homozygotie augmente la probabilité de détecter des allèles récessifs, et d'identifier le polymorphisme allélique chez la truite. Les lignées isogéniques sont également adaptées à l'étude de caractères fonctionnels. Elles rendent possible des expérimentations sur des individus différents, mais au patrimoine génétique identique, ainsi que le rapprochement entre information fonctionnelle et polymorphisme de gènes. Enfin, du fait de l'isogénicité entre individus, une réduction de la variabilité phénotypique entre individus d'une même lignée est attendue (Quillet et al. 2007).

L'étude du déterminisme génétique chez la truite se justifie par le fait qu'une forte variabilité inter-individuelle de réponses zootechniques, au sein de population de truites soumises à des régimes à base de farines et d'huiles d'origine végétale, est fréquemment observée (Lazarotto et al. 2015). La dispersion inter-individuelle de poids, observée parmi des lots de truites nourries avec des végétaux, ayant été expliquée par l'existence d'une variabilité génétique de la croissance (Palti et al. 2006; Pierce et al. 2008). Cette variabilité a alors été étudiée plus en détail sur des lignées isogéniques de truites. Ces lignées ont été



créées par l'unité de Génétique Animale Gabi du laboratoire INRA de Jouy en Josas, dans le but de disposer d'individus consanguins comme matériel biologique, pour des études sur le déterminisme génétique de certains caractères phénotypiques. Il s'est avéré que certaines de ces lignées divergeaient quant à leur capacité à se développer sous une alimentation végétale. Des lignées isogéniques de truites, qui divergent sur leur aptitude à maintenir une croissance comparable à celle observée sous une alimentation à base de farines et d'huiles de poisson, lorsqu'elles sont nourries avec une alimentation à base de protéines et d'huiles d'origine végétale, ont alors été identifiées et retenues pour des études de nutrition (Quillet et al. 2007; Dupont-Nivet et al. 2009; Sadoul et al. 2015; Sadoul et al. 2016). Le phénotype de ces lignées a alors été déterminé pour la croissance, la prise alimentaire (Dupont-Nivet et al. 2009; Dupont-Nivet et al. 2012; Geurden et al. 2013), la résistance lors de challenges viraux (Quillet et al. 2007; Verrier et al. 2012; Verrier et al. 2013), le comportement (activité, stéréotypie, et agressivité) et la réponse physiologique (cortisolémie) en situation de stress (Sadoul et al. 2015; Sadoul et al. 2016). Les lignées isogéniques constituent des outils biologiques de recherche permettant d'étudier le déterminisme génétique. Elles sont adaptées à la recherche d'une bonne répétabilité, replicabilité, reproductibilité entre différentes expérimentations (Tatarenkov et al. 2010). Cependant, leur utilisation est encore limitée. Des lignées recombinantes sont utilisées chez les invertébrés comme la drosophile (King et al. 2012), et chez les rongeurs comme la souris (Peirce et al. 2004) ou le rat (Pravenec et al. 1989). D'autres lignées isogéniques de poissons, que la truite, sont utilisées en recherche. Une lignée de carpes japonaises *Carassius langsdorfii* a déjà été utilisée pour étudier l'effet de la température d'incubation des œufs sur les taux de survie, sur les performances de croissance, et sur certains paramètres sanguins (Müller-Belecke et al. 2002). Néanmoins, comme il a été observé sur les lignées isogéniques de truites, les mesures faites sur ces lignées de carpes laissent apparaître une certaine variabilité intra-lignée. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la différence de croissance observée au sein d'une même lignée isogénique : la variabilité de la taille des œufs et la forte densité, pouvant conduire à une différence de prise alimentaire plus prononcée entre les poissons d'un même bassin. L'effet du stress a également été retenu pour expliquer les variabilités observées sur les mesures de l'hématocrite. Chez certaines espèces de poissons la formation de lignées isogéniques se produit naturellement par parthénogenèse, gynogenèse, hybridogenèse polyembryonnaire ou par hermaphrodisme multi-générationnel, comme c'est le cas pour le poisson *Kryptolebias marmoratus* doué d'auto-fertilisation (Tatarenkov et al. 2010).

## 1.5 Le microbiote intestinal

La baisse des performances de croissance des truites, lorsqu'elles sont nourries avec des aliments dont la farine et l'huile de poisson sont simultanément remplacées par de la farine et de l'huile d'origine végétale, avec des taux de substitution élevés, s'explique par plusieurs mécanismes biologiques. Ces mécanismes biologiques interviennent à différents niveaux physiologiques: diminution de la prise alimentaire (Geurden et al. 2013; Saravanan et al. 2013), diminution de la croissance musculaire, perturbation du métabolisme énergétique (Panserat et al. 2009; Marandel et al. 2016), perturbation de la cholestérolémie, augmentation de la protéolyse musculaire (Seiliez et al. 2011; Belghit et al. 2014) et détérioration des performances de digestion et d'absorption (Dabrowski et al. 1989). Bien qu'il soit un hôte de la truite, le microbiote intestinal, qui se définit également comme la sous-partie digestive de l'holobionte, interagit au niveau de l'intestin, et son activité est capable d'orienter certains mécanismes, tout particulièrement les performances de digestion. Le microbiote de la truite, nourrie avec des farines et des huiles de poisson, témoigne d'un microbiote intestinal d'un poisson au régime carnivore (Huber et al. 2004). Suite à un changement de régime alimentaire, le profil de ses communautés microbiennes est modifié (Heikkinen et al. 2006). Ces modifications sont de plus en plus étudiées, afin de mettre en œuvre des stratégies de formulation de nouveaux aliments pour truites, et d'orienter la sélection des poissons reproducteurs. Il est donc nécessaire de progresser dans la caractérisation du profil des communautés microbiennes de truite nourries avec un régime traditionnel, et de savoir comment l'inclusion de farines et d'huiles d'origine végétale le modifie. De plus, les mécanismes biologiques, présents au sein de la symbiose poisson-microbiote intestinal, n'étant pas encore démontrés de façon aussi développée que les observations déjà réalisées chez les mammifères, il est nécessaire de faire progresser les connaissances sur ses fonctionnalités.

### 1.5.1 Composition taxonomique du microbiote intestinal chez les poissons

D'après une étude menée sur 14 espèces de poissons de niveau trophique et d'habitats différents, le microbiote intestinal des poissons est dominé, par ordre décroissant en terme d'abondance, par des bactéries appartenant au phylum des Protéobactéries, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéries, Fusobactéries, Planctomycetes, et Tenericutes (Figure 8) (Sullam et al. 2012a). Bien que la majorité des études sur le microbiote intestinal des poissons porte sur les bactéries, celui-ci comporte aussi des levures (Gatesoupe 2007) et des archées (Kormas et al. 2014)

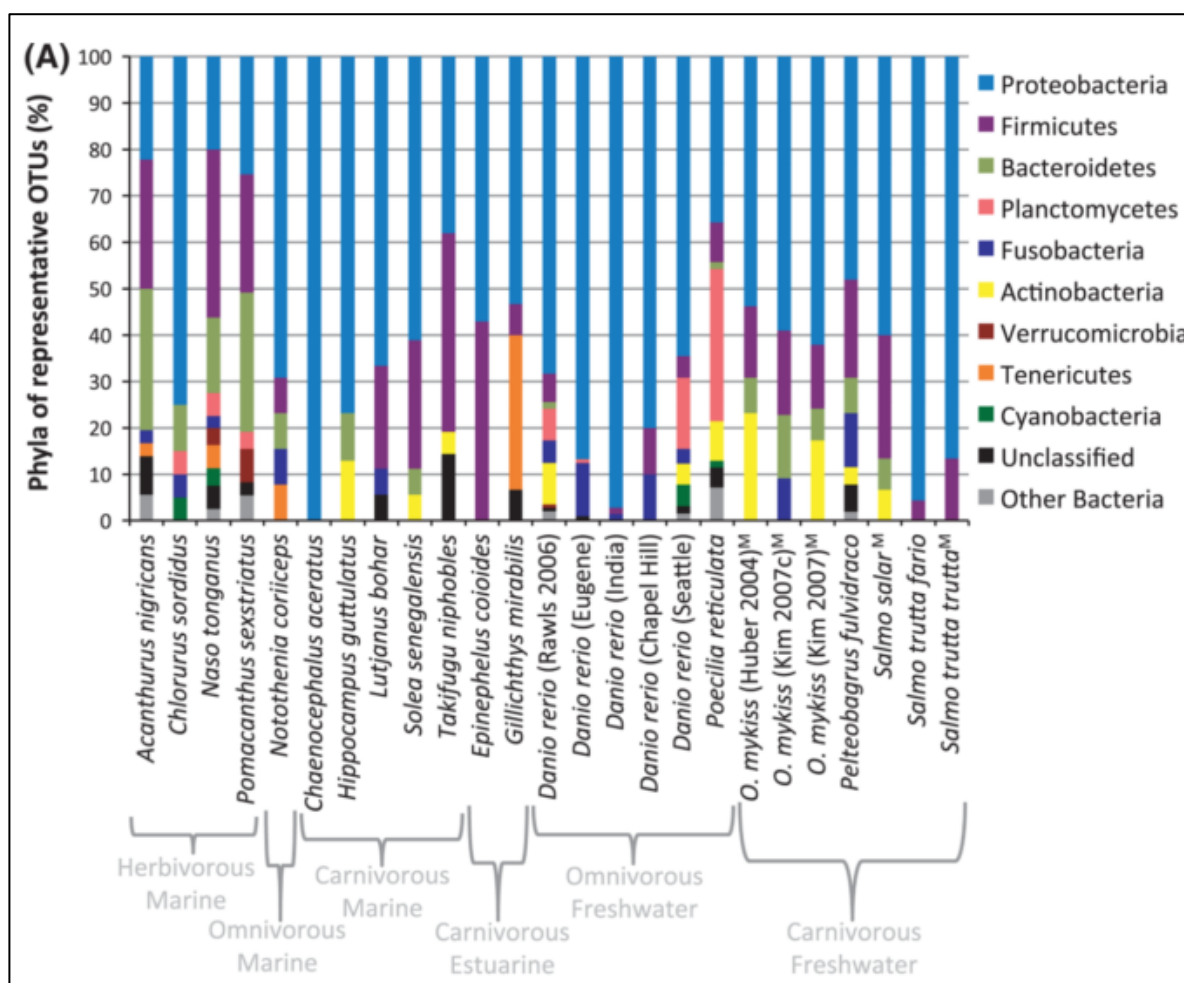


Figure 8 : Phyla bactériens rencontrés dans les communautés intestinales de 25 poissons

Pour chaque espèce de poisson, une barre de couleur représente l'abondance moyenne en bactéries appartenant au phylum considéré. Les noms des espèces de poissons sont listés le long de l'axe horizontal.

Source : (Sullam et al. 2012a)

### 1.5.1.1 Les bactéries

Le microbiote du contenu et de la muqueuse de l'intestin distal de truites juvéniles élevées sous aliments commerciaux, dans une eau dont la température est comprise entre 9 et 12°C, est essentiellement composé de bactéries appartenant à quatre phyla : Tenericutes, Firmicutes, Proteobactéries, et Spirochaetes. Les Tenericutes rencontrées étant essentiellement composées de bactéries du genre *Mycoplasma*, les Spirochaetes de bactéries du genre *Brevinema*, les Proteobactéries de bactéries de la classe Gammaproteobactéries et des genres *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Maricurvus*, *Moritella* et *Pantoea*, et les Firmicutes de bactéries des classes Bacilli, et Clostridia, et des genres *Lactobacillus*, *Acetanaerobacterium*, *Catelicoccus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Bacillus* sont les plus abondantes (Lyons et al. 2016).

Selon une autre étude rapportée par Lyons (2015) , où le microbiote associé à la muqueuse digestive a été caractérisé séparément de celui du contenu digestif, le microbiote de la muqueuse intestinale de la truite est essentiellement composé de Protéobactéries des classes  $\alpha$  et  $\beta$ . Les Firmicutes également présentes sont, comme dans la lumière digestive, dominés par des bactéries appartenant à la classe des Bacilli, leur abondance étant plus importante sur la muqueuse digestive. Des bactéries appartenant aux Fusobactéries, Actinobactéries, Cyanobactéries et Bacteroidetes étant également rencontrées sur la muqueuse digestive (Figure 9) (Lyons et al. 2015). Bien que leur proportion soit peut être faible en comparaison des autres bactéries, les Cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques, leur présence est surprenante et on peut se demander comment elles parviennent à établir résidence sur la muqueuse digestive. Leur présence a déjà été rapportée dans l'intestin des poissons, mais davantage dans le contenu digestif, où elles peuvent transiter avec l'aliment, plutôt que sur la muqueuse (Kashinskaya et al. 2014; Ye et al. 2014; Standen et al. 2015).

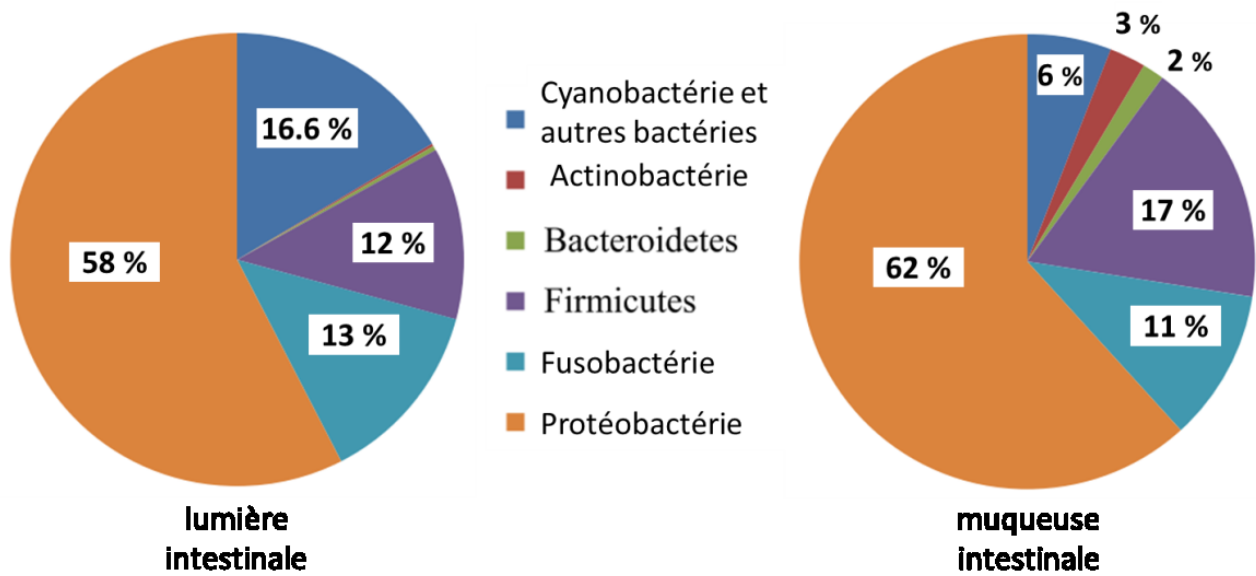


Figure 9 : Abondance des phyla bactériens rencontrés dans la lumière et sur la muqueuse intestinale de l'intestin distal de truites arc-en-ciel

Seule l'abondance des phyla supérieure à 1 % est indiquée.

Source : (Lyons et al. 2015)

Cependant, ces observations contrastent avec une autre étude menée par Etyemez (2015) où les Gammaprotéobactéries dominent, suivies par ordre d'abondance par les Fusobactéries, les Bétaprotéobactéries, les Bacteroidetes, les Firmicutes, les Tenericutes, et les Actinobactéries (Figure 10). La communauté bactérienne intestinale décrite par Etyemez portait sur un segment non défini de la muqueuse intestinale de truites, de 520 à 750 grammes, élevées en Espagne, sacrifiées 24 heures après leur dernier repas et nourries avec un aliment commercial contenant 30 % de farine de poisson, 16 % de farine de blé, 15 % de farine de soja, 4 % de farine de sang, 10 % d'huile de poisson, et 6 % de gluten de blé. En revanche, la communauté bactérienne intestinale, décrite par Lyons, portait sur la muqueuse intestinale distale de truites de 191 grammes, élevées en Ecosse et nourries avec un aliment à base de farines de poisson. Des différences de température des bassins, de composition de l'aliment, ou de segment intestinal peuvent expliquer la différence observée dans la composition du microbiote.

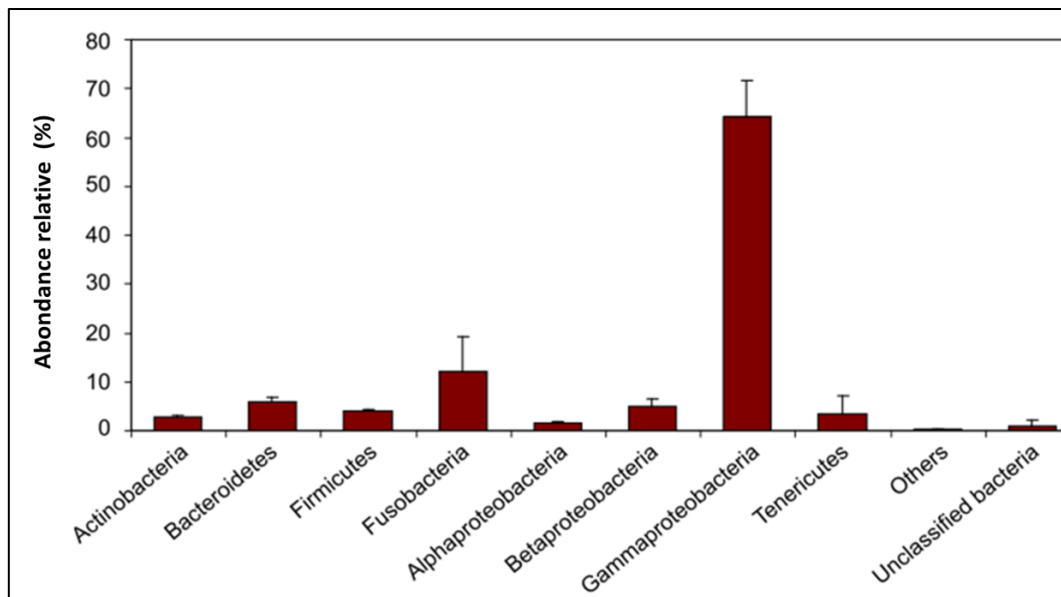


Figure 10 : Abondance relative des principaux taxons bactériens (phyla et classes pour les Protéobactéries) observés sur la muqueuse de l'intestin de truites arc-en ciel au stade juvénile, nourries avec un aliment commercial

Source : (Etyemez and Balcazar 2015).

### 1.5.1.2 Les levures

Les levures sont également présentes dans la flore digestive des poissons, avec notamment une forte présence de *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida spp*, et *Leucosporidium spp* chez la truite arc-en-ciel. Le profil des levures rencontrées est sensible au type d'alimentation que les poissons reçoivent. Le remplacement de la farine de poisson par de la farine de soja augmente l'abondance en levures chez la truite, ce qui s'explique par la plus forte teneur en glucides fermentescibles. La modification des communautés de levures, suite à un changement d'alimentation, étant plus remarquable sur la population allochtone (Gatesoupe 2007; Merrifield et al. 2009). Les  $\beta$ -glucanes et d'autres composants de la paroi des levures ont pour effet de stimuler la maturation digestive, le métabolisme et le système immunitaire chez les poissons. De plus, par leur simple présence, ou par certaines protéases qu'elles secrètent, les levures ont un effet antagoniste sur certaines bactéries entéro-pathogènes (Gatesoupe 2007).

### 1.5.1.3 Les archées

Les archées ont également été détectées au sein de la flore digestive des poissons, comme le démontre une étude menée chez la carpe. Toutefois, leur quantité reste faible, étant donné que leur nombre ne représente que 0,88 % des bactéries présentes, ce qui est similaire aux ordres de grandeur observés chez les mammifères (Ni et al. 2014).

De plus, les quelques archées observés chez la daurade ont la particularité d'avoir une activité méthanogène (Kormas et al. 2014) comme chez la limande (*Platichthys flesus*) qui est un poisson marin (Van Der Maarel et al. 1999), et chez les poissons herbivores *Kyphosus sydneyanus*, *Odax pullus*, et *Aplodactylus arctidens* (Mountfort et al. 2002). Il n'a pas été rapporté d'activités méthanogènes dans le tractus digestif des poissons carnivores comme la truite, le bar, le saumon, ou la daurade.

### 1.5.2 Compartimentation du microbiote au sein du tube digestif de la truite

La microflore digestive est composée du microbiote allochtone présent dans la lumière digestive qui transite avec le bol alimentaire et du microbiote autochtone présent sur la couche de mucus intestinal de la muqueuse digestive. Comme rapporté précédemment (cf. § 1.5.1.1 les bactéries) lors de la description du microbiote intestinal de la truite arc-en-ciel par Lyons et al (2015), les communautés microbiennes observées sur ces deux compartiments divergent chez de nombreuses espèces, ce qui crée une stratification radiale du mucus de la muqueuse vers la lumière intestinale. Le mucus intestinal est composé de deux couches, une couche externe qui comporte le microbiote associé à la muqueuse, et une couche interne quasiment exempte de bactéries. L'épaisseur du mucus intestinal est plus importante au niveau des segments distaux que proximaux de l'intestin (Figure 11).

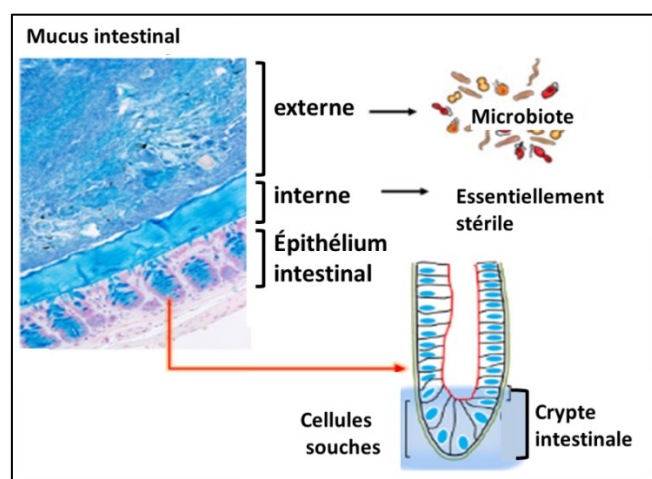


Figure 11 : Stratification de la muqueuse intestinale : microbiote associé au mucus intestinal

Représentation histologique illustrant la distribution des deux couches de mucus dans le colon de la souris, avec coloration au bleu alcian des cellules à mucus. La couche de mucus externe fournit un environnement favorable à l'implantation d'un microbiote, tandis que la couche interne qui protège les cellules intestinales est quasiment stérile

. Source : Adaptation d'après (Papineni and Umar 2013)

### 1.5.2.1 Stratification radiale

D'après une étude comparative, réalisée par Lyons (2015), entre le microbiote associé à la muqueuse digestive et le microbiote présent dans le contenu digestif, la richesse bactérienne du compartiment luminal est plus faible que celle observée sur la muqueuse, avec 90 genres bactériens identifiés dans la lumière digestive contre 159 sur la muqueuse (Lyons et al. 2015). Des observations menées au sein d'autres études confortent cette tendance chez la truite arc-en-ciel (Kim et al. 2007; Merrifield et al. 2010;) et également chez le poisson chat (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Wu et al. 2010). Cependant, une tendance inverse a également été rapportée chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) (Carda-Diéguez et al. 2014) et chez la carpe (*Ctenopharyngodon idellus*) (Han et al. 2010). De plus, le profil taxonomique des communautés rencontrées dans ces deux compartiments est différent. Les Protéobactéries dominent la flore allochtone, et tout particulièrement les Entérobactéries. La muqueuse comporte moins de Gammaprotéobactéries mais plus de Bétaprotéobactéries et de Bacilli. Les principaux genres bactériens rencontrés sur la muqueuse sont les *Cetobacterium*, *Yersinia*, *Ralstonia*, *Hafnia* et les *Carnobacterium* (Lyons et al. 2015).

Les mécanismes impliqués dans l'adhésion des différentes bactéries à la muqueuse sont divers. Des facteurs d'adhésion, la salinité, le pH, la typologie des sialomucines secrétées et l'hydrophobicité du mucus de la muqueuse sont à l'origine de la sélection de certaines bactéries. De plus, bien que la couche interne du mucus intestinal soit quasi exempte de bactéries, des interactions spécifiques impliquant des récepteurs de pili bactériens et de résidus d'oligosaccharides, sur la bordure en brosse des entérocytes, sont également impliquées dans ce processus de sélection bactérienne (Knutton et al. 2002).

### 1.5.2.2 Stratification antéro-distale

Une stratification antéro-distale du microbiote digestif existe également. D'après une caractérisation du microbiote de différents compartiments digestifs (estomac, intestin proximal, médian, et distal) par pyroséquençage chez la daurade, la diversité bactérienne la plus faible est observée au niveau de l'estomac. Le microbiote y étant essentiellement constitué de Firmicutes, Protéobactéries et d'Actinobactéries. Au niveau intestinal, la richesse bactérienne (indice de diversité Chao1) est similaire entre les différents segments, mais l'abondance des différents phylums évolue suivant le segment intestinal considéré. Les principaux phylums rencontrés dans les segments proximaux sont les Actinobactéries, les Firmicutes, et les Protéobactéries. Au niveau médian, les Firmicutes deviennent le phylum le



plus abondant, suivi par les Actinobactéries et les Protéobactéries. Au niveau distal, les abondances observées redeviennent similaires à celles rencontrées dans le segment proximal, le principal phylum enregistré étant celui des Actinobactéries, suivi par les Protéobactéries et les Firmicutes. Vingt et un autres phylums sont également observés dans le tractus digestif, dont les Bacteroidetes (Figure 12). Le pourcentage de bactéries non assignées taxonomiquement s'élève à 3 % (Estruch et al. 2015).

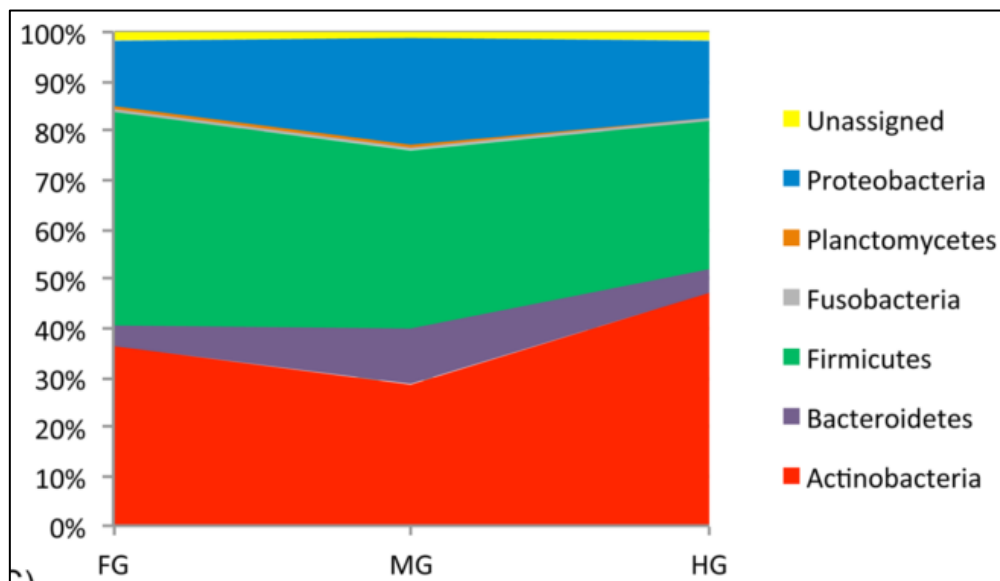


Figure 12 : Abondance des différents phylums bactériens observés dans le contenu intestinal de différents segments intestinaux chez la daurade (FG : intestin proximal, MG : intestin médian, HG : intestin distal). Source : (Estruch et al. 2015)

Une stratification antéro-distale (caeca pyloriques versus intestin proximal et distal) des genres bactériens a également été observée par PCR-DGGE sur la muqueuse digestive de la truite de mer (*Salmo trutta Linnaeus*), au stade juvénile, et élevée sous aliment commercial à 16°C. La richesse bactérienne diminue des caeca pyloriques vers l'intestin distal. Des études de richesse et de diversité microbiennes sur leurs caeca pyloriques et sur leur muqueuse intestinale postérieure révèlent que la similitude entre ces différentes portions est en moyenne de 52-68 % (Al-Hisnawi et al. 2015).

Ce paramètre de richesse bactérienne est un indicateur d'importance étant donné qu'il reflète le statut physiologique de l'hôte. Une forte diversité bactérienne a été associée à un avantage biologique, étant donné qu'elle peut être bénéfique pour la stabilité des écosystèmes, comme cela est décrit par 'l'hypothèse de l'assurance' (Yachi and Loreau 1999). Un écosystème, avec une forte diversité d'espèces, dispose d'une forte résilience, par

sa large palette de réponses possibles, face à un stress au sein de son écosystème. Un microbiote avec une richesse bactérienne suffisante est donc considéré comme étant essentiel à un bon état physiologique. Ceci est d'autant plus probable que certaines études ont rapporté une association entre une faible diversité bactérienne et certaines maladies humaines comme l'obésité (Turnbaugh et al. 2009).

Le transit intestinal se déroulant de l'estomac vers l'intestin, il serait possible d'envisager que le microbiote présent dans l'intestin représente une sous partie de celui présent dans l'estomac. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre la composition microbienne de l'estomac et celle de l'intestin (Li et al. 2014).

Chez l'homme, cette stratification antéro-distale du microbiote en densité bactérienne, est expliquée en grande partie par l'existence d'un gradient de pH, d'oxygène, de nutriments carbonés, d'ions, et d'eau, des organes digestifs proximaux vers ceux les plus distaux (Figure 13).

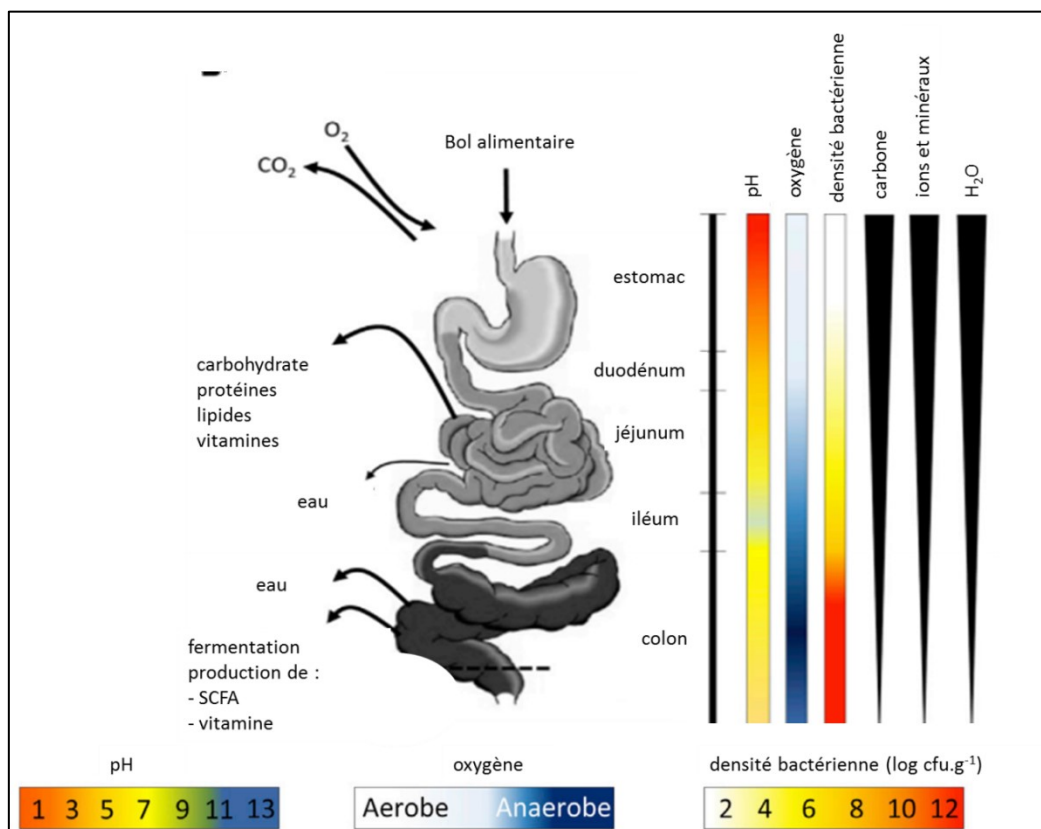


Figure 13 : Organisation spatiale du microbiote intestinal humain et facteurs modulant son implantation

Les flux majeurs de nutriments sont indiqués, ainsi que le gradient de pH, d'oxygène, et de carbone en relation avec la densité bactérienne observée. Adaptation de (Hacquard et al. 2015).

### 1.5.3 Stade de développement et évolution du microbiote

La colonisation microbienne du tube digestif chez les poissons ovipares se fait à partir du premier repas, qui a lieu après l'ouverture de la bouche. Au stade larvaire, après éclosion, et avant l'ouverture de la bouche des larves de truites arc-en-ciel, des bactéries sont déjà présentes sur la larve, mais ont néanmoins été attribuées au microbiote présent dans l'eau dans laquelle se trouvent les œufs et les larves (Ingerslev et al. 2012). Plusieurs études ont déjà suivi l'évolution des communautés bactériennes intestinales en parallèle de l'ontogenèse digestive chez le poisson. Des variations de richesse bactérienne et de  $\beta$ -diversité ont alors été observées.

#### 1.5.3.1 Richesse bactérienne

Chez la plupart des poissons étudiés, la richesse des communautés bactériennes intestinales augmente lors du stade larvaire et alevin puis se stabilise au stade juvénile. Cette évolution a été constatée chez la truite arc-en-ciel soumise à différents régimes (formulation à base d'huile et de farine de poissons et/ou d'origine végétale) (indice : Shannon) (Ingerslev et al. 2014), et chez le carassin argenté (*Carassius gibelio*) nourri avec un aliment commercial (indice : richesse en OTU et diversité phylogénétique) (Li et al. 2017).

Chez la barbotte de rivière (*Ictalurus punctatus*), cette augmentation de richesse bactérienne n'a pas été observée via l'indice de Chao1. Bien qu'il n'y ait pas d'évolution significative entre les différents stades de développement, une augmentation de diversité phylogénétique a néanmoins été observée (Bledsoe et al. 2016). C'est-à-dire que la distance moyenne qui sépare les différentes espèces bactériennes d'une communauté sur un arbre phylogénétique est plus élevée chez les poissons en stade juvénile qu'en stade alevin, autrement dit, la divergence phylogénétique des différents taxons répertoriés s'accroît.

Cette augmentation de richesse bactérienne au cours de l'ontogenèse digestive a été attribuée à la mise en place du tube digestif et à sa maturation progressive. Chez la truite, les glandes de l'estomac sont observables à partir du 20<sup>ième</sup> jour après l'éclosion et deviennent progressivement fonctionnelles, ce qui inclut une étape de digestion à pH acide (Sarıeyyüpoğlu 2000). Au niveau zootechnique, l'ajout de povidone-iodine en tant qu'antifongique et antiseptique (Small 2006) dans les bassins avant l'éclosion, peut également expliquer la faiblesse de richesse observée en début de stade larvaire (Bledsoe et al. 2016).

Il faut cependant noter que des variations inverses de richesse bactérienne ont également été remarquées chez d'autres poissons au cours de l'ontogénie digestive. Chez des poissons carnivores comme la perche chinoise (*Siniperca chuatsi*) et le silure (*Silurus meridionalis*), l'indice de Shannon diminue progressivement du stade larvaire au stade juvénile (Yan et al. 2016), et chez le saumon sauvage, la richesse en OTU diminue aussi avec le développement (Llewellyn et al. 2015). Il n'a pas été relaté que les poissons aient été exposés à un traitement antibiotique ou antifongique, donc ces variations ne sont pas dues à un traitement phytosanitaire.

### 1.5.3.2 $\beta$ -diversité

Des études de  $\beta$ -diversité réalisées sur le microbiote intestinal de poissons omnivores comme le carassin argenté (*Carassius gibelio*) (Li et al. 2017) et carnivores comme la perche chinoise (*Siniperca chuatsi*), le silure (*Silurus meridionalis*) (Yan et al. 2016), la morue (*Gadus morhua*) (Bakke et al. 2015), le saumon (*Salmo salar*) (Llewellyn et al. 2015) montrent que les communautés bactériennes évoluent et se différencient significativement au cours des différents stades de l'ontogénie digestive chez le poisson. L'occurrence et le nombre de transitions observées dépendent de l'espèce de poisson étudiée. Ces modifications des communautés bactériennes sont en grande partie associées au premier repas, à un changement d'alimentation, ou à une modification des conditions environnementales rencontrées dans le tractus digestif. Chez le poisson zèbre, deux transitions ont été observées autour du 33<sup>ème</sup> et du 58<sup>ème</sup> jour suivant l'éclosion, puis les communautés microbiennes intestinales restent relativement stable les dix mois suivants (Li et al. 2017). Chez la barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*) cette transition apparaît aux environs du 125<sup>ème</sup> jour suivant l'éclosion, puis la composition du microbiote se stabilise (Bledsoe et al. 2016). Chez ce dernier poisson, il est noté que la similarité interindividuelle entre les poissons augmentent avec le stade de développement : elle passe en effet de 9,72 % lors du 3<sup>ème</sup> jour après éclosion, à 15,65 % lors du 65<sup>ème</sup> jour après éclosion, et à 66,2 % lors du 125<sup>ème</sup> jour après éclosion, pour redescendre ensuite à 35,5 % lors du 193<sup>ème</sup> jour après éclosion (Bledsoe et al. 2016).

Les modifications de la diversité phylogénétique, au cours des différents stades de développement du poisson, peuvent traduire une sous composante 'non-neutre' ou 'neutre' de certains groupes de taxons. Le processus naturel de dérive et de dispersion étant assez développé pour générer de la diversité phylogénétique au sein du microbiote intestinal des poissons. C'est-à-dire que certains taxons bactériens d'origine environnementale, qui sont

en contact avec la muqueuse intestinale, lors du transit du bol alimentaire, peuvent être préférentiellement sélectionnés du fait des conditions physico-chimiques, présentes dans l'intestin, qui correspondent à leurs besoins métaboliques. Ces taxons peuvent alors être caractérisés comme 'non neutres'. Ils contrastent avec ceux dont la présence est retrouvée aléatoirement au cours du temps dans l'intestin des poissons et dont la distribution est alors caractérisée de 'neutre'. Ces derniers taxons étant sûrement apportés par l'eau des bassins et non sélectionnés de façon préférentielle par les poissons. Cette théorie ne suggère pas pour autant que ces taxons qualifiés de 'neutres' sont dénués d'importance fonctionnelle ou qu'ils n'interagissent pas avec leur hôte. (Burns et al. 2015).

### **1.5.3.3 Modification de l'abondance des principaux taxons bactériens observés**

Les différences observées entre les communautés bactériennes présentes chez les poissons, à différents stades de leur développement, se traduisent également par des modifications de l'abondance en certains taxons bactériens. Les principales modifications des communautés bactériennes ont principalement lieu lors de l'ontogenèse du système digestif, alors qu'une relative stabilité est observée durant le stade juvénile et le stade adulte. Peu d'études rapportent, au sein d'un même article, les modifications du microbiote intestinal observées chez la truite entre ses principaux stades de développement (larve, alevin, juvénile, adulte). Les modifications du microbiote intestinal seront donc décrites chez d'autres espèces de poissons.

Chez la carpe (*Carassius auratus gibelio*), qui est un poisson omnivore, le microbiote intestinal est dominé, lors du premier mois qui suit l'éclosion, par des Protéobactéries appartenant au genre des *Acinetobacter*, *Serratia*, *Shewanella* et *Aeromonas*, dont l'origine est attribuée à l'environnement des poissons. Puis durant le deuxième mois suivant l'éclosion, les Protéobactéries rencontrées sont davantage composées de bactéries appartenant au genre des *Roseomonas*, *Catellibacterium*, *Ensifer* et *Bose*. Après ce deuxième mois, le microbiote change et se stabilise au moins pendant les dix mois qui suivent. Les Protéobactéries ne dominent plus la communauté, les Firmicutes et les Fusobactéries sont également très présentes. Les principaux genres qui composent le microbiote appartiennent alors au genre des *Cetobacterium*, *Holdemania*, *Lactococcus* et *Staphylococcus*. Différents environnements, aux conditions physico-chimiques particulières, rencontrés dans le tractus digestif à ces deux stades sont suspectés de favoriser la présence de ces taxons. Cependant, leur identification n'a pas encore été déterminée (Li et al. 2017). Chez la barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*), qui est également un poisson omnivore, les Fusobactéries sont également rencontrées une fois le stade larvaire franchit. (Bledsoe et al. 2016).

Une évolution des profils taxonomiques existe également chez les poissons carnivores, cependant certaines tendances inverses sont rapportées, notamment en ce qui concerne l'abondance en Firmicutes. Chez la perche chinoise (*Siniperca chuatsi*), et chez le silure (*Silurus meridionalis*), les Firmicutes sont majoritaires jusqu'au 18<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, avec une forte présence en bactéries appartenant au genre des *Lactococcus*, *Leuconostoc*, et *Weisella*. Puis, suite au développement de l'estomac, leur dominance s'efface au profit de celle des Protéobactéries et des Fusobactéries chez les adultes. (Yan et al. 2016).

Chez la morue (*Gadus morhua*), qui est un poisson carnivore de mer, des communautés bactériennes avec différents profils taxonomiques ont été observées entre l'éclosion et les 60 jours qui suivent. Huit jours après l'éclosion, des *Pseudomonas* de la classe des Gammaprotéobactéries sont observées en forte proportion, ainsi que des Bétaprotéobactéries et des *Bacilli* de la classe des Firmicutes en plus faible abondance. La composition du microbiote change de façon importante au 17<sup>ième</sup> jour qui suit l'éclosion, et comme chez le silure et la perche chinoise, l'abondance des Firmicutes baisse de façon importante. Les *Arcobacter* de la classe des Epsilonprotéobactéries, les *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, et les *Oceanospirillaceae* de la classe des Gammaprotéobactéries dominent nettement et constituent jusqu'à 98 % des séquences étudiées lors de la description du microbiote par métagénomique. Puis, 61 jours après l'éclosion, des Gammaprotéobactéries appartenant au genre des *Colwellia*, *Photobacterium*, *Leucothrix*, *Vibrio*, et *Pseudomonas* sont très présentes (Bakke et al. 2015). Ces modifications du profil bactérien ont été attribuées à des changements physiologiques qui s'opèrent lors de l'ontogenèse digestive, et qui créent des environnements physico-chimiques différents au sein du système digestif : à l'éclosion, le tube digestif de la larve n'est composé que d'un tube (Kjørsvik et al. 2004), ce qui n'offre que peu de niches écologiques différentes aux bactéries, et l'estomac n'est pas encore fonctionnel, ce qui ne crée pas de variation de pH importante au sein de l'environnement digestif. Puis, à partir du douzième jour après l'éclosion, l'intestin s'allonge et adopte des circonvolutions, et les capacités digestives se mettent en place (Kjørsvik et al. 2004; Wold et al. 2009). Les sécrétions pancréatiques et biliaires rejoignent également le contenu digestif. Ensuite, à partir du 24<sup>ième</sup> jour, les microvillosités des cellules de l'intestin se développent, et comportent des enzymes digestives, et l'estomac se développe et devient fonctionnel.

Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), qui est un poisson carnivore très utilisé comme matériel biologique d'étude, en raison de la simplicité de son élevage et de la rapidité de son cycle de reproduction, des changements de profil taxonomique du microbiote ont également été observés lors de son développement. Différents stades ont été observés : le stade larvaire (de 4 à 10 jours après l'éclosion), juvénile (de 21 à 35 jours après l'éclosion) et adulte (à partir du 75<sup>ième</sup> jour après l'éclosion). De fortes différences de composition taxonomique des différentes classes de bactéries rencontrées au sein des Protéobactéries ont été observées. Les Bétaprotéobactéries étant largement spécifiques du stade juvénile, d'après une analyse statistique de Lefse. En parallèle, du changement de régime alimentaire donné aux poissons à partir du 21<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, l'abondance en Alphaprotéobactéries augmente de façon importante, puis chute à partir du 28<sup>ième</sup> jour après l'éclosion. Chez ce poisson, les Fusobactéries sont également plus abondantes au stade adulte qu'aux stades antérieurs, (notamment avec la présence de bactéries du genre *Cetobacterium*), bien qu'elles soient observées également chez la larve. Le microbiote intestinal du stade adulte se caractérise également par sa faible abondance en bactéries de la famille des *Bacteroidaceae* (Stephens et al. 2015).

#### **1.5.4 Fonctionnalité du microbiote intestinal**

##### **Implication dans la maturation de l'épithélium intestinal**

Comme exposé précédemment (*cf.* § 1.5.2.1 stratification radiale), l'intestin postérieur est constitué de deux couches de mucines, une couche supérieure qui apporte les nutriments nécessaires au développement microbien, et une couche inférieure associée à l'épithélium intestinal qui, par sa densité, est relativement exempte de bactéries (Figure 11) (Ijssennagger et al. 2016). La couche supérieure de mucus est constituée de différentes mucines (N-Acétylgalactosamine, N-Acetylglucosamine) ramifiées par des résidus de fucose et d'acide sialique. Le profil des différentes mucines présentes dans le mucus, ainsi que la capacité des différentes bactéries à les métaboliser, expliquent en partie la composition du microbiote intestinal (Tong et al. 2014; Tailford et al. 2015). Les micro-organismes du microbiote dégradent ces mucines, ce qui influence alors la transcription de leurs gènes : Tff3, MUC1, MUC2, et MUC3 et également des gènes codant pour des glucosyltransférases (Rokhsafat et al. 2016). Le profil et l'épaisseur de la couche de mucus intestinal sont donc indirectement orientés par le microbiote intestinal, ce qui a ensuite une incidence sur son rôle de film protecteur (Figure 14).

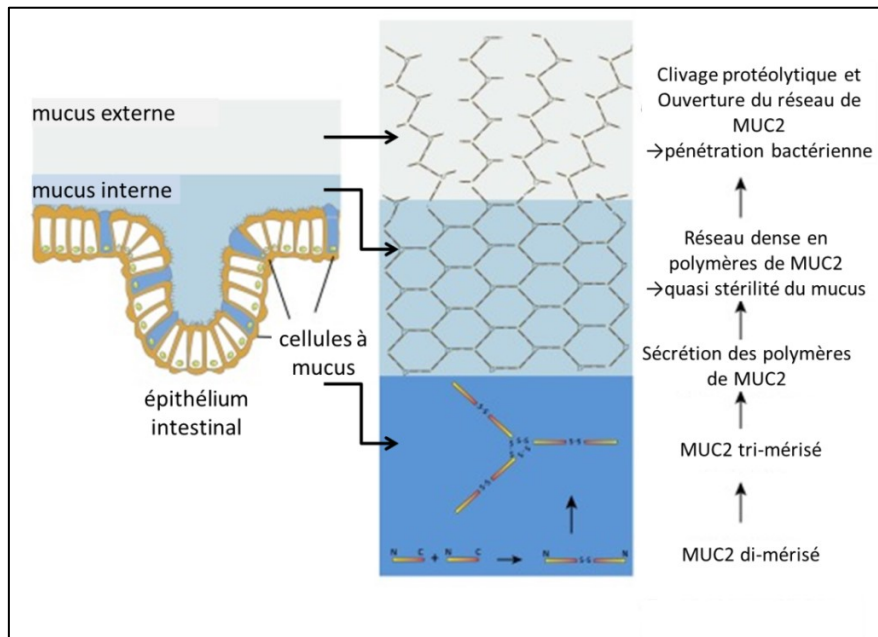


Figure 14 : Assemblage de mucines (MUC2) de la couche de mucus externe et interne de l'intestin distal  
 Source : adaptation de (Ijssennagger et al. 2016)

Bien qu'un microbiote attribuable au milieu entourant les œufs de truite soit détecté en stade larvaire, avant l'ouverture de la bouche et du premier repas, le profil du microbiote observé change significativement après le premier repas (Ingerslev et al. 2012). La modification des communautés microbiennes au stade larvaire se fait simultanément à la métamorphose et à la maturation intestinale. Une maturation digestive se met tout d'abord en place lors du sevrage, lorsque le poisson s'approvisionne en énergie et nutriments à partir de la nourriture qu'il ingère, et non plus par résorption de sa vésicule vitelline. Ce sevrage se manifeste par un changement du type de mucine dans l'intestin. Le mucus devient moins riche en mucine sialylée mais plus riche en mucine fucosylée. Ce changement dans la nature des glucines de l'hôte représente un changement de substrats fermentescibles pour le microbiote intestinal, ce qui se manifeste par une modification de la communauté bactérienne (Zhang et al. 2015; Rokhsafat et al. 2016). La maturation de l'épithélium transparait également au travers de l'expression de certains gènes codant pour des enzymes localisées sur la membrane apicale des entérocytes (bordure en brosse), ainsi qu'au travers du profil des cellules présentes sur l'épithélium intestinal. La phosphatase alcaline est une enzyme de la bordure en brosse qui est notamment impliquée dans la détoxification du lipopolysaccharide (LPS) issu de la paroi bactérienne des bactéries gram-négatives. Chez le poisson zèbre, l'expression du gène de la phosphatase alcaline est induite par le LPS (lipopolysaccharide constituant de la membrane bactérienne) (Yang et al. 2015).



Enfin, le microbiote favorise le renouvellement intestinal qui se fait à partir des cellules souches, précurseurs des entérocytes, et qui sont situées au fond des cryptes intestinales. Bien que décrite comme essentiellement stérile (cf. § 1.5.2 compartimentation du microbiote au sein du tube digestif de la truite), la couche interne de mucus, notamment celle qui est localisée au fond des cryptes intestinales, n'est pas totalement exempte de bactéries. La présence d'*Acinetobacter*, des bactéries gram-négatives strictement anaérobies, à la base des cryptes intestinales du colon de souris, constitue un premier témoignage de l'implication du microbiote sur le turnover cellulaire présent au niveau de ces cryptes. Cette hypothèse a été émise, à la suite de l'observation d'une réduction du renouvellement entérocytaire chez des souris axéniques et à l'inverse d'une augmentation d'un facteur 10 de l'expression de la colipase intestinale (une enzyme synthétisée par les cellules intestinales différenciées), après la colonisation du mucus présent au niveau des cryptes intestinales par des bactéries de l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicrons*. L'induction de cette régénération intestinale pourrait se faire via les récepteurs membranaires 'toll like receptors' (TLR) localisés sur la bordure en brosse. Cette implication du microbiote dans la différenciation des cellules des cryptes intestinales a des répercussions sur la digestion, avec à titre d'exemple l'activation indirecte des lipases pancréatiques par les colipases (Serino et al. 2014). Il a également été observé que des prébiotiques peuvent modifier la différenciation de cellules souches précurseurs, qui sont présentes au niveau des cryptes intestinales, notamment en cellules entéro-endocriniennes qui sont impliquées dans une régulation du transit intestinal.

Bien que cela n'ait pas encore été largement étudié chez le poisson, l'implication du microbiote dans la maturation digestive, est également présente au niveau du métabolisme intestinal. Le microbiote y contribue en effet, en favorisant la production de l'acide aminé glutamate, qui est la principale source d'énergie des cellules intestinales, via un échange de métabolites entre entérocytes et bactéries de la communauté intestinale (Blachier et al. 2009; Burrin and Stoll 2009).

#### **1.5.4.1 Rôle dans la maturation du système immunitaire**

Le microbiote contribue à la maturation du système immunitaire. Des challenges infectieux réalisés sur des truites montrent, par exemple, que l'administration de probiotiques améliore significativement leur résistance aux infections à *Streptococcus iniae* (Safari et al. 2016). L'augmentation du niveau plasmatique en immunoglobuline M, du niveau de métabolisme oxydatif, et de la teneur en leucocytes sanguins, par l'administration de

probiotiques dans l'aliment, peut expliquer cette meilleure résistance aux bactéries pathogènes. Les mécanismes impliqués dans cette protection incluent également la production de composés anti-microbiens par le microbiote commensal et la compétition pour des sites d'adhésions intestinaux et pour des nutriments métabolisables. Par exemple chez l'être humain la récente découverte de la bactérie *S. lugdunensis*, présente dans les fosses nasales, a montré que cette bactérie était capable de combattre la bactérie *Staphylococcus aureus*, multirésistante aux antibiotiques, grâce à la production d'un composé antimicrobien dénommé lugdunin (Lewis and Strandwitz 2016). La caractérisation des microbiotes intestinaux présents chez les poissons de fermes d'aquaculture et à l'état sauvage dans les rivières, pourrait donc être bénéfique pour identifier des bactéries capables de restreindre l'implantation de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Ce qui pourrait contribuer à une meilleure compréhension des différents statuts sanitaires rencontrés en aquaculture, mais pourrait également aider à implanter un éventail de bactéries utilisées comme probiotiques. Chez la truite arc-en-ciel, les souches potentiellement candidates pour assurer un rôle de probiotique sont sélectionnées sur leur aptitude à induire une maturation immunitaire, se traduisant par une élévation plasmatique à court et long terme en facteur du complément C3, en immunoglobulines IgM et en lysozyme. De potentiels candidats tel que *Enterococcus casseliflavu* (phyla : Firmicutes, classe : Bacilli) ont ainsi été proposés comme probiotiques chez la truite arc-en-ciel (Adel et al. 2016).

Les levures ont également la faculté de faire office de probiotiques, car certaines peuvent stimuler la prolifération de souches bactériennes comme les bactéries lactiques aux propriétés immunomodératrices. De plus, la paroi des levures est constituée d'homopolysaccharides osidiques reliés par des liaisons glycosidiques et de mannanes qui sont de puissants stimulants immunitaires chez le poisson (Adel et al. 2016).

L'exploration des mécanismes à l'origine de la consolidation des défenses immunitaires va jusqu'au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II- $\beta$  (CMH II- $\beta$ ) chez la truite. Il a été observé, via l'étude du polymorphisme présent sur certains nucléotides de la séquence du gène codant pour le complexe CMH II- $\beta$ , que chez une population de truites exposées à des souches ayant la propriété d'entraîner des lactococoses, certaines truites, significativement plus résistantes au challenge infectieux, étaient porteuses d'haplotypes particuliers caractérisés par le polymorphisme de certains nucléotides (SNP, 'single nucléotide polymorphisme'). Ces résultats prometteurs promouvoient l'introduction de l'haplotype identifié sur la séquence du gène codant pour le complexe CMH II- $\beta$  comme biomarqueur de sélection pour la résistance au lactococose (Colussi et al. 2015). Il a

également été observé que la protection intestinale contre les agents infectieux se manifeste par une augmentation de la densité en cellules à mucus au niveau de l'épithélium intestinal. Ainsi chez la truite, en plus d'induire une production plasmatique en facteur du complément, de lysosyme, et de métabolisme oxydatif, le LPS bactérien augmente la densité intestinale des cellules à mucus, ce qui maintient une barrière protectrice sur l'épithélium (Skalli et al. 2013).

En revanche les acteurs de la réponse immunitaire acquise tels les leucocytes et les immunoglobulines M, sécrétés par les lymphocytes apparaissent progressivement après l'éclosion des alevins, ce qui rend ce stade fragile. L'immunité innée est donc particulièrement importante chez les jeunes poissons (Castro et al. 2013).

#### **1.5.4.2 Synthèse des vitamines**

Certaines bactéries de la flore digestive apportent un avantage écologique à leur hôte en synthétisant des vitamines. Il a par exemple été remarqué que l'administration, par voie orale, de la bactérie *Lactobacillus rhamnosus* au poisson clown (*Amphiprion ocellaris*) induit une augmentation de la transcription des gènes codant pour des récepteurs de la vitamine D, et du récepteur d'acide rétinoïque RAR de la vitamine A. L'activation de ces récepteurs engendre alors une cascade de réactions qui aboutit à des effets bénéfiques pour la croissance du poisson. Les récepteurs de la vitamine D (RVD) et de l'acide rétinoïque sont d'ailleurs utilisés comme biomarqueurs du développement chez le poisson (Avella et al. 2010).

Chez la carpe, le microbiote intestinal comporte des bactéries affiliées aux Bacteroidetes de type A, qui sont des bactéries productrices de vitamines B<sub>12</sub>. Bien que cette vitamine soit souvent intégrée de façon systématique dans les suppléments vitaminiques incorporés dans les aliments pour poisson, il a été décrit que son incorporation n'était pas nécessaire chez les poissons hébergeant des Bacteroidetes de type A au sein de leur microbiote intestinal. En revanche ces bactéries ne sont pas rencontrées dans le microbiote intestinal de l'anguille japonaise *Anguilla japonica*, dont l'alimentation doit être complétée en vitamine B<sub>12</sub> (Sugita et al. 1991; Tsuchiya et al. 2008).

Chez les humains, il a été démontré que la flore intestinale est capable de synthétiser de la vitamine K ainsi que de nombreuses vitamines du groupe B comme la biotine (vitamine B<sub>8</sub>), la cobalamine (vitamine B<sub>12</sub>), les folates, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique, la pyridoxine, la riboflavine et la thiamine. A contrario des vitamines apportées par l'aliment, qui sont absorbées au niveau de l'intestin proximal, les vitamines

synthétisées par la flore digestive, le sont au niveau du colon. Enfin, de nombreuses bifidobactéries ont la particularité de convertir de nombreux nutriments en acide linoléique conjugué ou en autres vitamines (Leblanc et al. 2013).

#### 1.5.4.3 Apport d'enzymes digestives

De nombreuses observations réalisées chez le poisson démontrent que le microbiote contribue à la digestion des différents nutriments et à la capacité de dégrader certains facteurs antinutritionnels présents dans le bol alimentaire. La cellulose qui est un polymère de glucose relié par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$  1-4 peut être hydrolysée en plus courts fragments par les cellulases d'origine bactérienne. Certaines Protéobactéries, et Firmicutes tel que les *Bacillus* et les *Aeromonas* ont la faculté de digérer la cellulose grâce à leur cellulase, et de libérer alors des saccharides (Ray et al. 2012). Bien que les poissons ne disposent pas d'un patrimoine génétique leur permettant de produire des cellulases de façon endogène, leur production peut se faire via le microbiote intestinal (Kuz'mina et al. 2015). Ainsi, une réduction de l'activité cellulosique intestinale a été observée chez les poissons ayant reçu un traitement antibiotique à base de tétracycline dirigé contre les *Streptococcus* et les *Mycoplasma* (Das and Tripathi 1991). Des propriétés amylolytiques de la microflore intestinale ont également été constatées chez la carpe *Ctenopharyngodon idella* (Das and Tripathi 1991; Ray et al. 2012). Chez l'hippocampe, des études d'activité enzymatique indiquent que les isolats bactériens obtenus à partir de leur flore digestive ont la capacité de dégrader les lipides, la cellulose, le xylane, l'amidon et les protéines.

Chez l'alose de la rivière indienne Gudusi, certaines souches de bactéries de la flore digestive, similaires aux *Bacillus substilis* et *Bacillus atrophaeus*, apportent des phytases permettant de libérer le phosphore sous forme phytique apporté par les végétaux (Khan and Ghosh 2012).

Des tannases, capables d'hydrolyser les liaisons ester des tanins présents dans les végétaux, peuvent être apportées par les bactéries *Enterobacter asburae*, *Pichia kudriavzevii*, et *Candida parapsilosis* du microbiote intestinal présent dans l'intestin distal des poissons. Les effets antinutritionnels des tanins peuvent alors être contrés (Mandal and Ghosh 2013).

Finalement, il a été observé, chez les poissons, que le profil métabolique de la flore digestive est fortement relié au type de nutriments ingérés. Il existe effectivement une plus forte densité en bactéries de types protéolytiques chez les poissons carnivores, et davantage de bactéries aux propriétés cellulolitiques chez les herbivores (Tanu et al. 2012). Cette

relation entre la nature du régime alimentaire du poisson et le substrat métabolique préférentiellement utilisé par les bactéries, n'est pas systématiquement retrouvée au niveau du microbiote associé à la muqueuse digestive, et reste à étudier davantage. Une étude menée par culture bactérienne, sur des milieux enrichis en métabolites particuliers comprenant de l'amidon, de la carboxyméthylcellulose, et du tryptone, inoculée par de la muqueuse digestive, chez la perche (*Anabas testudineus*) qui est un poisson omnivore ou chez le poisson chat (*Clarias batrachus*), qui est un poisson carnivore, apporte des éléments de réponse sur les préférences métaboliques de ces bactéries. Certaines souches bactériennes, appartenant au genre des *Bacillus* (Firmicutes), disposent d'une plus importante capacité d'activité enzymatique de type cellulolitique qu'amylasique ou protéasique, bien que toutes les souches des bactéries observées aient démontré d'une hydrolyse pour les trois différents substrats (Banerjee et al. 2015).

#### 1.5.4.4 Synthèse d'acides gras libres à courte chaîne SCFA

Certaines bactéries du microbiote intestinal synthétisent des SCFA, principalement constitués d'acétate, de propionate et de butyrate (Stevens and Hume 1995) (Figure 15). Ce sont les produits finaux de la fermentation des glucides par les bactéries. Les régimes alimentaires composés de farine d'origine végétale et comportant des fibres, de la cellulose, de l'amidon (Ringø et al. 2016), du fructose, du glucose, et du mannitol (Seeto et al. 1996) apportent au microbiote les principaux substrats permettant la synthèse de SCFA. La chromatographie en phase gazeuse permet d'évaluer la teneur en SCFA et a été utilisée pour évaluer leur teneur au sein du contenu intestinal de l'esturgeon (*Acipenser baerii*). La production d'acétate y a été observée et reliée à la présence de *Clostridium* et de LAB (Geraylou et al. 2013).

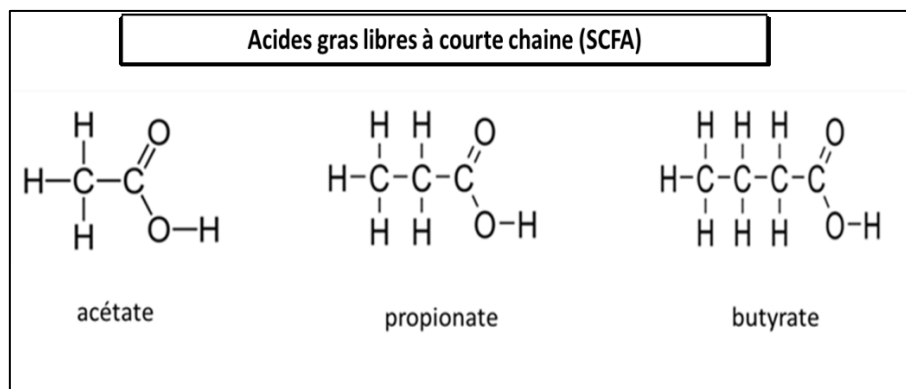


Figure 15 : Structure chimique des principaux acides gras libres à courte chaîne (SCFA) synthétisés par les bactéries du microbiote intestinal.

Les récepteurs de SCFA couplés à des protéines G (GPR43 et GPR41) en sont des récepteurs. L'activation du récepteur GPR43 contribue à la régulation du métabolisme intestinal et des tissus adipeux (Inoue et al. 2014; Kimura et al. 2014). Leur expression et leur fonctionnalité ont déjà été rapportées chez les mammifères, cependant leur implication chez le poisson reste à démontrer. La présence de séquences codantes pour les gènes GPR43 et GPR41 a été observée sur le génome du poisson zèbre (*Danio rerio*), mais leur expression n'a pas encore été rapportée (Montalban-Arques et al. 2015). Déterminer la contribution des SCFA à la physiologie du poisson pourrait pourtant être utile. En effet, chez l'humain, l'acide propionique active les récepteurs GPR43 et GPR41 et induit une baisse de la stéatose hépatique, du taux d'acide gras libre sanguin, et améliore la sensibilité à l'insuline (Al-lahham et al. 2010), et le butyrate, via son récepteur nucléaire PPAR, induit la synthèse d'angiopoïétine like 4 (ANGPTL4), qui est un inhibiteur de la lipase pancréatique (Korecka et al. 2013). Le butyrate agit également sur l'absorption intestinale du glucose, puisqu'il augmente l'abondance du transporteur GLUT2, d'après des études menées sur des cultures cellulaires intestinales (Mangian and Tappenden 2009). De plus, certains acides gras libres dont le butyrate, sont des inhibiteurs des histones déacétylases, ce qui laisse à penser que le microbiote intestinal participe à la régulation épigénétique de la transcription de certains gènes de l'épithélium intestinal (Takahashi et al. 2011).

#### **1.5.4.5 Protection contre les bactéries pathogènes**

Du fait de leur présence sur le mucus intestinal, les bactéries commensales du microbiote intestinal protègent l'épithélium d'une invasion par des bactéries pathogènes, par exclusion compétitive. Le microbiote stimule la production de facteurs de l'immunité innée tel que les peptides antimicrobiens, le lysozyme, les facteurs du complément, les transferrines, les pentraxines, les lectines, les antiprotéases, les anticorps, et les cytokines. Il inhibe aussi l'expression de gènes de virulence chez les bactéries pathogènes, et produit des bactériocines aux propriétés bactériostatiques pour les bactéries pathogènes (Gómez and Balcázar 2008).

#### **1.5.4.6 Contribution au rythme circadien de l'épithélium intestinal**

Chez la souris, le profil des communautés microbiennes du microbiote présente des oscillations journalières au niveau des bactéries qui le composent, ainsi qu'au niveau de son activité métabolique. Ces variations sont associées à la nature du régime alimentaire, au transit intestinal ainsi qu'au rythme circadien de l'hôte. Une interaction entre l'hôte et son

microbiote se met en place, comme en témoigne la modulation, au niveau des hépatocytes, de l'expression des gènes de l'horloge circadienne par les acides gras libres à courte chaîne produits par le microbiote. En conséquence, des variations des communautés microbiennes de la flore intestinale, par un changement de régime alimentaire, perturbent le rythme de transcription circadien de l'hôte (Leone et al. 2015; Murakami et al. 2016). Réciproquement, chez la souris, la suppression d'expression des gènes du rythme circadien tel que *Bmal1* conduit à une dysbiose intestinale (Liang et al. 2015).

#### **1.5.4.7 Impact sur les voies métaboliques de l'épithélium intestinal**

Le profil des communautés microbiennes du microbiote intestinal a un impact sur certaines voies métaboliques intestinales et hépatiques de son hôte. Il a par exemple été observé, chez la souris, que le microbiote intestinal régule, au niveau hépatique, la synthèse du cholestérol (Caesar et al. 2016), ainsi que la lipogenèse à partir de monosaccharides. Chez le poisson zèbre, le profil de la communauté bactérienne de la flore digestive maternelle a une incidence sur l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes d'autophagie et le développement des embryons (Miccoli et al. 2015). Il a également été constaté que les Firmicutes du microbiote intestinal sont impliqués dans l'absorption des lipides. Chez la carpe, une alimentation riche en ray-grass engendre une augmentation du métabolisme du fructose, du mannose, du pyruvate, et des acides gras, ainsi qu'une augmentation de l'anabolisme de nombreux acides aminés. Le ray-grass étant pauvre en protéines, ce métabolisme laisse à penser que le microbiote contribue à la synthèse d'acides aminés à partir des nutriments glucidiques du ray-grass (Ni et al. 2014).

### **1.5.5 Variables capables de favoriser certaines espèces microbiennes**

De nombreux facteurs environnementaux ainsi que le phénotype issu du génotype de l'hôte (Goodrich et al. 2016) influencent la composition microbienne du microbiote intestinal chez les mammifères, les oiseaux, les poulets et les poissons. Les facteurs environnementaux les plus fréquemment impliqués chez le poisson sont l'alimentation (Sullam et al. 2012b), la température, la salinité de l'eau, et la zone géographique de prélèvement pour les poissons sauvages.

#### **1.5.5.1 L'alimentation**

La nature du régime alimentaire a un impact sur la diversité du microbiote intestinal, car chez les mammifères et chez certains poissons, cette diversité augmente lors du passage d'un régime carnivore strict à un régime omnivore puis herbivore (Ley et al. 2008; Steven et

al. 2009). Plusieurs études ont permis d'observer les effets du remplacement de la farine de poisson, qui sont assez variables, suivant l'espèce considérée. Les principales études réalisées chez la truite arc-en-ciel sont rapportées dans le Tableau 5. Le type de microbiote décrit, microbiote de l'intestin antérieur versus distal, ou contenu intestinal versus muqueuse, étant variable, ainsi que la méthode utilisée pour le caractériser.

Chez la daurade, il n'a pas été noté de modifications sur le microbiote de l'estomac et de l'intestin, suite à l'apport en farine de lupin et de colza en substitution partielle de la farine de poisson (Silva et al. 2011). Cependant, son remplacement total par un mélange de farine de soja, de pois et de tournesol conduit à une baisse significative de l'abondance en Firmicutes du genre *Streptococcus* et *Lactobacillus*, et à une augmentation significative des bactéries du genre *Photobacterium* et *Pseudomonas* (Estruch et al. 2015). Chez la truite, une inclusion de soja à hauteur de 30 % engendre une réduction significative de l'abondance en Proteobactéries, et une augmentation des Firmicutes (Desai et al. 2012). Chez le saumon, son inclusion à hauteur de 20 % augmente l'abondance en *Lactococcus lactis subsp* (Firmicutes) dans le petit intestin et réduit celle en *Weissella confusia* (Firmicutes) dans l'intestin distal. Il a été rapporté que la modification de microbiote intestinal pouvait contribuer à l'inflammation distale de l'intestin observée par l'inclusion de soja dans l'aliment (Reveco et al. 2014).

Les effets provoqués par le remplacement des huiles de poisson par des huiles d'origine végétale ont également été étudiés. Chez la truite, d'après une étude rapportée par Navarrete (2012), une substitution de la moitié de l'huile de poisson par de l'huile de colza réduit tout d'abord la richesse bactérienne du microbiote de la lumière intestinale, ainsi que l'abondance en Bacteroidetes (Navarrete et al. 2012a). Chez la souris, une alimentation riche en acides gras poly-insaturés de type oméga 6 (n-6 PUFA) diminue l'abondance en Bacteroidetes et Firmicutes (Ghosh et al. 2013).



Tableau 5 : Caractérisation du microbiote intestinal chez la truite arc en ciel élevée dans différentes conditions de température et de régime alimentaire.

Etude: (A) par culture bactérienne, (B) par culture bactérienne et biologie moléculaire, (C) par biologie moléculaire

<b>A</b>	<b>Culture</b>	<b>Méthode</b>	<b>Site intestinal</b>	<b>Niveau Intestinal</b>	<b>Température</b>	<b>Poids des poissons</b>	<b>Régime alimentaire</b>	<b>Référence</b>
	<b>bacterienne</b>	<b>d'identification</b>						
	ns et s	c.c	muqueuse	entier	17°C	150 g	C ± a	Naviner (2007)
	ns et s	c.c	contenu	distal	23°C	110 g	FM ±VM	Giannenas (2012)
	ns et s	c.c	contenu	distal	11-17°C	150 g	C ± pre	Ortiz (2013)
	s	c.c et statut anti-oxidant	contenu	distal	23°C	113 g	C ± p	Giannenas (2015)
	ns et s	c.c et capacité métabolique	nd	nd	11°C	3 g	C ± p	Koca (2015)
<b>B</b>	<b>Culture</b>	<b>Méthode</b>	<b>Site intestinal</b>	<b>Niveau Intestinal</b>	<b>Température</b>	<b>Poids des poissons</b>	<b>Régime alimentaire</b>	<b>Référence</b>
	<b>bacterienne</b>	<b>d'identification</b>						
	ns	DGGE	contenu	distal	12-18-20°C	85 g	nd	Huber I (2004)
	s	ARDRA	contenu + muqueuse	distal	11°C	13 g	C ± p	Aubin J (2005)
	s	c.c -API - ER	contenu + muqueuse	distal	7-11°C	300 mg- 1 g	C ± p	Waché Y (2006)
	ns et s	API - LH PCR	contenu + muqueuse	distal	15°C	8 à 265 g	FM ±VM	Heikkinen J (2006)
	ns	DGGE	contenu	entier	11-16°C	40 à 110 g	C ± pre	Dimitroglou (2009)
	ns	DDGE et séquençage	contenu + muqueuse	antérieur & distal	15-16°C	100 g	C	Merrifield (2009)
	ns	séquençage	contenu + muqueuse	antérieur & distal	15°C	270 g	FM ±VM	Merrifield (2009)
	ns	TTGE et RFLP	contenu	nd	15°C	15 g	C	Navarrete (2010)
	s	NGS	contenu + muqueuse	entier	12°C	100 mg à 1 g	FM-FO ± VO, ± p	Ingerslev (2014)
	ns	NGS	muqueuse	entier	12°C	100 mg à 1 g	FM-FO ± p, ± VO-	Ingerslev (2014)
	ns et s	c.c et NGS	contenu + muqueuse	entier	14-16°C	nd : larve à adulte	C	Araújo (2015)

*milieux de culture* : s : spécifique / ns : non spécifique

*méthodes d'identification* : API : ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés  
ARDRA : amplified ribosomal / DNA restriction analysis / c.c : comptage de colonies / DGGE : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant / ER : enzyme de restriction / NGS : New Generation Sequencing / RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction / TTGE : électrophorèse sur gel en gradient de température

*régime alimentaire* : FM : farine de poisson/ VM : farine végétale / FO : huile de poisson / VO : huile végétale / C : commercial / p : probiotique / pre : prébiotique / a : antibiotique  
*nd* : non déterminé

°C

Méthode d'identification	Site intestinal	Niveau Intestinal	Température	Poids poisson	Régime alimentaire	Référence
DGGE	contenu + muqueuse	distal	nd	25 g	nd	Kim (2007)
séquençage	contenu	médial & distal	15°C	700 g	FM ±VM	Mansfield (2010)
DGGE	contenu	distal	15°C	1000 g	FM ±VM	Desai (2012)
DGGE	contenu	nd	nd	nd	nd	Cecchini (2012)
TGGE	contenu	distal	9°C	170 g	FM-FO ± VO-VM	Navarrete (2012)
RFLP	nd	distal	13°C	44 g	C ± p	Gisbert (2013)
DGGE	contenu	entier	12°C	8 g	FM - FO ± immunostimulant	Jaafar (2013)
DGGE	contenu + muqueuse	entier	17°C	16 g	C ± p	Ramos (2013)
DGGE	contenu + muqueuse	entier	18°C	4 g	HP - LP	Geurden (2014)
DGGE	muqueuse	distal	7-14°C	90 g	C ± p	Ozorio (2015)
NGS	muqueuse	nd	nd	720 à 750 g	C	Etyemez (2015)
NGS	muqueuse	antérieur & distal	13°C	250 g	nd	Lowrey (2015)
DGGE	muqueuse	distal	8-14°C	110 à 225 g	C ± p	Ozorio (2016)
NGS	contenu + muqueuse	distal	nd	191 g	FM	Lyons (2015)

*milieux de culture* : s : spécifique / ns : non spécifique

*méthodes d'identification* : API : ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés  
ARDRA : amplified ribosomal / DNA restriction analysis / c.c : comptage de colonies / DGGE : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant / ER : enzyme de restriction /  
NGS : New Generation Sequencing / RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction / TTGE : électrophorèse sur gel en gradient de température

*régime alimentaire* : FM : farine de poisson/ VM : farine végétale / FO : huile de poisson / VO : huile végétale / C : commercial / p : probiotique / pre : prébiotique / a : antibiotique

*nd* : non déterminé

### 1.5.5.2 Le génotype de l'hôte

Diverses études, chez le poisson, ont démontré que le génotype de l'hôte contribue significativement à la sélection de certains taxons bactériens dans les communautés bactériennes intestinales. D'après les résultats de deux études menées chez la carpe, l'influence du génotype de l'hôte est détectable dès le stade larvaire et perdure au stade adulte (Li et al., 2012; Li et al., 2015). La caractérisation des communautés microbiennes intestinales, par DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) sur des tractus intestinaux entiers de larves de carpes de 4 jours, et par pyroséquencage 454 sur des contenus intestinaux de carpes adultes d'espèces différentes : carpes argentées (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpes de roseaux (*Ctenopharyngodon idellus*), carpes à grosse tête (*Hypophthalmichthys nobilis*), et carpes à la lune (*Carassius cuvieri*), alimentées avec un aliment commercial et élevées dans un même environnement, montre que les différentes espèces de carpes hébergent des microbiotes différents.

L'importance du génome de l'hôte sur la sélection de son microbiote intestinal a également été relatée sur des poissons sauvages. D'après des analyses réalisées sur des épinoches (*Gasterosteus aculeatus*) prélevées dans 10 localités différentes, au niveau de deux estuaires au Canada, la divergence entre les communautés microbiennes intestinales des poissons s'est avérée d'autant plus importante que la distance génétique entre les populations, évaluée sur la base de marqueurs micro-satellites, est élevée (Smith et al. 2015).

La comparaison du microbiote intestinal, par PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), sur des amplicons d'ARNr 16S, amplifiés à partir de contenu intestinal de frères et sœurs de truites issues de différentes familles, laisse à penser que le patrimoine génétique de l'hôte exerce une influence sur la composition de la communauté bactérienne présente dans la lumière intestinale. Une abondance plus importante en *Delftia acidovorans*, *Kocuria*, *Ralstonia* sp., *Sphingomonas* sp. *Streptococcus iniae*, *Rothia*, *Fusobacterium nucleatum* et en *Enterobacteriaceae* a en effet été observée chez certaines familles de truites (Navarrete et al. 2012a).

Ce constat sur le déterminisme du génotype de l'hôte dans la sélection de son microbiote intestinal, a été également rapporté chez de nombreux mammifères comme la souris et l'homme (Zoetendal et al. 2001). Des études d'association pangénomique (GWAS, Genome wide association studies) ont révélés que certaines taxonomies bactériennes sont corrélées à certains gènes de leur hôte (Goodrich et al. 2016).

## **OBJECTIFS**



## 2 OBJECTIFS

Lorsqu'elle est réalisée à des taux élevés, la substitution des farines et des huiles de poisson par des farines et des huiles d'origine végétale, est souvent suivie d'une détérioration de la digestibilité des principaux nutriments de l'aliment (Santigosa et al. 2011b), de certaines capacités digestives des truites (Romarheim et al. 2006; Santigosa et al. 2008; Santigosa et al. 2011b; Wulff et al. 2012) et de leur performance de croissance (Gómez-Requeni et al. 2005; Santigosa et al. 2008; Hua and Bureau 2012), ainsi que d'une modification de leur microbiote intestinal (Merrifield et al. 2009). Les effets d'une substitution totale à la fois des farines et des huiles de poisson, par des farines et des huiles d'origine végétale, depuis le premier repas jusqu'au stade juvénile, sont encore peu étudiés (Panserat et al. 2009). Chez le bar, de telles substitutions augmentent en effet significativement la mortalité (Le Boucher et al. 2013b). Pourtant, observer l'impact d'une substitution totale à long terme pourrait permettre d'expliquer certains effets zootechniques engendrés par les ingrédients végétaux, et qui peuvent être masqués lors de substitutions partielles et/ou tardives. De plus, la substitution alimentaire est connue pour engendrer une variabilité importante de réponses concernant la croissance, au sein d'une population de truites. Cette variabilité, inhérente au poids du déterminisme génétique dans la tolérance aux végétaux, a certaines répercussions statistiques lors de la recherche des mécanismes biologiques qui contribuent à l'acceptabilité des végétaux. Certaines tendances observées sont en effet sans significativité statistique du fait des fortes variabilités souvent obtenues. C'est pourquoi, il a été choisi de mettre à profit le déterminisme génétique de l'hôte, en réalisant nos études sur des lignées isogéniques de truites qui, lorsqu'elles sont nourries avec des végétaux, ne maintiennent pas la même croissance que celle observée lorsqu'elles sont nourries avec un aliment marin.

L'objectif principal de cette thèse a été de vérifier, si certaines enzymes digestives ou certains transporteurs intestinaux de nutriments sont diversement exprimés chez les différentes lignées isogéniques de truites, en fonction de leur alimentation, lors des stades larvaires et juvéniles. Le second objectif est d'évaluer si les communautés microbiennes hébergées sur la muqueuse intestinale de l'hôte divergent en fonction de l'aliment et du génotype de l'hôte chez les juvéniles. Trouver des paramètres propres aux communautés microbiennes intestinales, et des gènes du tractus digestif dont l'expression ou l'activité enzymatique pourraient servir d'indicateurs biologiques, lors de la formulation d'aliments

pour truites, ou lors de la sélection d'individus pour la reproduction, permettrait d'orienter les choix des formulateurs d'aliments et des sélectionneurs de poissons.

A cette fin, le travail mené durant mon travail de thèse s'est découpé en quatre objectifs.

## Objectif n°1

**Durant quelle période du statut postprandial, l'expression des gènes codant pour les principales enzymes digestives dans l'intestin et l'estomac et pour les principaux transporteurs de nutriments dans l'intestin est-elle maximale ?**

Cette thèse vise à évaluer l'impact de l'alimentation végétale sur les capacités digestives de la truite arc-en-ciel, notamment en comparant l'expression des gènes codant pour les protéines actrices de la digestion et de l'absorption. Cependant, la substitution des régimes marins à base d'huiles et de farines de poisson, par des régimes à base d'huiles et de farines d'origine végétale, plus riches en fibres insolubles, augmente souvent la vitesse de transit du bol alimentaire au travers de l'estomac et des différents segments intestinaux (Burel and Medale 2014). Cette différence de transit alimentaire se fait grâce à des successions de vidange gastrique et grâce au péristaltisme intestinal. Elle peut s'observer lors des prélèvements par des différences de réplétion des différents organes digestifs. Il est alors possible de se demander, si le niveau d'expression des gènes codant pour les principales enzymes digestives et pour les principaux transporteurs intestinaux de nutriments, est déterminé par un rythme circadien installé chez la truite, ou s'il est stimulé par l'arrivée et la présence d'aliments dans les organes digestifs. Cette question se pose d'autant plus, qu'un délai dans l'absorption plasmatique des acides aminés, a déjà été rapporté chez les truites nourries avec des végétaux, en comparaison de truites nourries avec un aliment marin (Yamamoto et al. 1988; Larsen et al. 2012). Des études de suivi de la transcription des gènes codant pour des enzymes digestives, chez le poisson, ont déjà montré que le niveau d'expression de certains gènes codant pour des enzymes digestives suit un rythme circadien (Yúfera et al. 2012). Il paraissait donc utile de déterminer, chez la truite arc-en-ciel, si la transcription des gènes codant pour les principales enzymes de la digestion et pour les principaux transporteurs de nutriments, suit également un rythme circadien, ou si elle est stimulée par l'arrivée du bol alimentaire dans les différents compartiments digestifs (estomac et intestin proximal). C'est pourquoi, deux études CINEDIG1 et CINEDIG2 ont été réalisées afin de déterminer les horaires de prélèvements, après un dernier repas, les plus appropriés pour étudier l'effet du régime alimentaire sur la transcription des gènes étudiés. Les horaires suivis, lors de l'étude CINEDIG1, étant à jeun, deux, six et douze heures après un dernier repas à base d'huiles et de farines de poisson.



L'expression de certains gènes n'étant pas redescendus à leur niveau de base après douze heures, il a été décidé de réaliser un second suivi cinétique, via l'étude CINEDIG2, afin de prolonger le suivi jusqu'à la quarante huitième heure après le dernier repas.

De plus, l'étude CINEDIG1 a été mise à profit pour réaliser une première évaluation de l'effet de la substitution des farines et des huiles de poisson, par des farines et des huiles d'origine végétale, sur les niveaux plasmatiques en glucose, acides aminés totaux et triglycérides, ainsi que sur les niveaux de transcription des gènes étudiés dans l'estomac et l'intestin proximal chez des truites conventionnelles.

## Objectif n°2

**Quels sont les principales enzymes de la digestion et les principaux transporteurs de nutriments affectés par le changement de régime alimentaire chez la truite, et dont la contribution dans les baisses de performance de digestion et d'absorption digestive, de digestibilité, et de performance de croissance est à suspecter ?**

La baisse des performances de digestion et d'absorption, observée chez les truites nourries avec des végétaux, est impliquée dans la baisse de leur performance de croissance. Il est donc nécessaire de trouver des indicateurs biologiques qui soient impliqués dans cette détérioration de la digestion et de l'absorption. De nombreuses études ont déjà rapporté les conséquences de l'alimentation végétale sur les capacités digestives des poissons carnivores et particulièrement de la truite arc-en-ciel. Cependant, ces études portent rarement sur des substitutions simultanées et totales des huiles et farines de poisson par des huiles et farines d'origine végétale, et imposées aux truites dès leur premier repas. Ce choix s'explique notamment par les fortes mortalités engendrées par de tels régimes. Il est pourtant nécessaire de décrire la réponse des truites à une substitution simultanée et à long terme. En effet, les taux de substitution en farines et huiles d'origine végétale dans les aliments pour truites ne cessent d'augmenter depuis les années 1995 et atteignent déjà 90 % et 75 % respectivement. De plus, une substitution, lorsqu'elle est partielle peut masquer certains effets des végétaux. Il a donc été décidé d'étudier l'impact de l'alimentation végétale sur les performances de digestion et d'absorption des truites, à partir de régimes alimentaires distribués dès le premier repas et formulés soit avec des huiles et des farines de poisson, soit avec des huiles et des farines d'origine végétale. Etant déjà rapporté qu'un déterminisme génétique contribue à expliquer les différentes réponses des truites au changement d'alimentation, des lignées isogéniques de truites, qui divergent sur leur capacité à maintenir une croissance comparable quand elles sont nourries avec des aliments à base de poisson, et quand elles sont nourries avec des végétaux, ont été sélectionnées. L'objectif étant d'identifier les principales enzymes digestives et les principaux transporteurs de nutriments susceptibles d'expliquer les baisses de performance digestive observées via la mesure de digestibilité, et pouvant être utilisés comme bio-indicateur lors de test de certaines formulations alimentaires.

Du fait de fortes mortalités observées au stade alevin chez les truites nourries avec un aliment de type végétal, et du fait que le stade juvénile représente le stade le plus long pour les truites d'élevage avant leur abattage, il a été choisi de décrire l'impact du changement alimentaire sur les capacités digestives de la truite, lors du stade alevin et lors du stade juvénile. L'étude nutriginomique a consisté à identifier les principales enzymes digestives et les principaux transporteurs, potentiellement impactés par le changement de régime, et pouvant révéler un retard de la maturation digestive lors du stade alevin, ou pouvant contribuer aux baisses de performances de digestion, d'absorption, et de croissance souvent observées. Le but de ces différentes analyses était également de regarder si, pour certaines enzymes, le niveau de transcription reflète le niveau d'activité enzymatique observé, afin d'évaluer si leur régulation par le changement de régime est davantage d'origine transcriptionnelle ou post transcriptionnelle.

### **Objectif n°3**

#### **La différence de tolérance des lignées isogéniques de truite arc-en-ciel aux aliments d'origine végétale en matière de croissance se traduit-elle également par des différences de communautés bactériennes associées à la muqueuse intestinale ?**

Il a déjà été observé chez de nombreux poissons, dont la truite arc-en-ciel, que la substitution de la farine et de l'huile de poisson par de la farine et de l'huile d'origine végétale impacte leurs performances de digestion et d'absorption (Santigosa et al. 2011a; Santigosa et al. 2011b), et peut même parfois détériorer l'intégrité de l'épithélium intestinal (Glencross et al. 2006). Les premiers éléments d'explication qui ont été apportés, concernaient l'aliment : certains composés apportés par les végétaux, ou au contraire présents en quantité insuffisante étant impliqués dans la détérioration des capacités digestives (Knudsen et al. 2008). Puis la contribution du microbiote intestinal, dont le profil est modifié par un changement de régime alimentaire, a été suspectée dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans les capacités de digestion et d'absorption intestinales des poissons (Fang et al. 2015). De nombreuses études témoignent de plus en plus de son importance, notamment dans le maintien de la barrière intestinale contre les bactéries pathogènes (Refstie et al. 2006). Certains travaux de recherche rapportent une amélioration des performances de croissance et de la maturation du système immunitaire, chez des poissons dont l'alimentation est complétée en probiotiques composés de certaines bactéries ou de levures. Une plus forte présence de bactéries particulières peut favoriser la production d'acides gras libres à courte chaîne, qui sont une source d'énergie pour les cellules de l'intestin distal (Hoseinifar et al. 2015). Cependant, leur réelle contribution au métabolisme énergétique du poisson n'a pas encore été démontrée et les mécanismes biologiques qui sont impliqués dans les performances de croissance observées chez les poissons complétés en probiotiques ne sont pas encore très bien élucidés. L'amélioration de cette stratégie nécessite d'identifier des regroupements de bactéries ou de levures qui soient potentiellement de bonnes candidates comme probiotiques (Giannenas et al. 2015; Hoseinifar et al. 2015). Bien qu'un changement de composition du microbiote intestinal, suite au changement de régime, a déjà été rapporté chez la truite arc-en-ciel (Heikkinen et al. 2006; Ingerslev et al. 2014), l'effet d'une substitution totale et simultanée des huiles et des farines végétales sur sa composition n'a pas encore été décrit. Il est donc nécessaire d'en déterminer les effets sur le microbiote, étant donné que les taux de substitution des huiles et des farines végétales dans les aliments pour poissons carnivores ne cessent d'augmenter. De plus, le génotype de l'hôte est connu pour influencer le microbiote intestinal (Navarrete et al. 2012b). Il est donc possible de se demander si des communautés bactériennes différentes entre les lignées isogéniques de truites, sont impliquées dans leur tolérance ou leur intolérance aux végétaux.

Il a donc été décidé de déterminer l'incidence du génotype et de l'aliment sur le profil des communautés bactériennes présentes au niveau de la muqueuse intestinale. Cette incidence peut s'établir tout d'abord sur la richesse totale et phylogénétique des différentes communautés bactériennes étudiées, mais aussi sur leur similitude. C'est pourquoi le profil de la core communauté<sup>2</sup> bactérienne de la truite, qui n'est ni sensible au génotype de l'hôte, ni sensible à l'aliment, c'est-à-dire qui est retrouvée au sein de toutes les conditions étudiées, a été décrit. Le profil des cores communautés bactériennes qui sont sélectionnées par chaque aliment ont également été décrites.

---

<sup>2</sup> Core communauté: Ensemble d'espèces ou d'OTU qui sont communes à un assortiment d'échantillons. Contrairement à la notion de *core species* de Hanski (1982), la core communauté ne considère pas l'abondance des espèces Hanski (1982).

#### **Objectif n°4**

##### **Evaluation de la réponse à un challenge hypoxique de 3 lignées isogéniques étudiées sous différentes conditions d'alimentation (marin versus végétal et à jeun ou nourries) afin de révéler les capacités d'adaptation de chacune au changement alimentaire**

Une des stratégies adoptée pour remédier aux baisses de croissance observées chez les truites alimentées avec des aliments végétaux, consiste à sélectionner des individus qui répondent bien aux nouveaux régimes en matière de croissance. En effet, il a été observé que la tolérance des truites aux végétaux est sous déterminisme génétique. Cette démarche est notamment mise en oeuvre par le SYSAAF (Haffray et al. 2004). Cependant la sélection d'individus bon reproducteurs nécessite d'identifier des poissons dont le phénotype est capable d'améliorer la valeur génétique de la population des truites recherchées. Mais les poissons ne sont plus uniquement indexés sur leur performance de croissance face à de nouveaux aliments, il est aussi nécessaire d'identifier des marqueurs biologiques en lien avec certains traits phénotypiques à conserver, telle que la robustesse. En effet, le secteur de l'aquaculture nécessite de disposer de poissons qui soient robustes face à un changement imposé à leur environnement. Les poissons recherchés sont donc ceux qui développent la plus faible réaction face à un facteur de stress. Une précédente étude comportementale chez les lignées soumises à un stress modéré a déjà permis de discriminer les lignées sur leur robustesse. Afin de sélectionner ce caractère, il a été proposé de soumettre ces lignées à un stress pouvant affecter leur survie, afin de mieux observer leur réponse à ce stress (Sadoul et al. 2015). Le choix s'est alors porté sur un challenge hypoxique aigu. L'objectif a alors été de déterminer quelle lignée isogénique de truites présentait la meilleure tolérance à une hypoxie aiguë, suite au changement d'alimentation.



## **MATERIEL ET METHODES**





## 3 MATERIEL ET METHODES

### 3.1 Matériel Biologique : la truite arc-en-ciel

Le travail de la thèse a porté sur l'appareil digestif de la truite lors du stade alevin, vers la fin de l'étape de maturation de l'appareil digestif, 30 jours après le premier repas et lors du stade juvénile entre 6 et 15 mois après le premier repas suivant l'expérimentation considérée (cf. Figure 16).

Les expérimentations se sont déroulées au sein de quatre piscicultures différentes : sur le plateau expérimental de l'unité NuMéa du laboratoire INRA de Saint Pée sur Nivelles, dans des bassins en circuit fermé, maintenus à 17°C, nous avons effectué des mesures de digestibilité et l'étude préliminaire CINEDIG2.

L'étude préliminaire CINEDIG1 a été réalisée au sein de la pisciculture expérimentale de Donzacq dans une eau à 17°C.

La pisciculture de Sizun dans le Finistère a été en 2014 et en 2015 le lieu de reproduction et d'éclosion des lignées isogéniques A22h, AB1h, et R23h. L'eau des bassins y est à 14°C.

Les stades suivants d'élevage ont ensuite eu lieu soit au sein de la pisciculture expérimentale de Léas-Athas, de Donzacq, ou à Sizun même, chacune de ces piscicultures étant en circuit ouvert. La pisciculture expérimentale de Léas-Athas, dans les Pyrénées Atlantiques a été le premier lieu d'élevage des larves et alevins des lignées isogéniques de l'éclosion de 2014, à partir du 16<sup>ième</sup> jour après éclosion, dans des bassins à circuit ouvert à 7°C.

La seconde partie de l'élevage s'est déroulée dans la pisciculture de Donzacq, les alevins y ayant été transférés 83 jours après leur éclosion. L'eau des bassins à 17°C y est propice à une croissance plus rapide des truites. Les lignées de l'éclosion 2014 ont alors été sacrifiées et prélevées pour la caractérisation du microbiote intestinal et pour des tests de challenges hypoxiques.

Enfin, la pisciculture de Sizun a été la pisciculture de reproduction, d'éclosion et d'élevage des lignées isogéniques de l'éclosion 2015. Les lignées y ont été prélevées pour la

description au stade alevin et juvénile de leurs capacités digestives. C'est à la pisciculture expérimentale de Donzacq dans les Landes que les aliments utilisés ont été produits.

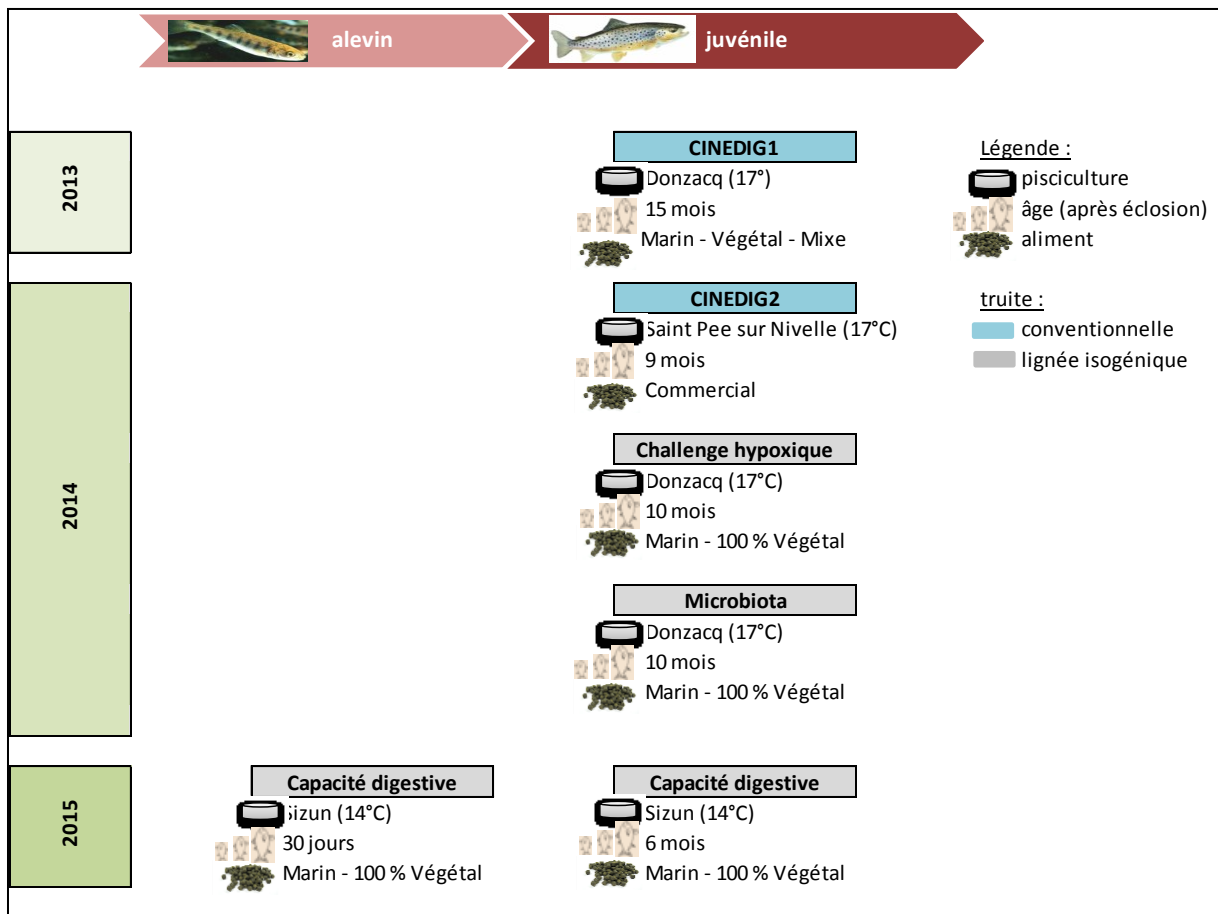


Figure 16 : Chronologie des différentes expérimentations réalisées dans le cadre des travaux de thèse.

Des études préliminaires ont tout d'abord été effectuées sur des truites conventionnelles, afin de choisir le moment le plus opportun de prélèvement pour les études ultérieures sur les lignées isogéniques. Les effets de l'aliment et du génotype ont ensuite été observés sur des lignées isogéniques hétérozygotes de truites, puis sur leur microbiote digestif, et enfin sur certains aspects de leur physiologie.

Afin de trouver des indicateurs biologiques qui témoignent de la bonne ou mauvaise réponse des truites aux aliments, en matière de performance de digestion et d'absorption intestinale, nous avons retenu trois lignées isogéniques de truites, qui divergeaient sur leur aptitude à maintenir, sous une alimentation végétale, une croissance comparable à celle enregistrée lorsqu'elles étaient nourries avec des aliments traditionnels à base de farine et d'huile de poisson. Leur capacité digestive et leur microbiote intestinal ont été décrits

lorsqu'elles sont soumises à une alimentation végétale face à une alimentation traditionnelle à deux moments différents de leur cycle de vie : lors du stade alevin à la suite de la résorption de leur sac vitellin, et lors du stade juvénile.

### **Manipulations de laboratoire**

Pour étudier les capacités digestives de la truite, nous avons évalué l'expression de gènes par PCR quantitative et/ou l'activité enzymatique de certaines enzymes digestives et de certains transporteurs de nutriments présents au niveau de l'estomac, du pancréas exocrine, et de l'intestin. Pour caractériser la composition du microbiote intestinal, nous avons utilisé une approche d'écologie microbienne utilisant le séquençage d'un fragment du gène de l'ARNr 16S bactérien.

## **3.2 Etudes préliminaires réalisées sur les truites conventionnelles**

Les cinétiques de transcription de gènes codant pour des enzymes digestives et pour des transporteurs de nutriments ont été étudiés au niveau de l'estomac et de l'intestin proximal avec pour objectif de déterminer les périodes de temps, après le dernier repas, durant lesquelles la transcription de ces gènes pourrait éventuellement être maximale.

### **3.2.1 Protocole expérimental de suivi de cinétique de la transcription de gènes et de niveaux plasmatiques sur une période de 12h**

Une première étude dénommée CINEDIG1 a été entreprise sur des truites conventionnelles, après un jeûne de 72 heures (*cf.* Figure 17). Les niveaux de transcription au niveau de l'estomac et de l'intestin proximal ont été observés sur les truites à jeun, puis deux, six, et douze heures après leur dernier repas. Les cinétiques des niveaux plasmatiques en glucides, acides aminés totaux et en triglycérides ont également été suivies dans le but d'évaluer les différents niveaux d'absorption intestinale. Enfin, la réponse de l'intestin et de l'estomac au changement d'alimentation a également été décrite au niveau de l'expression de gènes codant pour des enzymes digestives et pour des transporteurs de nutriments. Le but étant d'évaluer l'impact d'une substitution d'aliments riches en farines et huiles de poisson.

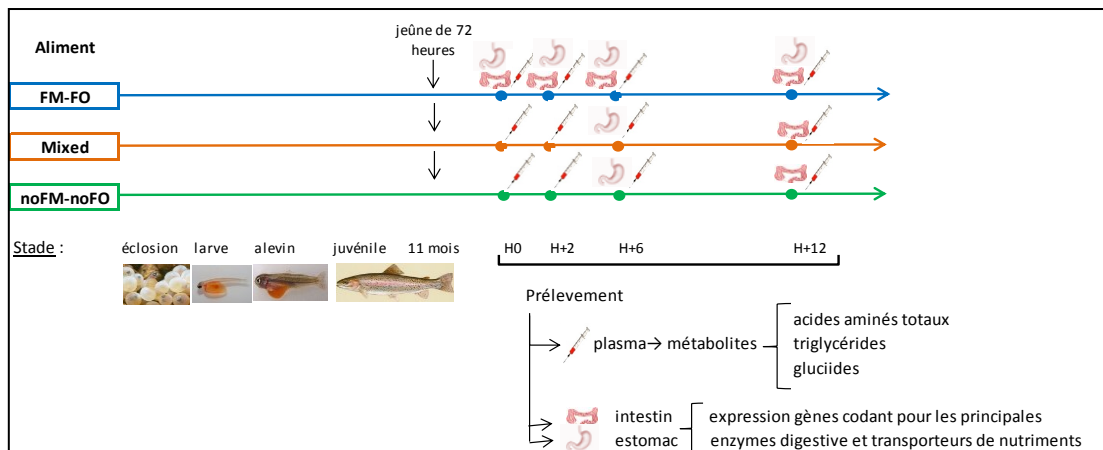


Figure 17 : Protocole d'élevage et de prélèvements de l'étude CINEDIG1

Aliment : FM-FO (fish meal – fish oil), aliment à base d'huiles de poisson et riche en farines de poisson

Aliment : noFM-noFO (no fish meal – no fish oil), aliment à base d'huiles et de farines d'origine végétale

Mixed aliment de composition intermédiaire entre FM-FO et noFM-noFO.

Prélèvements réalisés juste avant le dernier repas (H0), puis deux (H+2), six (H+6), et douze (H+12) heures après ce dernier repas.

### 3.2.2 Protocole expérimental du suivi de cinétique de la transcription de gènes sur une période de 48h

D'après les résultats obtenus lors de l'étude CINEDIG1, la transcription de certains gènes atteignait un plateau au bout de la douzième heure suivant le dernier repas. Pour déterminer si ces gènes pouvaient avoir un pic de transcription après la douzième heure postprandiale, une autre cinétique de transcription a été réalisée sur un plus long laps de temps (cf. Figure 18). Une seconde étude cinétique de transcription des principaux gènes codant pour des enzymes digestives et pour des transporteurs de l'intestin et de l'estomac a alors été réalisée sur 48 heures afin de couvrir les cycles nyctéméraux.

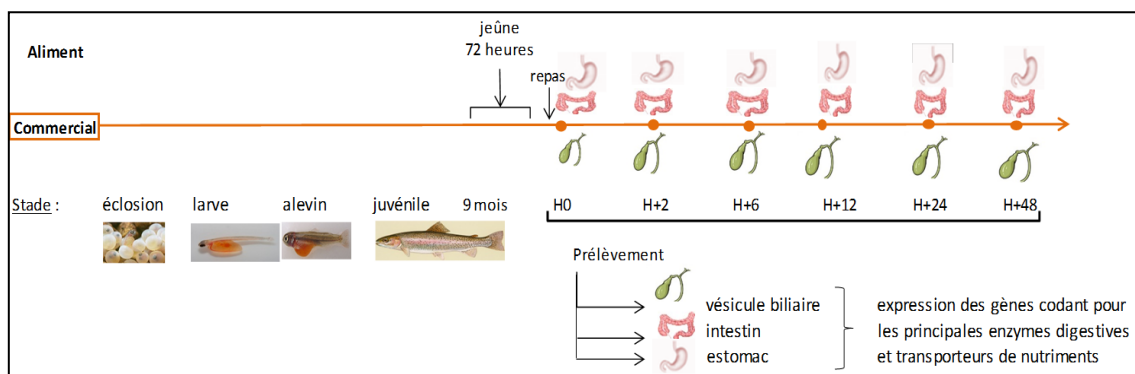


Figure 18 : Protocole d'élevage et de prélèvements de l'étude CINEDIG2

**Prélèvements réalisés** juste avant le dernier repas (H0), puis deux (H+2), six (H+6), douze (H+12),

vingt-quatre (H+24), et quarante-huit (H+48) heures après ce dernier repas avec un aliment commercial (mélange de farine de poisson et végétale, mélange d'huile de poisson et végétal)

### **3.3 Génétique et réponse au changement d'alimentation**

#### **3.3.1 Les lignées isogéniques**

Au préalable du projet ANR AGreenFish qui inclut ce projet de thèse, l'Unité Gabi du laboratoire INRA de Jouy-en-Josas a mis au point 9 lignées isogéniques de truites avec entre autre but la recherche du déterminisme génétique dans la résistance à des challenges infectieux, et aussi la distinction des gènes de truite dupliqués de ceux restés mono-alléliques malgré la duplication du génome survenue chez cette espèce (Quillet et al. 2007).

Afin d'analyser les mécanismes biologiques susceptibles d'expliquer la réponse des truites à l'alimentation végétale, la réponse zootechnique de 7 lignées isogéniques de truites à la substitution alimentaire a été étudiée (Dupont-Nivet et al. 2009). Après cette première étude, la réponse de 15 lignées isogéniques de truites a été examinée lors du projet CIGALE. Parmi ces 15 lignées, les trois seules lignées A22h, AB1h, et R23h, capables de survivre lors de substitution totale et double des farines et huiles de poisson par des farines et huiles d'origine végétale, dès le premier repas, ont été sélectionnées pour des études ultérieures. Ces trois lignées retenues divergent sur leur capacité à maintenir, sous une alimentation végétale, une croissance comparable à celle observée lorsqu'elles sont nourries avec une alimentation riche en huiles et farines de poisson, ce qui en fait des candidats adaptés à l'étude de la substitution végétale (*cf.* Figure 19). Ces lignées isogéniques de truites ont été obtenues par croisement d'une même femelle homozygote avec trois mâles homozygotes différents. Les alevins issus de cette reproduction sont tous hétérozygotes et portent tous le même matériel génétique au sein d'une même lignée. Étant donné ce mode de croisement, les trois lignées isogéniques de truites obtenues, disposent d'un patrimoine génétique nucléaire à demi identique, et mitochondrial totalement similaire, étant donné qu'elles sont toutes issues de la même femelle. Ce choix permet de s'affranchir des effets dus à la taille des œufs qui auraient pu se produire, si des œufs issus de femelles différentes avaient été sélectionnés pour la confection des lignées.

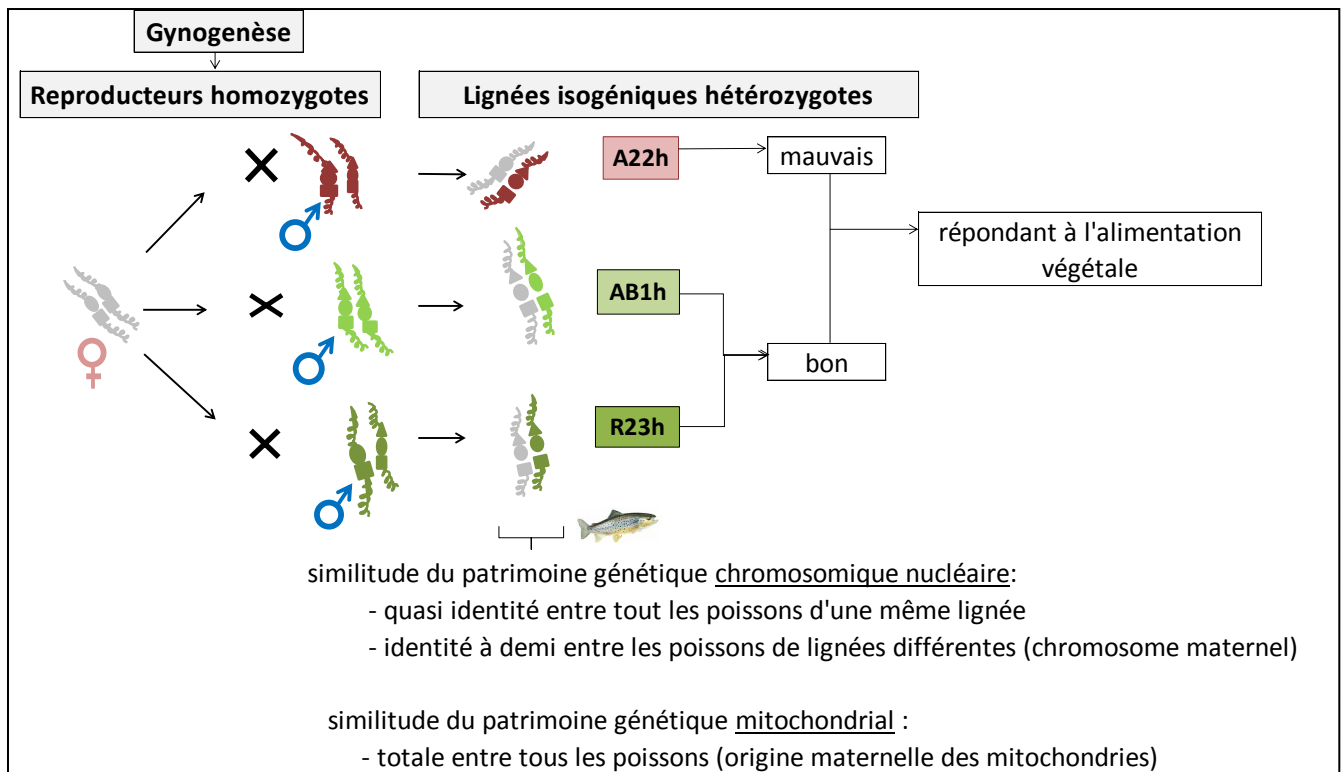


Figure 19 : Protocole d'obtention des lignées isogéniques mise en place par l'Unité Gabi du laboratoire INRA de Jouy-en-Josas, et par la pisciculture expérimentale de Sizun dans le Finistère

Le mode d'obtention d'individus homozygotes par gynogenèse est décrit succinctement dans la partie synthèse bibliographique (§ 1.3.5)

### 3.3.2 L'alimentation

Les lignées de truites ont alors été nourries depuis leur premier repas avec deux aliments différents : un aliment de type marin riche en farine et huile de poisson, en opposition à un aliment de type végétal dont les protéines et les lipides sont totalement issus de végétaux (*cf.* Tableau 6).

Tableau 6 : Formulation et composition des aliments distribués aux lignées de l'éclosion 2014

Ingrédients (g 100g diet)	Aliment	
	PB	M
Farine d'hareng (CP 70; Sopropêche, France)	-	58.4
Farine de gluten de maïs (CP 60; Inzo, France)	16.0	-
Gluten de blé (CP 70; Roquette, France)	17.7	-
Farine de soja (CP 48; Inzo, France)	10.1	-
Concentré de protéines de soja (Estrilvo; CP70; Sopropêche, France)	15.2	-
Farine de lupin blanc (Terrena, France)	6.8	-
Pois extrudé (Aquatex, Sotexpro, France)	4.3	-
Blé entier extrudé (SudOuest Aliment, France)	3.4	25.3
Lécithine de soja (Louis François, France)	2.1	-
L-Lysine (Eurolysine)	1.5	-
L-Méthionine (Evonik, Germany)	0.3	-
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18 % P; 22 % Ca)	3.2	-
Attractants <sup>a</sup>	1.4	-
Minéraux <sup>b</sup>	1.2	1.1
Vitamines <sup>c</sup>	1.2	1.1
Huile de poisson (Sopropêche, France)	-	14.1
Huile végétale (colza, lin, palme) (Daudruy, France)	15.6	-
<i>Composition de la matière sèche (MS)</i>		
protéines (% MS)	50.2	51.2
lipides (% MS)	18.5	18.7
énergie (kJ/g MS)	22.6	23.6

(M) (marin riche en farine de poisson, et huile totalement à base d'huile de poisson)

(PB) (farine et huile totalement d'origine végétale)

Etant donné qu'une diminution de la prise alimentaire apparaît lorsque les truites sont alimentées avec des aliments d'origine végétale (Geurden et al. 2013), l'aliment marin a également été distribué à des lots de truites de manière restreinte à la quantité qu'elles ingèrent lorsqu'elles sont nourries avec un aliment de type végétal. L'effet de l'alimentation et du génotype a alors été observé sur les capacités digestives des truites : l'activité



enzymatique des principales enzymes digestives intestinales et pancréatiques impliquées dans la digestion du bol alimentaire, et la transcription de gènes de l'appareil digestif codant pour des enzymes digestives et pour des transporteurs intestinaux de nutriments ont été évaluées.

### 3.3.3 Etude de la transcription de gènes impliqués dans la digestion et l'absorption de nutriments

Cette approche a été réalisée à deux stades : en fin de stade alevin, 30 jours après le premier repas, après résorption du sac vitellin, ainsi qu'au stade juvénile, six mois après l'éclosion (cf. Figure 20).

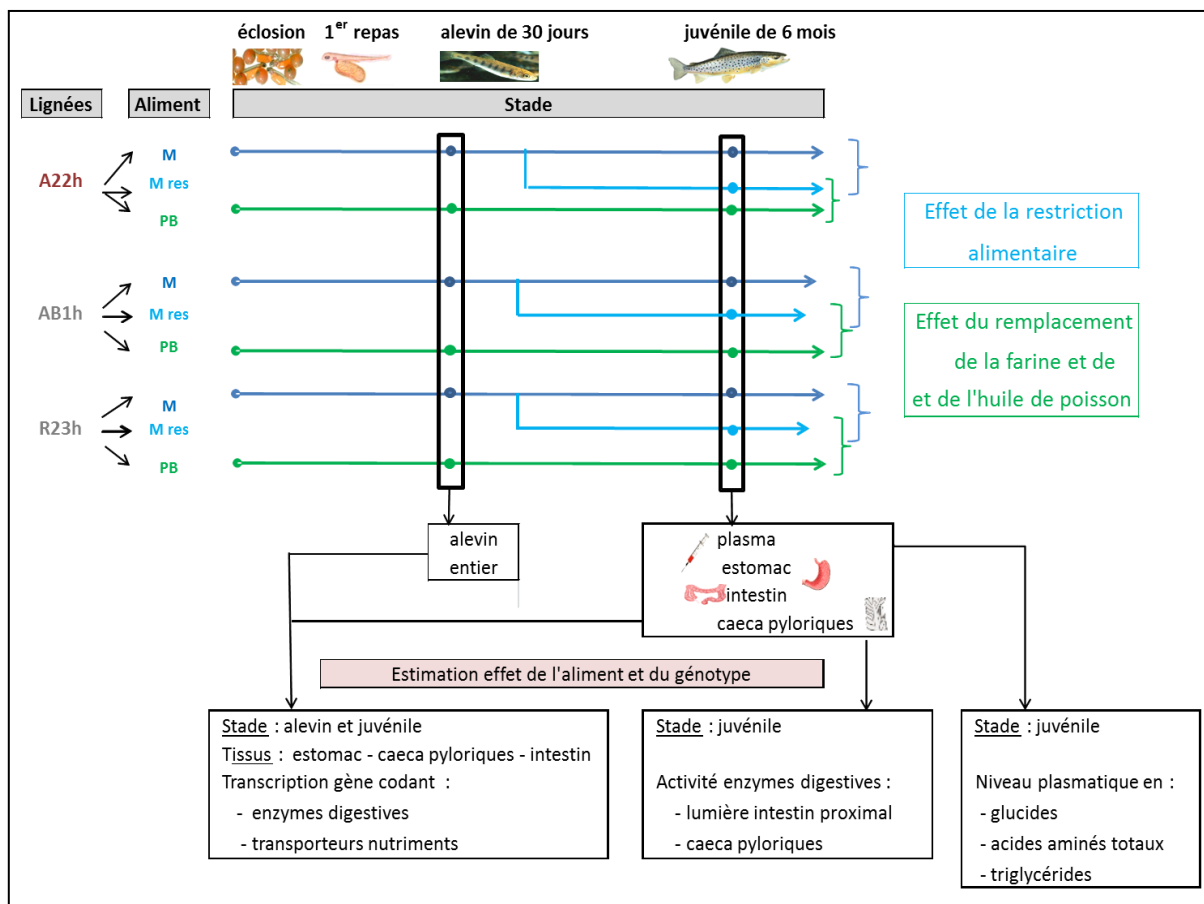


Figure 20 : Protocole d'élevage et de prélèvements pour les études de nutriginomique sur les lignées isogéniques de truites

Aliment marin (M) à base d'huiles de poisson et riche en farines de poisson, distribution *ad libitum* ;

Aliment végétal (PB) à base d'huiles et de farines d'origine végétale, distribution *ad libitum* ;

Aliment marin restreint (Mres) qui est de même composition que l'aliment M, mais dont la distribution a été quantitativement restreinte à hauteur de la quantité ingérée par les poissons nourris *ad libitum* avec l'aliment PB.

La période de fin de stade alevin correspond à la fin de la métamorphose digestive : l'estomac vient de finir de se développer. La digestion passe alors d'une digestion de type alcaline par les enzymes du pancréas à une digestion en deux étapes, c'est-à-dire une digestion tout d'abord à pH acide dans l'estomac, suivie d'une digestion à pH basique dans l'intestin. D'après de précédentes études, les écarts de croissance entre les truites nourries avec des aliments conventionnels et celles nourries avec des végétaux commencent à apparaître au stade alevin. De plus, de fortes mortalités apparaissent souvent au stade alevin, lorsque les truites sont nourries avec des végétaux. C'est pourquoi nous avons étudié les effets précoces de l'aliment et du génotype sur les capacités digestives de la truite. La transcription des principaux gènes impliqués dans la digestion des lipides, de l'amidon et des protéines, et dans l'absorption intestinale des peptides, glucoses et lipides a été évaluée par PCR quantitative à partir d'alevins prélevés dans leur intégralité. Le stade juvénile correspond au stade durant lequel les poissons passent le plus de temps avant leur abattage, ce qui justifie son étude. La partie pylorique de l'estomac, les caeca pyloriques, et l'intestin entier ont été isolés, débarrassés du bol alimentaire, rincés au liquide physiologique, transportés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

Ensuite, une extraction d'ARN au trizol a été effectuée, et une évaluation de l'expression des gènes a été réalisée, entre les différentes conditions testées, par rétro transcription des ARN extraits, et par réaction en chaîne par polymérase (PCR), en temps réel. Des réactions en chaîne par polymérase, en temps réel, ont également été effectuées sur différents gènes de référence (Ef1,  $\beta$ Act, Gadph, et 18s) afin de pouvoir normaliser l'expression des gènes ciblés suivant la procédure de (Pfaffl and Pfaffl 2001).

- **Prélèvements au stade alevin**

Les prélèvements sur les truites au stade alevin, en vue d'étudier les capacités digestives de la truite, par PCR en temps réel, ont consisté à prélever les poissons entiers, étant donné le faible poids des alevins au 30<sup>ième</sup> jour après leur premier repas.

- **Prélèvements au stade juvénile**

L'étude des capacités digestives a porté sur l'estomac, le pancréas exocrine, et l'intestin. Ces organes ont été prélevés huit heures après la distribution du dernier repas. Cet horaire a été choisi pour permettre de réaliser certaines études du projet AgreeFish sur des prélèvements communs, et ainsi faciliter la synthèse des différents résultats obtenus. La

partie pylorique de l'estomac (partie localisée à proximité de l'intestin), a une muqueuse plus riche en glandes digestives que la partie cardiaque de l'estomac (partie localisée à proximité de l'œsophage). La partie pylorique de l'estomac a été prélevée, après avoir écarté le bol alimentaire et avoir flushé la muqueuse au sérum physiologique stérile (NaCl 9 %), afin de la nettoyer le plus possible des résidus de chyme. Le pancréas exocrine de la truite a la particularité d'être diffus autour des caeca pyloriques. Par commodité, il a été prélevé au travers des caeca pyloriques, sans les vider de leur contenu. En revanche, l'intestin et l'estomac ont été vidés de leur contenu digestif, puis rincé par flushage au sérum physiologique avant d'être transportés dans l'azote puis stockés à -80°C. Pour assurer des prélèvements communs entre différentes études portées par le projet AgreeFish, l'intestin a été prélevé en entier. Ce choix de prélèvement est à prendre en compte lors des comparaisons des résultats obtenus avec ceux d'autres études. Il existe en effet une séparation de fonctionnalités entre l'intestin proximal et distal chez la truite (Ferraris and Ahearn 1984), et suivant les études rapportées, le matériel choisi pour étudier les capacités digestives est parfois l'intestin proximal, distal, ou l'intestin entier.

### **3.3.4 Etude du microbiote associé à la muqueuse digestive de l'intestin**

La contribution du microbiote digestif sur l'homéostasie intestinale a déjà été démontrée dans la littérature. L'effet de l'aliment et du génotype sur l'écologie microbienne de la muqueuse digestive a donc été évalué sur des lignées isogéniques de truites juvéniles de 10 mois. Lors du prélèvement, la partie distale de l'intestin a été séparée de la partie antérieure, son contenu a été retiré et la muqueuse rincée au sérum physiologique pour diminuer les traces d'aliments. Le microbiote associé à la muqueuse de l'intestin distal a alors été prélevé avec des écouvillons, puis transporté dans l'azote liquide et stocké à -80°C avant les analyses ultérieures d'extraction, d'amplification et de séquençage des amplicons du gène de l'ARNr 16S (*cf.* Figure 21). Les données de séquençage obtenues ont été nettoyées, puis, la richesse et la diversité bactérienne ont été décrites à partir des principaux indices utilisés en écologie microbienne : richesse spécifique, indice de Shannon, richesse phylogénétique, evenness phylogénétique, et  $\beta$ -diversité. Les communautés bactériennes ont été analysées via leur core communauté, via l'abondance des principaux phylums et classes observées, et via la recherche d'OTU spécifiques de l'alimentation et/ou de la lignée de l'hôte. Grâce au logiciel de prédiction PICRUSt, des hypothèses fonctionnelles ont été déduites du profil de ces communautés microbiennes.

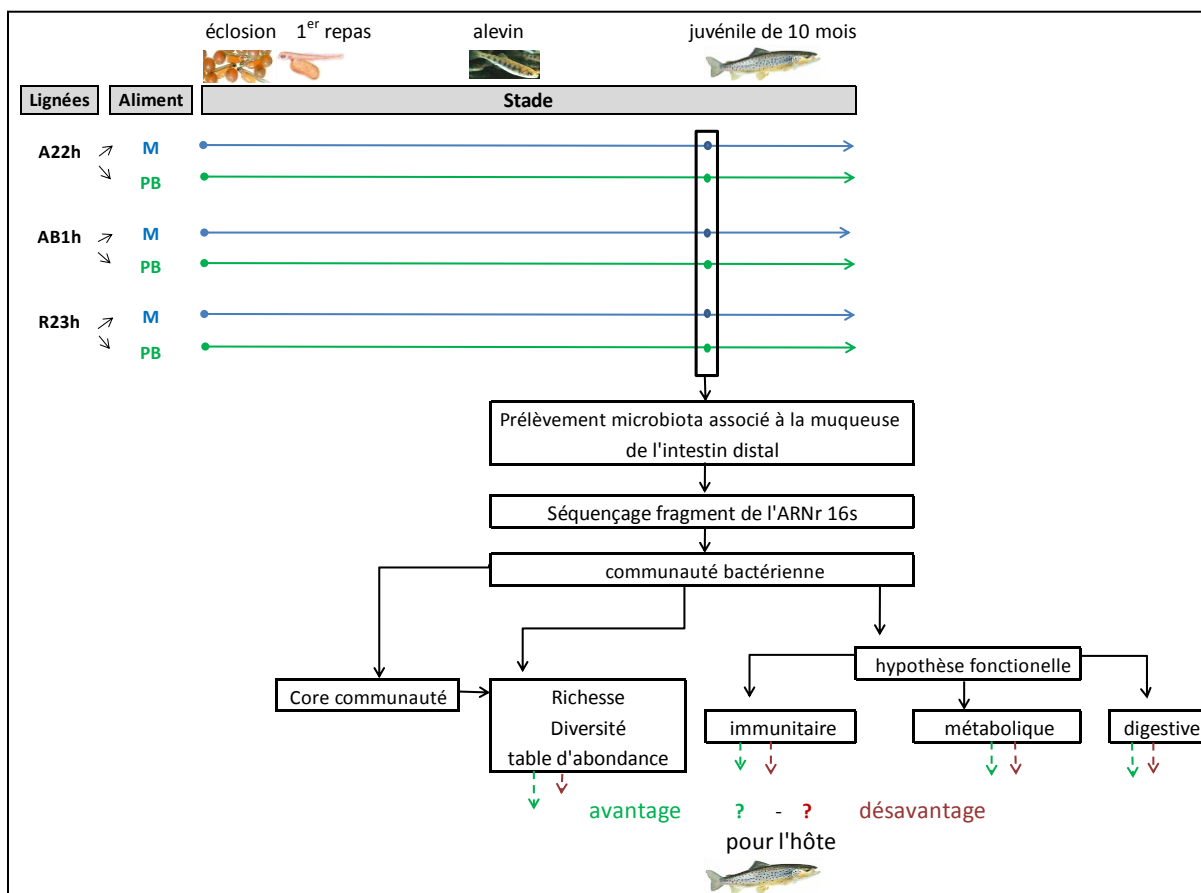


Figure 21 : Méthodologie suivie dans le but de décrire le microbiote associé à la muqueuse de l'intestin distal des lignées isogéniques de truites de 10 mois en fonction de leur régime alimentaire

Chacune des trois lignées A22h, AB1h, et R23h ont été alimentées depuis leur premier repas *ad libitum* :  
 soit avec un aliment marin **M** riche en farines de poisson et à base d'huiles de poisson  
 soit avec un aliment végétal **PB** dont la farine et l'huile sont totalement d'origine végétale.

Le prélèvement s'est fait par écouvillonnage, puis l'ADN a été extrait.

Un fragment de l'ARN ribosomal 16S a été amplifié puis séquencé. L'analyse des séquences obtenues a été réalisée en vue de décrire le profil taxonomique, la richesse et la diversité des communautés bactériennes, ainsi que la core communautés propre à chaque aliment et également présente chez tous les poissons.

Des indices de diversité ont été évalués, et des prédictions fonctionnelles émises via le logiciel PICRUSt.

### **3.3.5 Test « challenge hypoxique » : Effet de l'aliment et du génotype sur la physiologie de l'hôte**

Certains environnements particuliers peuvent également amplifier la réponse physiologique des truites au changement de régime alimentaire. Un moyen relativement simple d'estimer la réponse des différentes lignées de truites à un stress est, par exemple, de les soumettre à un challenge hypoxique aigu. La différence de vitesse dans la survenue de la perte de conscience témoigne alors de la différence de capacité de résistance des truites. Nous avons donc réalisé deux challenges hypoxiques aigus sur les trois lignées isogéniques de truites soumises à deux alimentations différentes.

Un premier challenge hypoxique a d'abord été réalisé sur les lignées de truites à jeun depuis 48 heures. Les truites des différentes lignées ayant été regroupées dans un même bassin, en fonction de leur régime alimentaire, deux semaines auparavant. L'identification de la lignée a été possible grâce à l'application d'un élastomère de couleur près de la région orbitale. L'arrivée d'eau dans chacun des deux bassins a été coupée. La teneur en oxygène diminuant alors progressivement du fait de leur respiration, les truites se sont trouvées en situation d'hypoxie. En réaction à la diminution d'oxygène, les truites se retournaient et perdaient conscience. Les truites ont été repêchées lorsqu'elles manifestaient une perte de conscience, puis transférées dans un bassin oxygéné.

Deux semaines après ce premier challenge, un second challenge similaire a été réalisé sur les lignées, à partir de la deuxième heure suivant le dernier repas. Le paramètre recueilli pour les analyses étant le temps individuel d'apparition de la perte de conscience après le début du challenge.

## **ARTICLES**



**4 ARTICLE 1 : POSTPRANDIAL KINETICS OF GENE EXPRESSION OF PROTEINS  
INVOLVED IN THE DIGESTIVE PROCESS IN RAINBOW TROUT (O. MYKISS)  
AND IMPACT OF DIET COMPOSITION**





## Préambule 1<sup>er</sup> article – Etude “CINEDIG1”

Borey M., Panserat S., Surget A., Cluzeaud M., Plagnes-Juan E., Herman A., Lazzarotto V., Corraze G., Médale F., Lauga B., Burel C.

### **Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition**

(2016) *Fish Physiology and Biochemistry*, 42 (4), pp. 1187-1202.

L'effet du remplacement de la farine et de l'huile de poissons sur le tractus digestif des poissons carnivores d'élevage a déjà été étudié. Il a en effet été rapporté que cette substitution s'ensuit d'une détérioration de l'intégrité de l'épithélium digestif chez la truite arc-en-ciel (Glencross et al. 2006), d'une perturbation de l'activité enzymatique et/ou de la transcription des principales enzymes impliquées dans la digestion des nutriments chez la carpe rouge (*Carassius auratus gibelio* × *Cyprinus carpio*) (Liu et al. 2014), et d'un délai de l'absorption intestinale des acides aminés totaux vers la lymphe (Yamamoto et al. 1988; Larsen et al. 2012). Cependant ces études ont été menées avec des taux partiels de substitution en farine et/ou huile de poisson. De plus l'effet conjoint de la substitution n'a pas été rapporté. L'objectif de cet article a été d'étudier l'effet d'une substitution à la fois totale et conjointe sur les capacités digestives de la truite, ce qui est nécessaire étant donné l'incorporation croissante des huiles et protéines d'origine végétale dans les aliments pour poissons. De plus, le système digestif est connu pour la variabilité temporelle de la transcription des gènes impliqués dans la digestion et le transport des nutriments. Il est donc nécessaire de connaître les statuts nutritionnels, durant lesquels l'expression des gènes de la digestion est plus importante, afin d'orienter le choix des prélèvements destinés à l'étude de l'impact végétal sur les capacités digestives de la truite. Le second objectif de cet article a donc été de suivre le rythme d'expression des gènes impliqués dans la digestion et le transport des nutriments après un repas.

Cet article a été publié dans *Fish Physiology & Biochemistry* :

Borey M, Panserat S, Surget A, Cluzeaud M, Plagnes-Juan E, Herman A, Lazzarotto V, Corraze G, Médale F, Lauga B, Burel C (2016) Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O.mykiss*) and impact of diet composition. *Fish Physiology and Biochemistry* 42 (4): 1187-1202. doi: 10.1007/s10695-016-0208-4

## **Post-prandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition**

Marion Borey<sup>1,2</sup>, Stephane Panserat<sup>1</sup>, Anne Surget<sup>1</sup>, Marianne Cluzeaud<sup>1</sup>, Elisabeth Plagnes-Juan<sup>1</sup>, Alexandre Herman<sup>1</sup>, Viviana Lazzarotto<sup>1</sup>, Geneviève Corraze<sup>1</sup>, Françoise Médale<sup>1</sup>, Beatrice Lauga<sup>2</sup>, Christine Burel<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1419 NuMea Nutrition Métabolisme Aquaculture, F64310 Saint Pee sur Nivelle, France

<sup>2</sup> EEM, UMR 5254 IPREM, Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, F64013 Pau, France

\*Corresponding author : Christine Burel

E-mail address [cburel@st-pee.inra.fr](mailto:cburel@st-pee.inra.fr); Tel +335 59 51 59 77; fax : +335 59 54 51 52.

**Keywords:** Rainbow trout; Plant-based diet; Nutrient transporters; Digestive enzymes

### **Abstract**

The impact of increased incorporation of plant ingredients in diets for rainbow trout was evaluated in terms of gene expression of gastric (gastric lipase, pepsinogen) and intestinal (prolidase, maltase, phospholipase A2) digestive enzymes and nutrient transporters (peptide and glucose transporters), as well as of postprandial levels of plasma glucose, triglycerides and total free amino acids. For that purpose, trout alevins were fed from the start of exogenous feeding one of three different experimental diets: a diet rich in fishmeal and fish oil (FM-FO), a plant-based diet (noFM-noFO) totally free from fish meal and fish oil, but containing plant ingredients, and a Mixed diet (Mixed) intermediate between the FM-FO and noFM-noFO diets. After 16 months of rearing, all fish were left unfed for 72 hours, and then given a single meal to satiation. Blood, stomach and anterior intestine were sampled before the meal and at 2, 6 and 12 h after this meal. The postprandial kinetics of gene expression of gastric and intestinal digestive enzymes and nutrient transporters were then followed in trout fed the FM-FO diet. The postprandial profiles showed that the expression of almost all genes studied was stimulated by the presence of nutrients in the digestive tract of trout, but the timing (appearance of peaks) varied between genes. Based on these data, we have focused on the molecular response to dietary factors in the stomach and the intestine at 6 and 12 hours after feeding, respectively. The reduction of FM and FO levels of dietary incorporation induced a significant decrease of the gene expression of gastric lipase, GLUT2 and PEPT1. The plasma glucose and triglycerides levels were also reduced in trout fed the noFM-noFO diet. Consequently, the present study suggests a decrease of digestive capacities in trout fed a diet rich in plant ingredients.

## Introduction

In the last decade, products of plant origin have increasingly been incorporated into aqua feed as alternative feed ingredients to fishmeal (FM) and fishoil (FO) (Naylor et al. 2009). Although the novel diets have been formulated to meet all known requirements, and processed to reduce the proportions of anti-nutritional factors of plant origin, the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*, a carnivorous fish) is still reluctant to accept plant-based diets. The most recent findings in different carnivorous fish have shown that a high level of replacement of FM and FO by plant products reduces voluntary feed intake (Geurden et al. 2013), feed efficiency (Glencross et al. 2006), protein digestibility (Santigosa et al. 2011), growth rate (Gómez-Requeni et al. 2005; Santigosa et al. 2008; Hua and Bureau 2012), and gut integrity (Glencross et al. 2006). Furthermore, the apparition of most amino acids (essential and non-essential) in the plasma after intestinal absorption is slower in rainbow trout fed protein of plant origin compared to trout fed protein of fishmeal origin (Yamamoto et al. 1998; Larsen et al. 2012). In terms of lipids, the incorporation of oil of plant origin in the trout diet reduces plasma cholesterol and low-density lipoproteins (Ingham and Arne 1977; Richard et al. 2006). Given that metabolites enter into the plasma compartment through specific intestinal transporters once the ingested feed has been appropriately hydrolysed into short glucose, monoglycerides and amino acids, it is relevant to study the impact of the replacement of FM and FO by feedstuffs of plant origin on the main plasma metabolites and on gastric and intestinal capacity (digestive enzymes and nutrient transporters).

Understanding of the postprandial (PP) dynamics of gastric and intestinal gene expression in rainbow trout is still limited. However, previous studies in trout have shown the importance of their nutritional status in both gastric and intestinal gene expression. For instance, in a study involving carnivorous white seabream (*Diplodus sargus*), gastric pepsinogene transcription peaked from the twelfth till the twenty-first hour post feeding (Yúfera et al. 2012). The nature of the diet can also affect the transcription level of intestinal nutrient transporters. PepT1 mRNA abundance was shown to be higher in the omnivorous red crussian carp (*Carassius auratus gibelio x Cyprinus carpio*) fed fish meal than in those fed soybean meal (Liu et al. 2014). Starch intake does not enhance the transcription of intestinal glucose transporters GLUT2 in rainbow trout (Kirchner et al. 2008; Kamalam et al. 2013), but is associated with higher expression of Pept1 (Kamalam et al. 2013). Findings regarding the effects of starch on the expression of the glucose

transporter SGLT1 are still contradictory in this fish species (Kirchner et al. 2008; Kamalam et al. 2013).

In the study presented here we first measured in rainbow trout the impact of plant protein and plant oil consumption on plasma metabolites which are, in part, the products of the feed digestion and then, we approach the postprandial molecular regulation of proteins involved on digestion. However, it first seemed crucial to study the postprandial kinetics of gene expression involved in the digestive process in this fish species and in our experimental conditions. The aim was to determine how long after the last meal it would be appropriate to carry out the sampling needed for the study of the GIT response to the alternative diets. We then compared the molecular response of the GIT of trout fed a diet rich in fish meal and fish oil with that of the GIT of trout fed a diet with partial or total replacement of fish meal and fish oil by plant proteins and vegetal oils. The study focused on the gene expression of the main gastric and intestinal digestive enzymes (pepsinogen, gastric lipase, prolidase, maltase and phospholipase), and of the main intestinal nutrient transporters (PEPT1, SGLT1, and GLUT2). Enzyme gene expression was then compared to the digestion end-products, i.e. plasma glucose, triglycerides and amino acid levels.

## **Materials and methods**

### *Fish and diets*

The experiment was carried out in accordance with the Guidelines of the National Legislation on Animal Care of the French Ministry of Research (Decree N°2001-464, May 29, 2001) and the Ethics Committee of INRA (INRA 2002-36, April 14, 2002).

The fish used in this experiment came from another study supported by the FP7 programme of the European ARRANA project (Advanced Research Initiatives for Nutrition and Aquaculture) (N°288925) and by the FUI VegeAqua project. As described in Lazzarotto et al (2014), the aim was to study the long-term effects of diets free of fish meal (FM) and fish oil (FO), from first feeding onwards. Rainbow trout alevins (*Oncorhynchus mykiss*; initial body weight of 0.14g) produced by the INRA experimental fish farm at Lees Athas (Pyrénées Atlantique, France; natural photoperiod and constant water temperature of 7°C) were fed from their first meal one of three different experimental diets: a diet rich in fishmeal and fish oil (FM-FO), a plant-based diet (noFM-noFO) totally free from fish meal and fish oil, but containing plant ingredients, and a Mixed diet (Mixed) intermediate between the FM-FO and noFM-noFO diets (Table 1). After seven months of rearing the fish were transferred to the INRA

experimental fish farm of Donzacq (Landes, France; natural photoperiod and constant water temperature of 17°C) where they were reared for another eight months, till the final sampling time.

At the end of the study, the trout (15 months old) fed the NoFM-noFO diet had significantly lower body weights ( $P < 0.001$ ) than those fed the FM-FO and Mixed diets ( $248 \pm 8$  versus  $357 \pm 9$  and  $371 \pm 8$ g, respectively) and a lower feed intake when expressed as g of feed ingested per fish ( $3.85 \pm 0.01$  vs.  $5.75 \pm 0.08$  and  $5.62 \pm 0.19$  g/trout/day, respectively) over the whole period. However, when the feed intake was expressed as percentage of g fish body weight, there was no difference between the dietary treatments ( $1.46 \pm 0.03$  % body weight/day). There was no difference between the treatments in the global feed efficiency ( $1.07 \pm 0.03$  g/g). In fact, the growth difference was mainly caused by a transiently lower feed efficiency in trout fed the noFM-noFO diet measured during the rearing at Lees Athas (water temperature: 7°C), then during the first 3 months of feeding at Donzacq (water temperature: 17°C).

All diets were manufactured at the Donzacq INRA facility (France) using a twin-screw extruder (Cletral). Diets were formulated to meet the nutritional requirements of rainbow trout (NRC 2011). There were three dietary conditions as already described: the FM-FO, noFM-noFO and Mixed diets. In the noFM-noFO and Mixed diet, in order to avoid exceeding anti-nutritional factor content, we used a blend of different plant ingredients. Synthetic L-lysine, L-methionine,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and soy-lecithin were added to the NoFM-noFO diet to correct any deficiency in essential amino acids, phosphorous and phospholipid. The three experimental diets were formulated to be as isonitrogenous and isoenergetic as possible, but in reality, although the measured energy content was similar, the protein and fat content levels measured were lower with the FM-FO diet (protein 43.9% DM, fat 21.8% DM) than with the Mixed and noFM-noFO diet (protein 46.1-46.3 % DM, fat 24.2-25% DM) (Table 1). On a digestible basis (calculated data), there was also some differences: from 37 to 41% DM of digestible proteins and from 18 to 20 kJ/g DM for digestible energy, the diet noFM-noFO diets being that with the highest digestible protein and energy contents. The dietary level of starch was very different, the highest level (19.3% DM) was obtained with the FM-FO diet (rich in FM but also containing 30% whole wheat) and the lowest with the noFM-noFO diet (7.8% DM). Trouts were fed the experimental diets until visual satiety. Diets were distributed manually and the number of meals was adjusted according to the physiological needs of the fish: from 8 meals per day in alevins to only one meal per day in on-growing trouts at the end of the study.

**Table 1.** Ingredient composition and nutrient composition of the three experimental diets

Ingredients (% as fed basis)	FM-FO	Mixed	noFM-noFO
Norwegian herring meal (CP 70; Sopropêche, France)	54.3	30.0	0
Corn gluten meal (CP 60; Inzo, France)	0	10.3	18.0
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)	0	5.0	12.1
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)	0	6.3	4.3
Soy protein concentrate (Estrilvo; CP 70; Sopropêche, France)	0	3.5	18.1
White lupin meal (Terrena, France)	0	6.5	5.0
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France)	0	7.0	2.4
Rapeseed meal (SudOuest Aliment, France)	0	6.3	9.9
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	30.1	7.2	2.8
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	13.6	8.0	0
Rapeseed oil (Daudruy, France)	0	8.0	7.3
Linseed oil (Daudruy, France)	0	0	7.4
Palm oil (Daudruy, France)	0	0	3.0
Soy lecithin (Louis François, France)	0	0	2.0
L-lysine (Eurolysine)	0	0.05	1.5
L-methionine (Evonik, Germany)	0	0	0.3
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18 %P; 22 % Ca)	0	0	2.6
Attractant mix <sup>a</sup>	0	0	1.5
Mineral premix <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0
Vitamin premix <sup>c</sup>	1.0	1.0	1.0
<b>Analysed macro-nutrient composition</b>			
Dry matter (DM, % diet)	96.3	96.0	96.3
Protein (% DM)	43.9	46.3	46.1
Fat (% DM)	21.8	24.2	25.0
Energy (kJ/g DM)	24.5	23.8	25.3
Ash (% DM)	7.9	6.1	5.7
Starch (% DM)	19.3	11.41	7.8
<b>Theoretical digestible nutrients composition <sup>d</sup></b>			
Digestible protein (% DM)	38.0	37.1	40.7
Digestible energy (% DM)	17.7	19.0	20.1

DM: dry matter

<sup>a</sup> Attractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g

<sup>b</sup> Mineral premix (g or mg kg<sup>-1</sup> diet): calcium carbonate (40 % Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60 % Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75 % I), 0.4 mg; zinc sulphate (36 % Zn), 0.4 g; copper sulphate (25 % Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33 % Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20 % Ca, 18 %P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30 % Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA)

<sup>c</sup> Vitamin premix (IU or mg kg<sup>-1</sup> diet): DL- $\alpha$  tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1,000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA)

<sup>d</sup> Calculated from ADC values given in Sauvant et al (2004), NRC (2011) and Feedipedia (Animal feed resources information system; <http://www.feedipedia.org>).



## *Sampling*

Fifteen months after their first feeding with the three different diets, all fish were left unfed for 72 hours, and then given a single meal to visual satiation. The aim of this 72 hours of starvation was to obtain the basal levels of plasma metabolites, reached later in fish than in mammals due to slower intestinal transit and longer gastric emptying time at low temperatures compared to endothermic animals.

Samplings was performed at the end of the fasting period (starved), and 2, 6 and 12 hours after the single meal (H2, H6, and H12). At each sampling time, 9 fish per condition were killed by anesthetic overdose (benzocaine at 0.06%). Blood was removed from the caudal vein into heparinized syringes and rapidly centrifuged (3000g, 5 min); the plasma recovered was then frozen and kept at -20°C until analysis of the plasma metabolites. In order to study the digestive and absorptive capacity of the GIT, we focused on the main digestive enzymes and transporters present in the pyloric portion of the stomach and in the anterior portion of the intestine. We intentionally discarded the more distal intestinal region because the more anterior region makes a greater contribution to nutrient absorption (Ferraris and Ahearn 1984). The pyloric stomach and mid gut were opened lengthwise in order to remove the remaining digested feed. Both were then rinsed in three successive baths of physiological salt solution (NaCl 0,9%) and the scrubbed mucosa were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis.

## *Analysis of Plasma metabolites*

Circulating metabolite levels were measured using commercial kits: plasma glucose using the Glucose RTU™ kit from bioMerieux (Marcy-l'Etoile, France), plasma triglycerides using the WTRIG050 kit from Sobioda (Montbonnot-Saint-Martin, France), and total plasma free amino acids by the ninhydrin reaction (Moore, 1968), with glycine (Sigma) as the standard.

## *Gene expression analysis by quantitative RT-PCR*

Samples were taken from trout fed the FM-FO diet for the study of the kinetics of gene expression. Using the data obtained in the kinetics study, we chose the most appropriate postprandial times to study the impact of replacement of the FM-FO diet by Mixed and noFM-noFO diets.

Total RNA was extracted from the scrubbed mucosa of the pyloric stomach and of the mid gut using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations (n=6 for each condition). Concentration (ng/ $\mu$ L) and purity (A260 nm / A280 nm) of the isolated RNA were measured using a nanodrop, and the integrity of the RNA extracted was evaluated by agarose gel electrophoresis.

Total RNA (1 $\mu$ g) was then used for the reverse transcription. RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScriptIII RNaseH-reverse transcriptase kit (Invitrogen) and random primers (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturers protocols.

Relative gene expression of mRNA was then determined by quantitative real-time PCR using the Roche Lightcycler 480 system (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France). The assays were performed using a reaction mix of 6  $\mu$ L per sample, each of which contained 2  $\mu$ L diluted cDNA template, 0.12  $\mu$ L of each primer (400nM), 3  $\mu$ L Light Cycler 480 SYBR® Green I Master mix and 0.76  $\mu$ L DNase/RNase-free water (5 Prime GmbH, Hamburg, Germany).

The PCR protocol was initiated at 95°C for 10 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start *Taq* polymerase activation, followed by 45 cycles of a two-step amplification programme (15 s at 95°C; 40 s at 60°C). Melting curves were systematically monitored (temperature gradient ranging from 65 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the production of a single product. Each PCR assay included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification) and negative controls (reverse transcriptase- and cDNA template-free samples). The qPCR assay was optimized with a linear standard curve ( $R^2 > 0.98$ ) and checked for congruity across replicates. PCR reaction efficiency for each run was estimated based on the slope of the 5 point standard curve obtained with serial dilutions of pooled sample cDNA. PCR reaction efficiency ranging from 1.8 to 2.2 was considered to be acceptable. Gene expression data obtained from qPCR were normalised using the NORMA-gene algorithm, which uses a least squares method to minimize data variability, and which does not require the identification and validation of reference genes to calculate a normalisation factor without the use of reference genes (Heckman et al. 2011).

The transcripts analysed in the stomach were pepsinogen (PEPS) for protein luminal digestion and gastric lipase (GLIP) for lipid luminal digestion. The transcripts analysed in the intestine were the peptide transporter *Pept1* for peptide transport, prolidase (*Prlid*) for cytosolic peptide digestion, maltase for membrane-bound maltose hydrolysis, the glucose

transporters GLUT2 and SGLT1, and phospholipase A2G12a (PhLip) for luminal phospholipid digestion (Table 2). The GLIP, Peps, Prld, and PhLip primers were designed using the Primer3plus browser (<http://bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) based on the cDNA sequences obtained from the Sigenae (<http://sigenae.org/>), Genoscope trout (<http://genoscope.cns.fr/trout/>) or The Institute for Genome Research (TIGR) genome databases. When it was possible, the primers thus designed were constructed on cDNA sequences that covered two different exons, in order to avoid the amplification of residual DNA from the RNA extraction. Amplicons obtained after PCR were sent for sequencing for validation of each primer. Primers were validated when the sequences obtained matched well with their corresponding cDNA sequence on the ClustalW2 sequence alignment browser (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and when the blast of the sequence obtained on the NCBI database yielded the expected protein.

**Table 2.** Sequence of primers used for qRT-PCR.

Organ analysed	Gene	Primer sequence (5' – 3')	Database, Accession number
Stomach	PFPS	<b>F:</b> GTTTCGGTGGGAGGCATCT <b>R:</b> TGTTCCGAAAGACACCACA	Sigenae, <b>CX136077.s.om.10</b>
Stomach	GLIP	<b>F:</b> TCAACATGACTCGCACACCT <b>R:</b> TTCATGTCCCGGATGTTGTA	Sigenae, <b>CB492742.s.om.10</b>
Intestine	PEPT1 <sup>a</sup>	<b>F:</b> CCTGTCAATCAACGCTGGT <b>R:</b> CACTGCCATAATGAACACG	GenBank, EU853718
Intestine	Prolidase	<b>F:</b> GCCATAAAGAGATCATGAAGC <b>R:</b> CGTTGTTCCAGTCCACAG	Genoscope, GSONMT00010279001
Intestine	Maltase <sup>b</sup>	<b>F:</b> GCAGCAGGAATACCCTACGA <b>R:</b> GGCAGGGTCCAGTATGAAGA	TIGR, TC3451
Intestine	GLUT2	<b>F:</b> GTGGAGAAGGAGGCGCAAGT <b>R:</b> GCCACCGACACCATGGTAAA	GenBank, AF321816
Intestine	SGLT1 <sup>b</sup>	<b>F:</b> TCTGGGGCTGAACATCTACC <b>R:</b> GAAGGCATAACCCATGAGGA	GenBank, AY210436
Intestine	Phospholipase A2G12	<b>F:</b> TGTGTCATGTAGTAAGGAACCTGAA <b>R:</b> TTTGTAACCATCGCTGCATT	Genoscope, GSONMT00024336001

Primers reported by : <sup>a</sup>Ostaszewska et al. (2010), <sup>b</sup>Geurden et al. (2007)

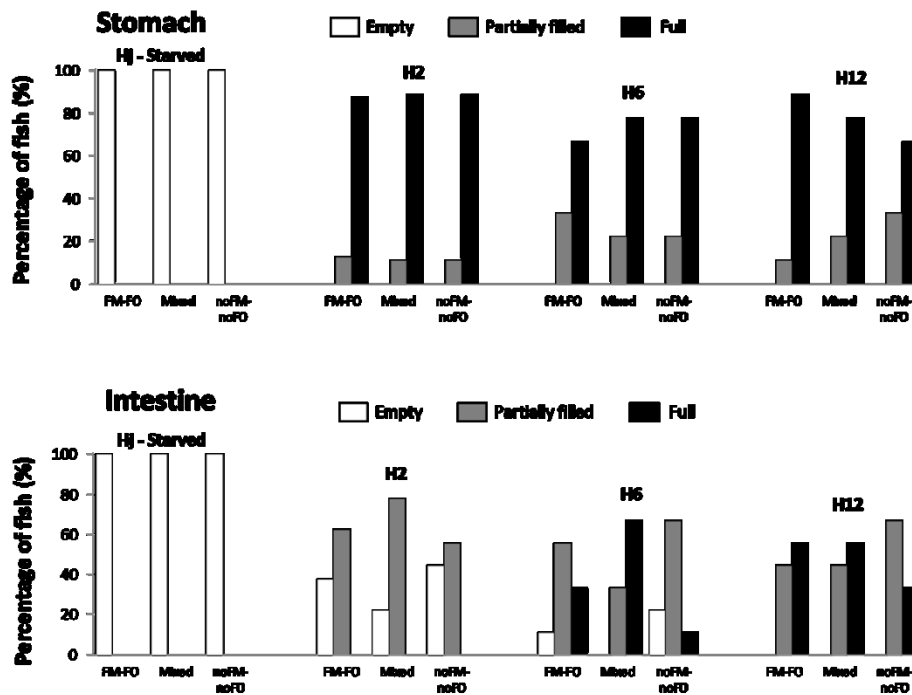
*Statistical analysis*

Statistical analyses on gene expression data and plasma metabolite levels were performed using R.2.14.0. As the body weight of the trout was significantly different between the groups of trout (lower in fish fed the noFM-noFO diet), it was used as covariate in the statistical analysis. Two-way ANCOVA was performed to test whether an interaction existed between the diet and the time of sampling ( $p < 0.05$ ). Gene expression data and plasma metabolite levels were first tested for normality and homogeneity of variances by Shapiro-Wilk and Leven tests, respectively. Additional assumptions were controlled for ANCOVA (linearity of the relationship between the variable and the covariate, homogeneity of regression slopes). Data were then submitted to one-way ANCOVA ( $p < 0.05$ ) to test the significance of the effects of diet or time of sampling when appropriate. When the normality and the homogeneity of variance were significant, post-hoc comparisons were made using the parametric Newman Keuls tests, but the nonparametric Mann Whitney *Wilcoxon test* ( $p < 0.05$ ) was used when at least one of the assumptions did not passed.

## Results

### *Evolution of the filling rates of the stomach and intestine before and after a meal*

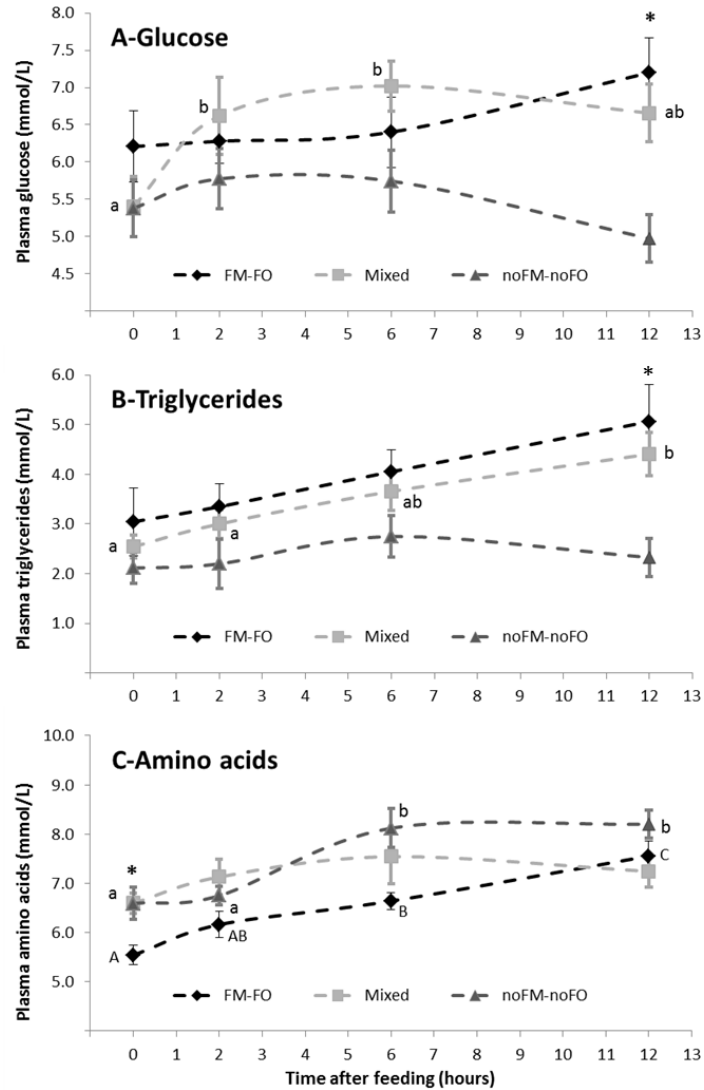
Fig. 1 shows the filling rates of the stomach and intestine of the sampled trout. The stomachs and intestines of all the starved fish were totally empty. Two hours after the meal, the stomachs of almost all fish (about 90%) were full, with the chyme just starting to fill the intestine: the intestines of the majority (56-78%) of the trout were already partially filled. Six hours after the meal, the stomachs of many trout (67-78% of individuals) were still full and the intestines were partially filled (33-67%) or full (11-67%). However, the intestines of some individuals (11-22%) were still empty. Twelve hours after the meal, the stomachs of all fish were still full (67-89%) or partially filled (11-33%), and the intestines were also still full (33-56%) or partially filled (44-67%).



**Fig. 1** Evolution of the filling rates of the stomachs and intestines of trout (n=9 per diet and sampling time) fed the different diets (FM-FO, Mixed and noFM-noFO) at four different sampling times (starved, then 2, 6, and 12 hours after the last meal).

*Impact of nutritional status on the plasma metabolite levels:*

The levels of plasma metabolites were measured for each experimental diet (noFM-noFO, Mixed and FM-FO diets) at each sampling time (in starved fish, then 2, 6 and 12 hours after the meal). There was no significant “Diet\*Sampling Time” interaction (Two-way ANCOVA;  $p=0.151$ ,  $p=0.416$ ,  $p=0.193$  for glucose, triglycerides or amino acids, respectively) for any of the metabolites studied after controlling for the effect of the trouts body weight. However, there were some significant “Diet” and “Time” effects for some of the metabolites (Fig. 2).



**Fig. 2** Plasma glucose (A), triglycerides (B) and total amino acid (C) levels of trout (n=9 per diet and sampling time) fed different diets (FM-FO, Mixed and noFM-noFO) at four different sampling times (starved, then 2, 6, and 12 hours after the last meal). For each diet, values (means  $\pm$  standard errors) without common letters over the 4 sampling times are significantly different, while *Asterisks* indicate significant differences detected between the three dietary treatments at each sampling time ( $p < 0.05$ ; Two-way MANCOVA using the fish body weight as covariate, and Newman-Keuls test as Post Hoc Test).

When the evolution of the plasma glucose levels over time was considered (Fig. 2A), there were significant changes only with the Mixed diet ( $p = 0.046$ ), with a significant peak observed 6 hours after the meal (One-way ANCOVA with control for the effect of the trouts body weight). However, although there was a significant “Diet” effect ( $p = 0.031$ ) only 12 hours after the meal, the plasma glucose level being significantly lower in trout

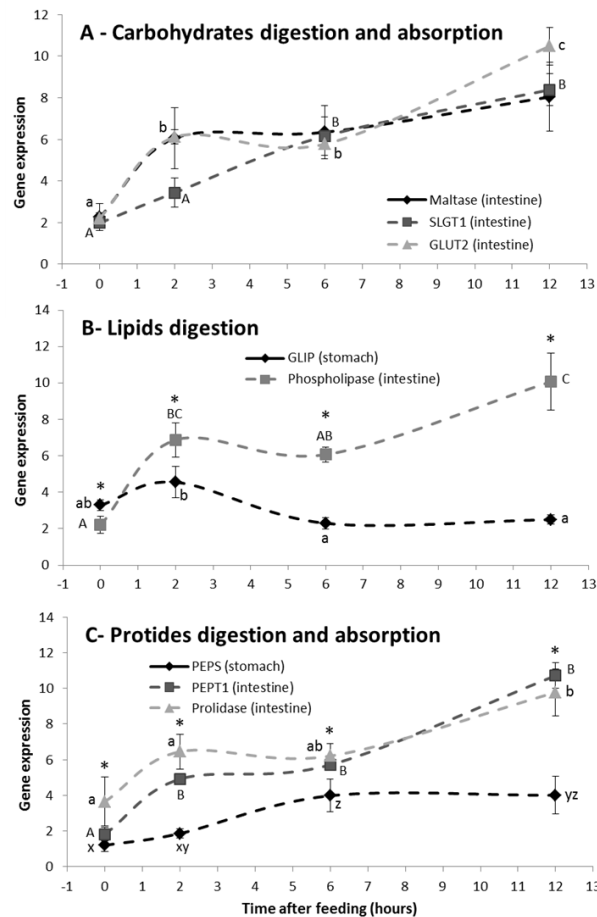
fed the noFM-noFO diet compared to the others, the pattern of evolution over time seemed different according to the diet. The basal plasma (in starved fish) glucose level was slightly higher in trout fed the FM-FO diet than that observed with the Mixed and noFM-noFO diets. The glucose level then increased but later (from 12 hours after the meal) than that observed in the trout fed the Mixed diet (from 2 hours after the meal). The plasma glucose level remained low in trout fed the noFM-noFO diet, i.e. in a normal range, throughout the post-prandial period.

The evolution of the plasma triglyceride levels over the post-prandial period appeared similar in trout fed the FM-FO and Mixed diets (Fig. 2B), increasing with time and presenting a peak 12 hours after the meal, although it was significant ( $p=0.009$ ) only with the Mixed diet. In contrast, the triglyceride levels remained low over time in trout fed the noFM-noFO diet and they were significantly lower than those observed in the FM-FO and Mixed diet trout 12 hours after the meal ( $p=0.049$ ).

The pattern of evolution of the total amino acid levels over time (Fig. 2C) was different from that observed with the other metabolites. Indeed, the basal level ( $H_0$ ) was significantly lower in trout fed the FM-FO diet compared to the others ( $p=0.009$ ). The plasma amino acids levels then increased during the post-prandial period although it was not significant in trout fed the Mixed diet. In trout fed the noFM-noFO diet, a significant peak was observed from 6 hours after the meal ( $p=0.0006$ ), while it appeared later in the FM-FO-fed trout, i.e. from 12 hours after the meal ( $p=0.00008$ ).

#### *Post-prandial kinetics of the expression of genes involved in the digestive process*

Comparative analysis of the expression of genes involved in the digestive utilization of feed measured at four postprandial times (fasted, 2 PP, 6 PP, and 12 PP) in trout fed the FM-FO diet showed that the expression of some genes measured in the stomach and in the proximal intestine were significantly affected by nutritional status, even after controlling for the effect of the trouts body weight (covariate) (Fig. 3).



**Fig. 3** Post-prandial kinetics of the expression of genes involved in the digestion and absorption of carbohydrates (A), lipids (B) and protides (C) in the stomach and proximal intestine of rainbow trout fed a fishmeal-based diet (FM-FO) at four different times (starved, then 2, 6, and 12 hours after the last meal). For each gene, means ( $\pm$  standard error,  $n=6$ ) without common superscript letters are significantly different, while Asterisks indicate significant differences detected between genes at each sampling time ( $p < 0.05$ ; One-Way ANCOVA using the fish body weight as covariate, and Newman-Keuls test as Post Hoc Test).

The expression of the three studied genes involved in the digestion and absorption of carbohydrates (Fig. 3A) in proximal intestine increased over the postprandial period, although it was not significant in the case of the maltase gene, maybe because of a higher inter-individual variation ( $p=0.072$ ,  $p=0.0001$  and  $p < 0.00001$  for maltase, SGLT1 and GLUT2, respectively). The gene expression of the brush border enzyme maltase and of the apical membrane transporter SGLT1 increased early after the meal (from 2 PP), while it started to increase later (from 6 PP) in the case of the basal membrane transporter GLUT2. The highest values were observed at the latest sampling time (12 PP) for these three genes.



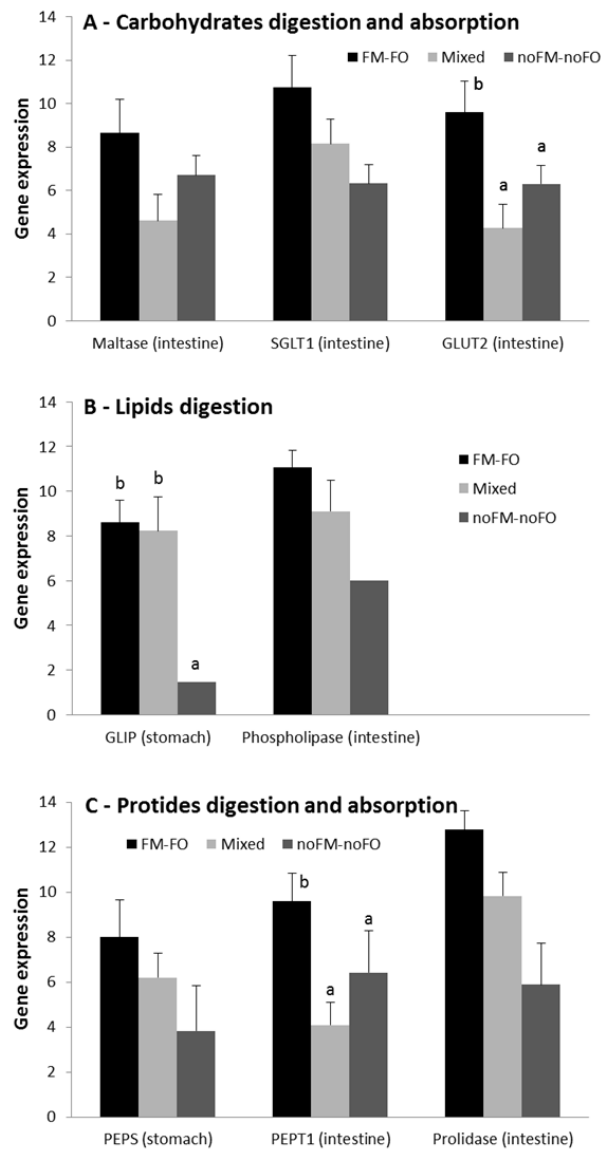
The maximum expression of the gene involved in lipid digestion in the stomach (GLIP) was recorded very early, i.e only two hours after the meal ( $p=0.023$ ) (Fig. 3B). In the intestine, the gene expression of phospholipase ( $p=0.003$ ) started to increase also early after the meal (2 PP), but the maximum expression was observed at the latest sampling time (12 PP). The basal level of expression of GLIP in the stomach was significantly higher ( $p=0.003$ ) than that of the gene coding for phospholipase, but the situation is reversed after the meal ( $p<0.0001$ ,  $p<0.000001$  and  $p=0.0002$  at 2 PP, 6 PP and 12 PP, respectively)

Concerning the digestion and absorption of proteins (Fig. 3C), surprisingly, the expression of the PEPS-encoding gene in the stomach was significantly higher only six and twelve hours PP compared to its expression level in starved fish ( $p=0.002$ ), and remained significantly lower than that of the intestinal genes (PEPT1 and Prolidase) during the post-prandial period ( $p<0.00001$ ,  $p<0.000001$ ,  $p<0.00001$  at 2 PP, 6 PP and 12 PP, respectively). The postprandial kinetic of the expression of the brush-border membrane transporters (PepT1) and of the enterocyte cytosolic digestive enzyme (prolidase) were similar and both affected by the nutritional status of the trouts ( $p<0.000001$  and  $p=0.047$ , respectively): the levels of expression started to increase already two hours after the meal and the maximum were observed at the last sampling time (12 PP).

#### *Effects of diet composition on the gastro-intestinal expression of genes involved in the digestive process*

In accordance with the results of the kinetics study, the effects of diet composition were studied on the gene expression of all the digestive enzymes studied and on the nutrient transporters from the intestine at 12 PP. The gene expression of PEPS in the stomach was studied at 6 PP. The choice of the right time to study GLIP gene expression was more difficult because, although the kinetics study showed that the maximum level of gene expression was reached 2 hours after the meal, that seemed very early after feed intake. As a consequence, expression of the GLIP gene was studied twice i.e at 2 and 6 hours after the meal.

The expression of almost all genes (excepted PEPS) was significantly impacted by the diets composition when the trouts body weight was not used as covariate in the statistical analyse. However, when the effect of body weight was controlled, the “diet” effect concerned a lower number of genes (Fig. 4).



**Fig. 4** Effect of feed composition on the expression of genes involved in the digestion and transport of carbohydrates (A), lipids (B) and protides (C) in the stomach (sampled 6 hours after the meal) and proximal intestine (sampled 12 hours after the meal) of rainbow trout fed a fishmeal-based diet (FM-FO), a mixed diet (Mixed) or a plant-based diet (noFM-noFO). For each gene, means ( $\pm$  standard error, n=6) without common superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ; One-Way ANCOVA using the fish body weight as covariate, and Newman-Keuls test as Post Hoc Test).

Among the three studied genes involved in the digestion and absorption of glucides (Fig. 4A), only the expression of the intestinal transporter GLUT2 was significantly affected by the diet composition ( $p=0.003$ ): the FM-FO diet induced a higher GLUT2 expression than the Mixed and noFM-noFO diets. For lipids digestion (Fig. 4B), only the expression in the stomach of GLIP was affected by the diet composition, but only 6 hours after the meal ( $p=0.0005$ ): it was significantly more highly expressed in trout fed the FM-FO and Mixed diets than in trout fed the noFM-noFO diet. At 2 PP, no significant difference was observed ( $P=0.66$ ) (data not shown). Concerning the protides digestion and absorption (Fig. 4C), PEPT1 gene transcription in the intestine was significantly enhanced in trout fed the FM-FO diet compared to those fed the Mixed and the noFM-noFO diets ( $p=0.007$ ). The expression of the two other genes was not significantly impacted by the diet.

## **Discussion**

The study presented here addressed the impact of the nature of the diet (with greater or lesser quantities of fish meal and fish oil) on the concentration of the main plasma metabolites in rainbow trout, and then focused on the gene expression of important digestive enzymes and nutrient transporters. We therefore first defined the most appropriate time to sample the stomach and the intestine for measurement of the gene expression of the digestive enzymes and nutrient transporters investigated here. Targeted genes (gastric and intestinal digestive enzymes : PEPS, GLIP, prolidase, maltase and phospholipase; intestinal nutrient transporters: PEPT1, SGLT1, GLUT2) were chosen since they contribute to the digestion and absorption of the main feed components: carbohydrates, lipids and proteins.

### *Kinetics of digestion*

The time the digesta remains in the different gastro-intestinal compartments in rainbow trout depends on the trout body-weight, the rearing water temperature and the dryness of the pellets (Fauconneau et al. 1983; Ruohonen et al. 1997), but also most probably the size of the meal. In rainbow troutss weighing 300-400 g reared at 10-13°C, when they receive a single meal (commercial diet, ration of 2% of their body mass) after a one week of fasting, the chyme leaves the stomach and starts to fill the anterior intestine 8 hours after the meal, and the intestine finishes emptying at 72 hours (Bucking and Wood 2006).

In our study, with trout weighing 250-370g reared at 17°C, the chyme had already filled the intestine 2 hours after a single meal in the majority of individuals, and this compartment was still full or at least partially filled 12 hours after the meal in all fish. Obviously, the higher water temperature in our study led to a higher chyme transfer speed between the stomach and the intestine. However, as the last sampling was performed 12 hours after the meal, it was not possible in our study to determine whether transit of the chyme would also have been shorter in the intestine at 17°C than at 10-13°C.

This study demonstrated that the expression of all the gastrointestinal genes studied were related to the nutritional status of the trout and the existence of temporal dynamics, as already suggested in the white seabream (Yúfera et al. 2012) and in the red crussian carp (Liu et al. 2014). In stomach, a peak of expression of the gastric lipase (GLIP) gene occurred rapidly, from the second hour PP, and was already complete 6 hours after the meal, whereas the stomach was still full or partially filled with chyme in all trout 12 hours PP. There was also an increase of pepsinogen (PEPS) gene expression, but this occurred later. Indeed, it occurs from 6 hours PP and is not fully complete 12 hours PP. Yufera et al. (2012) reported a peak of PEPS gene expression occurring even later in white seabream juveniles (*Diplodus sargus*) reared at 20°C, between 14 and 19 hours PP. As the stomach is the first part of the gastro-intestinal tract filled by the feed, the interval between feed intake and the peak of PEPS gene expression seems long. Although PEPS and GLIP are synthesized by the same gastric cells, *in vitro* studies performed on human gastric explants suggest that the PEPS and GLIP genes are regulated differently in the human gastric mucosa (Basque and Ménard 2000). It has been suggested that regulatory peptides, such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and cholecystokinin (CCK), may influence the secretion and/or activity of GLIP in humans (Wøjdemann et al. 1999; Borovicka et al. 2000), and it has been hypothesized that, as in mammals, the gene expression of PEPS is stimulated in fish by a hormone, i.e. gastrin. Gastrin is released by the stomach (pyloric part) and intestinal endocrine cells in response to the presence of feed in the lumen (Rust 2002).

In the proximal intestine, gene expression of all the proteins studied (prolidase, maltase, phospholipase, peptide transporter PEPT1, and glucose transporters GLUT2 and SGLT1) had already started to increase two hours after the meal and the maximum levels were observed at the last sampling time (12 hours PP). This timing seemed to be in good agreement with the filling rate of the intestine. Santigosa et al. (2008) reported a peak in intestinal alkaline protease activity much earlier (3 hours after a meal) in 120-150g rainbow trout reared at the same temperature as in our study (17°C) and fed different

diets, but no peak of activity was observed for  $\alpha$ -amylase. It is difficult to compare the gene expression of one enzyme (prolidase) and the activity of a family of enzymes (proteases). However, it is surprising that the highest level of gene expression observed in our study occurred after the peak activity reported by Santagosa et al. (2008). The difference in fish size might be one explanation.

The postprandial profiles of expression of all genes studied evidenced that these expressions were stimulated by the presence of nutrients in the digestive tract of rainbow trout and suggested that the secretion of the corresponding digestive proteins would be also stimulated. This is in good agreement with the data of Castro et al. (2015) in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sampled 2, 6 and 12 hours after the meal. Indeed they demonstrated that the activity of the intestinal amylase, lipase, alkaline phosphatase, total alkaline protease and trypsin are stimulated by the feed intake from 2 hours PP. The enzyme activities were very low 24 hours post-feeding, indicating that digestive processes were already completed.

In plasma, amino acids, glucose and triglyceride concentrations were significantly higher from about 6 hours PP for the two first nutrients and about 12 hours PP for the latter. These results suggest that the supply of amino acids and glucose from feed digestion occurs earlier than the supply of triglycerides from dietary fat digestion, although the timing of gene expression of the different enzymes and transporters involved in their digestion and absorption were similar in the intestine. However, the lipids could only not be visible so early in the plasmatic compartment as they took the lymph circulation way. In addition, although we analysed intestinal digestion and absorption efficiency in our study through measurement of the plasma metabolites, it should be borne in mind that the dynamics of the plasma metabolites are not the only consequence of intestinal absorption, but are also related to the tissue metabolic utilisation of the nutrients.

#### *Impact of the nature of the diet on digestion*

Following the results of the kinetics study, the impact of partial or total replacement of fish meal with protein and lipids of plant origin was studied on the gene expression of certain digestive enzymes and nutrient transporters in the stomach at 2 and 6 hours PP and in the intestine at 12 hours PP.

At the end of the study, the trout fed the NoFM-noFO diet had significantly lower body weights than those fed the FM-FO and Mixed diets. It is why the body weight of the fish was used as a covariate in the statistical analyses performed. The size of the last meal distributed up to satiety to the trout was not measured in our study. However, feed intake measured during the rearing period at the Donzacq fish farm was lower in fish fed the noFM-noFO diet when expressed as g of feed ingested per fish. But when the feed intake was expressed as percentage of g of fish body weight, there was no difference between the dietary treatments. The following discussion is based on the hypothesis that the size of the last meal reflected, for each diet, the same pattern.

It is important to note that the feed efficiency and growth rates were also similar during the last period of the experiment, whatever the diet. It seems that the trout finally adapted to the noFM-noFO diet after a transitory period of lower feed intake and feed efficiency, although this adaptation did not result in compensatory growth. Indeed, trout fed this diet presented lower final body weights.

In our study, as suggested by their plasma levels, the replacement of fishmeal by plant ingredients did not seem to reduce the rate of absorption of total amino acids: the evolution of the plasma total amino acid levels over time was similar whatever the diet and the basal levels (in starved fish) were even significantly higher in trout fed the noFM-noFO and the Mixed diets than in those fed the FM-FO diet. These higher basal levels may have resulted from higher levels of protein in the noFM-noFO diet (46.1% DM) and Mixed diet (46.3% DM) than in the FM-FO diet (43.9% DM). However, the gene expression of the proteins involved in the digestion and transport of protides seemed to follow the opposite pattern: the lowest values were observed with the diets rich in plant ingredients, although it was significant only for the gene expression of the transporter PEPT1. Santigosa et al. (2008) observed a much stronger decrease in post-prandial alkaline protease activity (especially trypsin) in trout fed a diet rich in plant protein ingredients and they suggested that this lowest protease activity was caused by the presence of plant protease inhibitors. It is possible that the plant-based diets used in our study contained lower concentration of these antinutritional factor than those of Santigosa et al. (2008), as a result of plant selection and/or technologic improvements.

Vegetable oil added to the noFM-noFO diet might have reduced intestinal lipid absorption, as our results showed significantly lower plasma levels of triglycerides in trout fed the noFM-noFO diet than in trout fed the Mixed or FM-FO diet, despite a slightly higher fat level in the noFM-noFO diet (25% DM in the noFM-noFO diet versus

24.5 and 23.8% DM in the FM-FO and Mixed diets, respectively). The impaired intestinal triglyceride absorption in trout fed the noFM-noFO diet may be in part explained by the lower GLIP expression. This hypothesis is in agreement with the previously reported reduction in GLIP activity in mammals fed compounds of plant origin (cocoa procyanidins, tea polyphenols, hydroxytyrosol and carnolic acid) (Vaquero et al. 2012). It would be interesting to evaluate the impact of a plant-based diet on intestinal lipase gene expression in order to assess whether the same effect occurs at the intestinal level. In addition, it is known that the smaller chain length and the lower degree of unsaturation of the oil in fish fed with vegetal oil lead to an accumulation of lipid droplets in the enterocytes instead of the physiological formation of chylomicron (Olsen et al. 1999; Olsen et al. 2000; Caballero et al. 2002).

Phospholipids are an important part of the cell bio-membrane and need to be provided in the fish diet in order to sustain good growth performance (Coutteau et al. 1997), especially in fry. Vegetal sources (soy lecithin for instance) do not provide the same phospholipids and fatty acids as animal sources, and then have been shown to affect both growth performance and digestive enzyme activities (Azarm et al. 2013). However, in our study, the gene expression of intestinal phospholipase tended to decrease with decreasing levels of FM and FO in the diet, but it was not significant. Obviously the replacement of marine phospholipids by vegetal phospholipids had no significant impact on the gene expression of this enzyme.

The evolution of the plasma glucose concentrations differed according to the diet ingested, but obviously this effect is more likely to be related to the dietary starch levels. In the 72-hours starved fish, the glucose plasma level of trout previously fed the FM-FO diet, the richest in starch (19% DM), was slightly higher compared to those previously fed the other diets and slightly higher than the basal glycaemia (about 5 mmol/l) as determined by Polakof et al. (2012). The glycaemia of the FM-FO trout then remained stable over a longer period than that observed in the fish fed the Mixed diet containing 11%DM of digestible starch. It seems that these fish had higher basal glycaemia levels than the others and were able to maintain glycaemia for longer. This may have been the result of adaptation processes resulting from their early exposure to high levels of digestible dietary carbohydrate. However, after a while, the amounts of starch ingested became so high that fish started to become hyperglycemic. Over the same post-prandial period, the glycaemia level of the trout fed the noFM-noFO diet remained low (close to the basal glycaemia), probably because of the low dietary digestible starch content (8%). These results are in good agreement with those of Polakof et al. (2012) and Geurden et al.

(2014) which showed that early exposure to a diet rich in digestible carbohydrate (40%) appeared to modify the regulatory glycaemia capacity of rainbow trout. The lower ingestion of digestible starch in trout fed the noFM-noFO diet may also explain the lower SGLT1 and GLUT2 gene expression observed in these trout. Consequently, diet composition seemed to affect intestinal glucose absorption.

### *Limitations in the study*

An impact of the noFM-noFO diet on plasma nutrient concentrations was observed in our study as well as an impact on the expression of different genes encoding proteins involved in the digestive process. However, it is difficult to rely these findings to the past nutritional history and past phenotype of the trout. Indeed, as the fish were unfed for 72 hours before sampling, it is not possible to eliminate the possibility that prolonged fasting could modify intestinal physiology in fish and result in a modified digestive process when fish are refed: a kind of adaptation to starvation inducing compensatory growth. In most cases, compensatory growth has been achieved through hyperphagia, an increase in appetite, and sometimes the feed efficiency can be improved (see review by Azodi et al. 2015). Thus, the link between the digestive capacity we analysed after the fasting period and the feed efficiency we measured with data over the whole trout lifespan must be interpreted with caution.

An objective of this study was to choose the most appropriate timing to study the PP gene expression and this choice was made on the FM-FO diet. However, as the kind of diet can strongly influence the digestion time and transit, it is therefore possible that the time chosen for the FM-FO diet was not the most appropriate for the other two diets, especially the noFM-noFO diet.

Moreover, we hypothesise the presence of digestive enzymes and nutrient transporters through their mRNA abundance, but measurement of the activity of the enzymes studied, and measurement of the protein abundance and transport capacity of the transporters studied, are necessary to evaluate the full digestive capacities of this fish. Indeed, the function of these digestive proteins can be modulated at a transcriptional level and/or later at a post-transcriptional level by hormones, antinutritional factors, the chemical and physical environment in the chyme, etc.

Finally, we chose to focus our analysis on the expression of genes encoding intestinal enzymes and transporters in the anterior part of the intestine, since its contribution to



nutrient transport has been shown to be greater than the contribution of the more distal region in rainbow trout (Dabrowski and Dabrowska 1981) and more generally in carnivorous fish (Ferraris and Ahearn 1984). However, the distal segments of the intestine also have a role in the digestive process as they have been reported to ensure the absorption of intact proteins (McLean et al. 1999) and reabsorption of endogenous components (Sire and Vernier 1992). Moreover, a later study on trout fed a plant-based diet containing fewer digestible feedstuffs revealed that certain amino acids that are not absorbed in the anterior part of the intestine can be absorbed later in the distal segments (Santigosa et al. 2008), but without any certainty that the delayed absorption by the distal region of the intestine can effectively compensate for the impaired absorption observed in the anterior region of the intestine.

### **Conclusions and future perspectives**

The control and regulation of the digestive process so that all the various processes occur in a coordinated and timely way are complex. The secretion of digestive juices, coordination of muscle contractions to mix and move the bolus and activation of enzymes and intestinal transporters must all occur in an appropriate and measured process. In our study, the post-prandial filling rate of the stomach and intestine, the gene expression of the proteins (enzymes and transporters) involved in feed digestion and resulting metabolite plasma levels seemed to follow coherent dynamics. Obviously, the maximum levels of expression of most of the studied genes and of plasma metabolites were not reached 12 hours after the meal. It should be interesting to extend the postprandial sampling period in order to observe the return to basal levels.

In our study, a partial or total replacement of FM and FO by plant ingredients induced a significant reduction of the gene expression of a digestive enzyme (gastric lipase which contributes to lipids digestion) and of two intestinal transporters (GLUT2 located on the basal membrane of enterocytes and which transports glucose to reach the lymph system, and PEPT1 located on apical membrane of enterocytes and which mediates the transport of dietary di- and tripeptides into the cytosol). Plasma metabolites levels were also affected by these dietary changes: lower post-prandial concentrations of glucose and triglycerids, but a higher basal concentration of amino acids. These data are not enough to clearly define the impact of the nature of the diet to the efficiency of the digestion and

absorption of nutrients. It is only a first glance. It would be highly valuable now to extend this study to the activity of the digestive enzymes and transporters at least.

## Acknowledgements

This research was supported by the Emergence programme of INRA (2013) and by the ANR AGREENFISH Project (ANR-GUI-AAP-06). In addition, the fish used in this experiment came from a long-term study including the European ARRINA project (Advanced Research Initiatives for Nutrition and Aquaculture) (N°288925) of the FP7 programme and by the FUI project VegeAqua. We thank P. Maunas and N. Turonnet from the INRA experimental facilities of Lées Athas (Pyrénées Atlantique, France) and L. Labbé and T. Kerneis from the INRA PEIMA facilities for rearing of trout alevins, and F. Sandres and F. Terrier for manufacturing the experimental diet and for rearing of the juvenile trout rearing (INRA, Donzax, France). The efforts of Mathilde Burtre which helped to the molecular analysis are also acknowledged.

## References

- Azarm HM, Kenari AA, Hedayati M (2013) Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, Enzymes activity, Cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquac Res* 44:634–644. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03068.x
- Azodi M, Ebrahimi E, Motaghi E, Morshedi V (2015) Metabolic responses to short starvation and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ichthyol Res* 62:177–183. doi: 10.1007/s10228-014-0421-z
- Basque JR, Ménard D (2000) Establishment of culture systems of human gastric epithelium for the study of pepsinogen and gastric lipase synthesis and secretion. *Microsc Res Tech* 48:293–302. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(20000301)48:5<293::AID-JEMT6>3.0.CO;2-A
- Borovicka J, Schwizer W, Guttman G, et al. (2000) Role of lipase in the regulation of postprandial gastric acid secretion and emptying of fat in humans: a study with orlistat, a highly specific lipase inhibitor. *Gut* 46:774–781. doi: 10.1136/gut.46.6.774
- Bucking C, Wood CM (2006) Water dynamics in the digestive tract of the freshwater rainbow trout during the processing of a single meal. *J Exp Biol* 209:1883–1893. doi: 10.1242/jeb.02205
- Caballero M., Obach A, Rosenlund G, et al. (2002) Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 214:253–271. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00852-3
- Castro C, Couto A, Pérez-Jiménez A, et al. (2016) Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish Physiol Biochem* 42(1):203-217. doi: 10.1007/s10695-015-0130-1

- Coutteau P, Geurden I, Camara MR, et al. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155:149–164. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00125-7
- Dabrowski K, Dabrowska H (1981) Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and absorption of amino acids within the alimentary tract. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 69:99–111. doi: 10.1016/0300-9629(81)90643-5
- Fauconneau B, Choubert G, Blanc D, et al. (1983) Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture* 34:27–39
- Ferraris RP, Ahearn G a (1984) Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 77:397–413. doi: 10.1016/0300-9629(84)90204-4
- Geurden I, Aramendi M, Zambonino-Infante JL, Panserat S (2007) Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R2275–R2283. doi:10.1152/ajpregu.00444.2006
- Geurden I, Borchert P, Balasubramanian MN, et al. (2013) The positive impact of the early-feeding of a plantbased diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0083162
- Geurden I, Mennigen J, Plagnes-Juan E, et al. (2014). High or low dietary carbohydrate:protein ratios during first-feeding affect glucose metabolism and intestinal microbiota in juvenile rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology* 217(19): 3396-3406.
- Glencross B, Evans D, Rutherford N, et al. (2006) The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture* 253:512–522. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.009
- Gómez-Requeni P, Calduch-Giner J a, Vega-Rubín de Celis S, et al. (2005) Regulation of the somatotropic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 94:353–361. doi: 10.1079/BJN20051521
- Heckmann L-H, Sørensen PB, Krogh PH, Sørensen JG (2011) NORMA-Gene: A simple and robust method for qPCR normalization based on target gene data. *BMC Bioinformatics* 12: 250-257. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/250>
- Hua K, Bureau D. (2012) Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. *Aquaculture* 356-357:284–301. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.003
- Ingham L, Arme C (1977) Intestinal absorption of amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *J Comp Physiol ? B* 117:323–334. doi: 10.1007/BF00691558
- Jönsson E, Forsman A, Einarsdottir IE, et al. (2006) Circulating levels of cholecystokinin and gastrin-releasing peptide in rainbow trout fed different diets. *Gen Comp Endocrinol* 148:187–194. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.02.016
- Kamalam BS, Panserat S, Aguirre P, et al. (2013) Selection for high muscle fat in rainbow trout induces potentially higher chylomicron synthesis and PUFA biosynthesis in the intestine. *Comp Biochem Physiol -A Mol Integr Physiol* 164:417–427. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.11.020

- Kirchner S, Panserat S, Lim PL, et al. (2008) The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 178:429–438. doi: 10.1007/s00360-007-0235-7
- Larsen BK, Dalsgaard J, Pedersen PB (2012) Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 326-329:90–98. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.11.028
- Lazzarotto V, Médale F, Larroquet L, et al. (2014). Long term feeding rainbow trout with fish meal and fish oil free diet : consequences on growth performance, whole body lipid content and fatty acid profile. In: Symposium Proceedings ISFNF2014 (p. 115). 16th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, May 25-30<sup>th</sup> 2014, Cairns, Australia. <http://prodinra.inra.fr/record/264822>
- Liu Z, Zhou Y, Liu S, et al. (2014) Characterization and dietary regulation of oligopeptide transporter (PepT1) in different ploidy fishes. *Peptides* 52:149–156. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.017
- McLean E, Rønsholdt B, Sten C, Najamuddin (1999). Gastrointestinal delivery of peptide and protein drugs to aquacultured teleosts. *Aquaculture* 177:231-247. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00087-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00087-3)
- Moore S (1968) Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J Biol Chem* 243: 6281–6283. <http://www.jbc.org/content/243/23/6281> Access the most updated version of this article
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau D., et al. (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15103–15110. doi: 10.1073/pnas.0905235106 NRC (2011) National Research Council - Nutrient requirements of fish. Washington DC, National Academic Press.
- Olsen RE, Myklebust R, Kaino T, Ringo E (1999) Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus L.*) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol Biochem* 21:35–44.
- Olsen RE, Myklebust R, Ringo E, Mayhew TM (2000) The influences of dietary linseed oil and saturated fatty Acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus L.*): A quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol Biochem* 22:207–216. doi: 10.1023/A:1007879127182
- Ostaszewska T, Kamaszewski M, Grochowski P, et al. (2010) The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 155:107–114. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.017
- Polakof S, Skiba-Cassy S, Kaushik S, et al. (2012) Glucose and lipid metabolism in the pancreas of rainbow trout is regulated at the molecular level by nutritional status and carbohydrate intake. *J Comp Physiol B*. 182(4):507-516. doi: 10.1007/s00360-011-0636-5. Epub 2011 Dec 22
- Richard N, Mourente G, Kaushik S, Corraze G (2006) Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquaculture* 261:1077–1087. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.021
- Romo Vaquero M, Yáñez-Gascón M-J, Garcia Villalba R, et al. (2012) Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. *PLoS ONE* 7(6): e39773. doi: 10.1371/journal.pone.0039773
- Ruohonen K, Grove DJ, Mellroy J (1997) The amount of food ingested in a single meal by rainbow trout offered chopped herring, dry and wet diets. *J Fish Biol* 51:93–105. doi: 10.1006/jfbi.1997.0415 Rust

- MB (2002) Nutritional Physiology. In JE Halver and RW Hardy, eds. Fish Nutrition, 3rd Edition. Academic Press, San Diego, California, pages 454-504
- Santigosa E, García-Meílán I, Valentin JM, et al. (2011) Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). Aquaculture 317:146-154. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.026
- Santigosa E, Sánchez J, Médale F, et al. (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. Aquaculture 282:68–74. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.007
- Sauvant D, Perez J-M, Tran G (2004) Tables INRA-AFZ de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage: porcs, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. Seconde édition revue et corrigée, mars 2004, INRA Editions Versailles, 304 p. Coord. ISBN 2-7380-1046-6 2002.
- Sire MF, Vernier JM (1992) Intestinal absorption of protein in teleost fish. Comp Biochem Physiol - A Physiol 103:771–781. doi: 10.1016/0300-9629(92)90180-X
- Wøjdemann M, Riber C, Bisgaard T, et al. (1999) Inhibition of human gastric lipase by intraduodenal fat Involves glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin. Regul Pept 80:101–106. doi: 10.1016/S0167-0115(99)00011-7
- Yamamoto T, Tatsuya U, Akiyama T (1998) Postprandial changes in plasma free amino acid concentrations of rainbow trout fed diets containing different protein sources. Fisheries Science 64(3), 474-481
- Yúfera M, Moyano FJ, Astola A, et al. (2012) Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. PLoS One 7:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0033687





**5 ARTICLE 2 : LONG PERIOD RESPONSE (48 HOURS) OF GENES CODING FOR  
PROTEINS INVOLVED IN THE DIGESTIVE PROCESS OF RAINBOW TROUT  
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*) FED A SINGLE MEAL**





## **Préambule– Etude “CINEDIG2”**

### **Long Period Response (48 Hours) of Genes Coding for Proteins Involved in the Digestive Process of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Fed a Single Meal**

Borey M, Aguire P, Panserat S, Plagnes-Juan E, Cluzeaud M, Médale F, Lauga B, Burel C

Il a déjà été observé chez de nombreux mammifères et poissons (Yúfera et al. 2012) que l'expression des gènes impliqués dans le processus de digestion et d'absorption des nutriments dans l'estomac et l'intestin suit une dynamique de rythme circadien ou d'une autre cyclicité. Lors de l'étude CINEDIG1, l'expression de certains gènes de l'intestin (maltase, SGLT1, GLUT2, PepT1, prolidase, phospholipase) augmente suite à l'ingestion, et se stabilise jusqu'au dernier pas de temps recueilli, à savoir 12 heures après le dernier repas. Il n'était donc pas possible d'attribuer pour ces gènes un pas de temps durant lequel leur expression est maximale. Il a donc été décidé de prolonger le suivi de cette première étude CINEDIG1 via une seconde étude cinétique (CINEDIG2). L'expression des gènes de l'estomac et de l'intestin a alors été prolongée, les statuts étudiés étant à jeûn, 2, 6, 12, 24 et 48 heures après le dernier repas. A contrario du premier suivi de cinétique, lors de l'étude CINEDIG1 réalisée sur des truites alimentées avec un régime de type marin riche en farine de poisson et sans huile végétale, l'étude CINEDIG2 a été menée sur des truites alimentées avec un régime de type commercial constitué d'un mélange de farine de poissons et de farine végétale, et d'un mélange d'huile de poissons et d'huile végétale. De plus, la cinétique des gènes du pancréas exocrine codant pour des enzymes de la digestion des protéines, de l'amidon, et des phospholipides a été évaluée. La localisation du pancréas exocrine de la truite est peu décrite dans la littérature scientifique et au moment de cette étude, nous avons choisi de réaliser nos prélèvements au niveau de la vésicule biliaire, là où ont été localisées les cellules du pancréas endocrine.

Le manuscrit présenté est une version provisoire d'un projet d'article qui a été soumis à Fish Physiology & Biochemistry.

# Long Period Response (48 Hours) of Genes Coding for Proteins Involved in the Digestive Process of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Fed a Single Meal

Marion Borey<sup>1,2</sup>, Peyo Aguire<sup>1</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Elisabeth Plagnes-Juan<sup>1</sup>, Marianne Cluzeaud<sup>1</sup>, Françoise Médale<sup>1</sup>, Beatrice Lauga<sup>2</sup>, Christine Burel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 1419 Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, INRA, F-64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France

<sup>2</sup> CNRS/ Univ Pau & Pays Adour, Equipe Environnement et Microbiologie (EEM), Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux – IPREM - MIRA, UMR5254, 64000, Pau, France

\*Corresponding author: Christine Burel

E-mail address [Christine.Burel@inra.fr](mailto:Christine.Burel@inra.fr); Tel +335 59 51 59 77; fax: +335 59 54 51 52.

**Keywords:** Fish; qPCR; Nutrient transporters; Digestive enzymes, Postprandial kinetics, gene expression

## Abstract

New ingredients obtained from plants, algae, yeast, insects, etc. have largely been tested in aqua feed as an alternative to fish meal and fish oil in the last few decades. Gene expression and the activity of gastrointestinal enzymes and nutrient transporters are widely monitored in this context, because the study of their variations helps to confirm that a fish can fully maintain its gastrointestinal capacities and efficiently digest and absorb a new diet. While the set of proteins and enzymes involved in digestion and absorption are well known in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), the knowledge of their postprandial dynamic is still limited. However, it appears crucial to study these variations over time and to measure the digestive capacities of fish to synchronize the sampling procedure with the times when gene expression, for instance, is at its highest.

The purpose of this study was to measure the postprandial kinetics of gene expression of the main gastric (pepsin, gastric lipase), intestinal (maltase, prolidase, aminopeptidase-N, intestinal alkaline phosphatase IAP), and pancreatic digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin, amylase) in juvenile rainbow trout (177 g) reared at 18 °C, as well as those of the main intestinal nutrients transporters (peptide transporter PePT1, sodium-glucose transporter SGLT1, and glucose transporter GLUT2), over 48 hours after a single meal. Our results showed that the arrival of feed in the gastrointestinal tract (GIT) seems to be a trigger for the gene expression of certain intestinal actors, but the observation of various patterns of postprandial evolution of these expressions suggests a wide variety of regulation mechanisms. It is therefore difficult from a practical point of view to determine a single perfect time for sampling the GIT in the context of nutritional studies.

## Introduction

The expansion of aquaculture is strongly related to the evolution and improvement of fish nutrition. In the last decade, products of plant origin have increasingly been incorporated into aqua feed as alternative ingredients to fish meal and fish oil. More recently, other alternatives have also been tested, such as fungal, algal, transformed animal proteins (TAP), or insect feedstuffs (Naylor et al. 2009; Terova et al. 2013; Pahlow et al. 2015). Gene expression and the activity of gastrointestinal enzymes and nutrient transporters are widely studied in this context; their variations are monitored, aiming to confirm that a fish can fully maintain its gastrointestinal capacities and efficiently digest and absorb a diet containing these new ingredients (Santigosa et al. 2008; Ostaszewska et al. 2010a). Therefore, a good knowledge of the synthesis and/or activity of the digestive enzymes and other actors in the digestive process of fish has important practical implications for research in fish nutrition.

The various processes involved in the digestive function must all occur in a coordinated and timely way, and their control and regulation are complex. Thus, enzyme and intestinal transporter activation must take place according to an appropriate and measured process. The set of proteins involved in rainbow trout gastrointestinal digestion and absorption are well known (*Oncorhynchus mykiss*) (Santigosa et al. 2008; Ostaszewska et al. 2010a; Golchinfar et al. 2011; Azarm et al. 2013; Ramzanzadeh et al. 2016), while the knowledge of their postprandial dynamic remains limited, though daily oscillations have already been observed, both in rainbow trout (Santigosa et al. 2008), and in other fish species (Uys et al. 1987; Einarsson et al. 1996; Garcia-Ortega et al. 2000; Fountoulaki et al. 2005; Vera et al. 2007; Santigosa et al. 2008; Caruso et al. 2008; Montoya et al. 2010; Yúfera et al. 2012; Guerra-Santos et al. 2017). However, it appears crucial to consider gene expression or enzyme activity variations occurring in the gastrointestinal tract (GIT) in studies which also measure the fish's digestive capacities, in order to synchronize the sampling procedure with the times when gene expressions or enzyme activities are at their highest. However, sampling times of the GIT in many studies are either not specified (Ostaszewska et al. 2010a), or if mentioned, the chosen timing does not appear to be based on a precise knowledge of the postprandial dynamic of the studied GIT proteins (Geurden et al. 2007, Kamalam et al. 2013). Sometimes, the absence of a significant difference in the response of these GIT actors among distinct conditions could not only be due to the absence of a biological response, but could also unfortunately be explained by a missed observation due to an inappropriate sampling time of the GIT.

To our knowledge, only a few authors—including our team—have started to provide information on the postprandial kinetic of various GIT proteins involved in rainbow trout

digestion and absorption: intestinal proteolytic and amylasic activities (Santigosa et al. 2008), gene expression of the gastric HCO<sub>3</sub>-cotransporter (Bucking and Wood 2012), gastric lipase, pepsinogen, prolidase, maltase, phospholipase A2, peptide transporters PePT1, sodium-glucose transporter SGLT1, and glucose transporter GLUT2 (Borey et al, 2016). Borey et al (2016) demonstrated that the postprandial stomach and intestinal fill rate, the gene expression of these digestive enzymes and intestinal transporters, and the resulting metabolite plasma levels, all followed a coherent dynamic. In this study, juvenile trout were left unfed for 72 hours and then given a single meal to satiation. The kinetics was then studied starting before the meal (starved trout), and at 2, 6 and 12 hours after the meal. Results showed that the expression of almost all those genes was stimulated by the presence of nutrients in the trout's digestive tract. The timing of expression increase varied between genes and was observed between 2 and 12 hours after the meal, but the maximum levels of expression for most of the studied genes had not yet been reached 12 hours after the meal.

The purpose of the present study was then to 1) extend the range of indicators for GIT functions by including additional enzymes; 2) determine the postprandial kinetic of their gene expression and more precisely the timing of maximum levels and that of the return to basal levels; and 3) determine the best timing for GIT sampling in the context of studies on the impact of dietary factors on the digestive capacities of rainbow trout. The expression of gene coding for the main gastric (pepsin, gastric lipase), pancreatic (trypsin, chymotrypsin, amylase), and intestinal digestive enzymes (maltase, prolidase, aminopeptidase-N, intestinal alkaline phosphatase), and of the main intestinal nutrients transporters (peptide transporter PePT1, sodium-glucose transporter SGLT1, and glucose transporter GLUT2) was measured over a long period of time: in the starved trout, then at 2, 6, 12, 24 and 48 hours after their last meal.

## **Materials and Methods**

### *Fish and Diets*

The experiment was carried out at the INRA experimental facilities (Saint Pée-sur-Nivelle, France), using 20L recirculating aquaculture tanks with well-aerated water at a fairly constant temperature of 18 °C. The recirculation system incorporated mechanical and biological filtration as well as UV radiation. The trout (one-year old; 177 ± 1 g) were randomly distributed (15 trout/tank) among 10 tanks. The photoperiod was artificially created with a light period starting at 8:00 AM and ending at 6:00 PM. The fish were fed a commercial diet manually distributed until visual satiety at a rate of 2 meals per day (8:00 AM and 4:00 PM)

prior to our kinetic study. The trout's "Optiline T-2P" diet (Skretting, France) contained 44% protein and 18.5% lipid, and consisted of the following main ingredients, ranked according to their level of incorporation into the feed (from the highest to the lowest): soya meal, fava beans, hydrolyzed feather meal, fish meal, wheat, pork dehydrated blood meal, soya protein concentrate, poultry fat, fish oil and rape oil.

### *Experimental Design and Samplings*

On D-3, all fish were starved for 72 hours, and were given a single meal at 8:00 AM on D0. Samplings started at the end of the starving period (starved, just before the meal), and were then performed 2, 6, 12, 24 and 48 hours after the single meal (H2, H6, H12, H24, H48). At each sampling time, 9 fish were anesthetized in diluted benzocaine (0.06%) and sacrificed. In order to study the GIT digestive and absorptive capacities based on the amount of gastric and intestinal proteins which successively catalyze different chemical reactions before final intestinal absorption, we focused on the main digestive enzymes and transporters synthesized in the pyloric portion of the stomach, in the anterior portion of the intestine and in pancreatic tissue. We intentionally discarded the distal intestinal region because the anterior region plays a greater role in nutrient absorption (Ferraris and Ahearn 1984). The sampling of trout pancreatic tissue was much more difficult since this is a diffuse tissue. Pancreatic nodules are spread in the adipose and mesenteric tissue around the bile duct, gallbladder, pyloric ceca, and intestines, and are not readily visible (Polakof et al. 2012). The Brockmann bodies of rainbow trout are located within the mesentery that connects the intestine, stomach, liver, and the gallbladder (Polakof et al. 2012). We chose to sample the mesenteric tissue in hopes that large numbers of exocrine cells (acinar cells) would also be found.

With that purpose in mind, the gastrointestinal tract was dissected on ice, and a sample of the "pancreatic tissue" taken. The trout's pyloric stomach and mid gut were opened lengthwise to remove the remaining digested feed; the tissues were then rinsed in 3 successive baths containing a physiological salt solution (NaCl 0.9 %) and the scrubbed mucosa of the stomach and mid gut were carefully removed. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis.

### *Molecular Analysis*

Total RNA was extracted from the scrubbed mucosa of the pyloric stomach and mid gut and from the "pancreatic tissue" using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with

the manufacturer's recommendations. The isolated RNA concentration (ng/ $\mu$ L) and purity (A260 nm / A280 nm) were measured with a NanoDrop. Additionally, the integrity of the extracted RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis. One microgram of the resulting total RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScriptIII RNaseH-reverse transcriptase kit (Invitrogen) and random primers (Promega, Charbonniniar, France) according to the instructions of each manufacturer.

Relative gene expression of mRNA was then determined by quantitative real-time PCR using the Roche Lightcycler 480 system (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France). The assays were performed using a reaction mix of 6  $\mu$ L per sample, each of which contained 2  $\mu$ L of diluted cDNA template, 0.12  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> for each primer), 3 $\mu$ L Light Cycler 480 SYBER Green I Master mix (Roche Diagnostics Gm b H, Mannheim, Germany), and 0.76  $\mu$ L of DNase/RNase-free water. The PCR protocol was initiated at 95 °C for 10 minutes for initial denaturation of the cDNA and hot-start *Taq* polymerase activation, followed by 45 cycles of a two-step amplification program (15 sec at 95 °C; 40 sec at 60 °C). Melting curves were systematically monitored at the end of the last amplification cycle to confirm the production of a unique product. Each PCR assay included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification) and negative controls (reverse transcriptase- and cDNA template-free samples). The qPCR assay was optimized with a linear standard curve ( $R^2 > 0.98$ ) and checked for congruity across replicates. PCR reaction efficiency for each run was estimated based on the slope of the 5 points standard curve obtained with serial dilution of pooled sample cDNA. A PCR reaction efficiency ranging from 1.8 to 2.2 was considered to be acceptable. Relative quantification of target gene expressions was performed using the mathematical model described by Pfaffl (2001).

The relative gene expression of 18S (stomach) and EF1 (intestine and “pancreatic” area) were used for the normalization of measured cDNA, as their relative expression did not significantly change over sampling time (data not shown). PCR efficiency (E) was measured by the slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA. In all cases, PCR efficiency values ranged between 1.8 and 2.2.

The transcripts analyzed are listed in **Table 1**. Primer sequences targeting  $\alpha$ -amylase, gastric lipase, maltase, pepsinogen, prolidase, GLUT2, SLGT1, and PePT1 genes have previously been reported in other studies (Geurden et al. 2007; Ostaszewska et al. 2010b; Kamalam et al. 2012; Borey et al. 2016). Aminopeptidase-N, chemotrypsinogene, intestinal alkaline phosphatase, and trypsinogen primer sequences were designed with the Primer3plus browser (<http://bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) based on the cDNA sequences obtained from the Sigenae (<http://sigenae.org/>) or Genoscope trout (<http://genoscope.cns.fr/trout/>) genome databases. When possible, the designed primers were constructed on cDNA sequences that covered two different exons, in order to avoid the

amplification of residual DNA from the RNA extraction. For each primer validation, amplicons obtained after PCR were sent to sequencing. Primers were validated when there was a good match between the obtained sequences and their corresponding cDNA sequence on the ClustalW2 sequence alignment browser (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), and when the blast of the obtained sequence on the NCBI database gave the expected protein.

**Table 1 : Target genes and primer used for qRT-PCR.**

Analyzed Tissue	Genes	Primer Sequences (5' – 3')	Database Accession Number
Stomach	Pepsinogene	F: GTTTCGGTGGGAGGCATCT R: TGTTCCGAAAGACACCACA	Sigenae <a href="#">CX136077.s.om.10</a>
Stomach	Gastric Lipase	F: TCAACATGACTCGCACACCT R: TTCATGTCCCGGATGTTGTA	Sigenae CB492742.s.om.10
« Pancreatic area »	Trypsinogen	F: CCATGTGTACCGTCTCCTGGA R: CACCCTGGCAAGAGTCCTT	Sigenae CA368365.s.om.10
« Pancreatic area »	Chemotrypsinogen	F: GCCCTGGCAGATCTCTCTC R: GACGGTCATGATCTGCTCCT	Sigenae BX073638.s.om.10
« Pancreatic area »	Amylase**	F: ACCGTGGTTCATTGTCTTC R: GTCGGTGTGCTGATCTTGA	The Institute for Genomic Research TC87786
Intestine	Peptide transporter PePT1*	F : CCTGTCAATCAACGCTGGT R : CACTGCCATAATGAACACG	GenBank EU853718
Intestine	Prolidase	F : GCCCATAAAGAGATCATGAAGC R : CGTTGTTCCAGTCCACAG	Genoscop GSONMT00010279001
Intestine	Maltase**	F : GCAGCAGGAATACCCTACGA R : GGCAGGGTCCAGTATGAAGA	TC3451
Intestine	Glucose transporter GLUT2***	F : GTGGAGAAGGAGGCGCAAGT R : GCCACCGACACCATGGTAAA	GenBank AF321816
Intestine	Sodium-glucose transporter SGLT1**	F : TCTGGGGCTGAACATCTACC R : GAAGGCATAACCCATGAGGA	GenBank AY210436
Intestine	Aminopeptidase-N	F : TGGAACCTCCTGGTACAGTGC R : CGTACTTGAAGTCAGATGGTGGT	Genoscope GSONMT00058506001
Intestine	Intestinal alkaline phosphatase (IAP)	F : TCGATGTGATTATGGGAGGA R : GGCTCAAACAGACCCAAAAT	Sigenae CA371918.s.om.10

Primers reported by: \*Ostaszewska et al. (2010b),\*\*Geurden et al. (2007) and \*\*\* Kamalam et al. (2013)

### *Statistical Analysis*

Statistical analyses were performed using R.2.14.0 with the objective to determine, for each GIT gene studied, if there were significant differences in terms of gene expression between the different times of sampling (H0, H2, H6, H12, H24 and H48). Gene expression data were first tested for normality and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Leven tests respectively, and then, when appropriate, submitted to a one-way ANOVA (P<0.05) to test the significance of the effects of sampling time. Post-hoc comparisons were made using



Tukey tests ( $P < 0.05$ ). When at least one of the assumptions (normality and homogeneity of variance) did not pass, the impact of the sampling time was evaluated using the Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks ( $P < 0.05$ ), and then the pairwise multiple comparison procedures (Dunn's Method) ( $P < 0.05$ ).

## Results

### *Feed Intake and GIT Filling Rate*

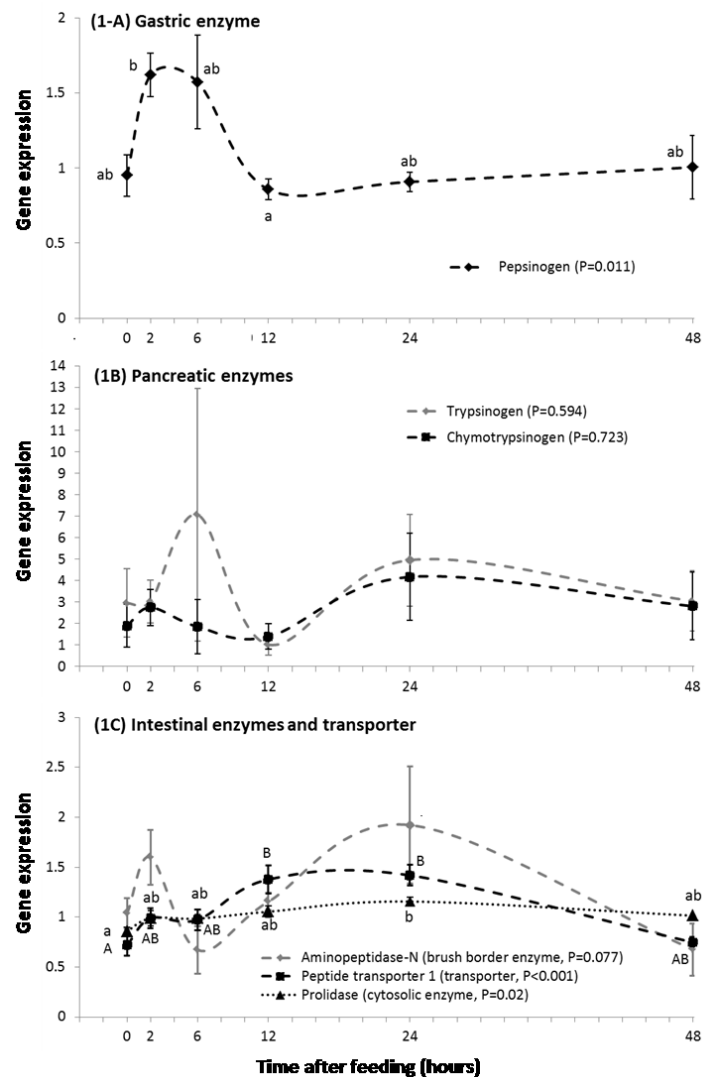
After 72 hours of starvation, the trout ate large amounts of feed (amounts not measured but observation made by the fish keeper) during the single meal delivered at H0: this was clearly a case of hyperphagia. Moreover, feed still remained in the trout's GIT (intestine and stomach) 48 hours after the meal, while we had hoped for a return to the original state (empty digestive tract) by that time.

### *Expression of Genes involved in the Digestion and Absorption of Protides*

The comparative analysis of gene expression data obtained from starved fish and then at five postprandial times (H2, H6, H12, H24 and H48), in trout fed a commercial diet, showed that the expression of some genes involved in the digestive and absorption processes was significantly affected by the nutritional status.

The expression of genes involved in the digestion and absorption of protides is shown in **figure 1**. The gene expression of pepsinogen in the stomach (**Fig 1A**) was significantly affected by the nutritional status of the trout: a peak expression appeared just 2 hours after the meal. In the pancreatic area studied (**Fig 1B**), we noted a strong variability between individuals in terms of gene expression of both trypsinogen and chymotrypsinogen, suggesting a strong heterogeneity of this tissue with respect to the distribution of exocrine pancreatic cells. Consequently, although the graphic observation of the pattern of expression, mainly for trypsinogen, suggests the presence of two peaks (one appearing a few hours after the meal and a second one approximately 24 hours after the meal), it was not statistically significant. There was no significant variation (high variation between individuals) over time in the proximal intestine (**Fig 1C**), for the gene expression of the aminopeptidase-N located in the enterocyte brush border, although, as in the case of pancreatic enzymes, a visual observation of the excretion pattern suggests a first peak of expression two hours after the meal and a second one around 24 hours later. On the other hand, there was a significant "time effect" for the peptide transporter 1 (PePT1) (located in the enterocyte brush border) and to a lower extent for the prolidase (cytosolic enzyme). Data suggest an increase of the PePT1 gene

expression over the period of 12-24 hours after the meal and a slight increase of the prolidase gene expression around 24 hours after the meal.

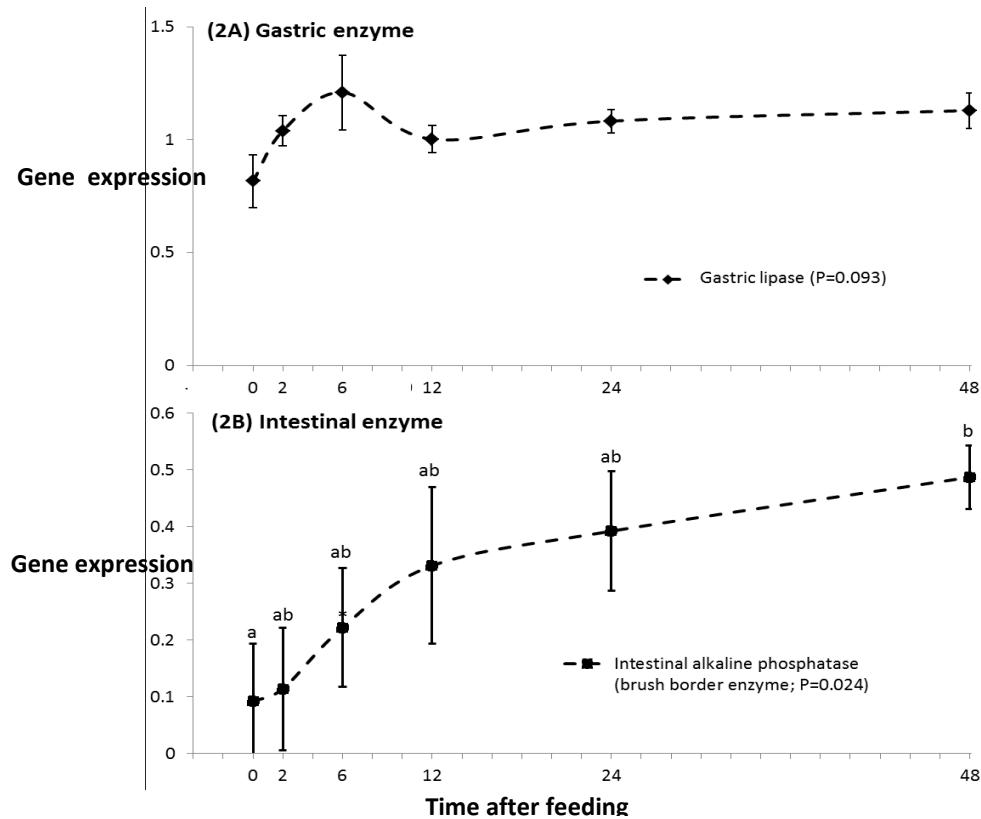


**Fig 1** Postprandial kinetics of the expression of genes involved in the digestion and absorption of protides in the stomach (1A), a pancreatic area (1B) and the proximal intestine (1C) of rainbow trout fed a commercial diet. Measurements were performed at six different postprandial times (in starved fish (0), then 2, 6, 12, 24 and 48 h after the last meal). For each gene, means (n = 6) without common superscript letters are significantly different (P<0.05). Vertical bars show the standard error of the mean (SEM).

### *Expression of Genes Involved in the Digestion and Absorption of Lipids*

**Figure 2** shows the expression of genes involved in the digestion and absorption of lipids. The graphic observation of the expression pattern in the stomach (**Fig 2A**) suggests a peak around 6 hours after the meal, but there was no statistically significant time effect for the gene

expression of gastric lipase. The intestinal alkaline phosphatase gene expression significantly increased throughout the postprandial period in the enterocyte brush border of the proximal intestine (**Fig 2B**), the highest value having been observed 48 hours after the meal.

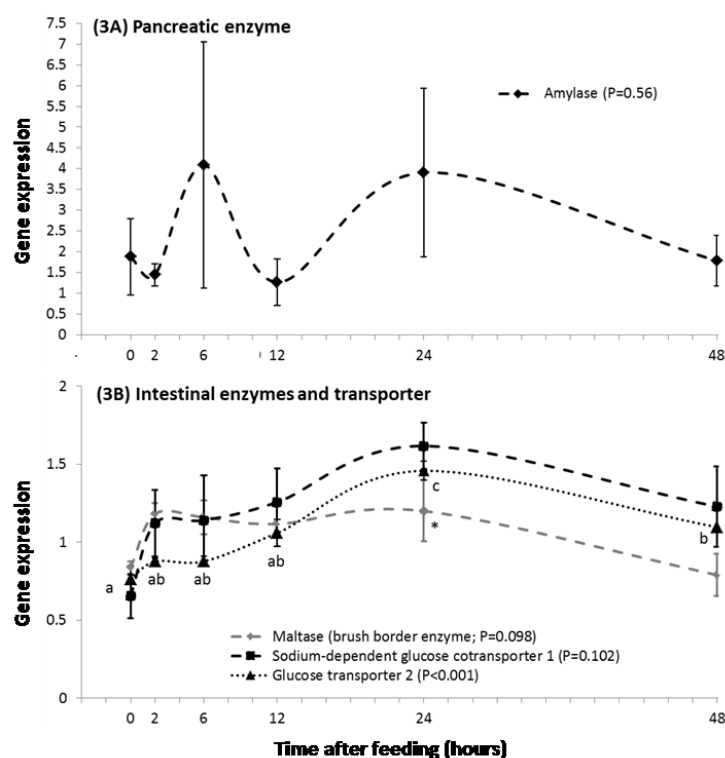


**Fig 2** Postprandial kinetics of the expression of genes involved in the digestion and absorption of lipids in the stomach (2A) and the proximal intestine (2B) of rainbow trout fed a commercial diet. Measurements were performed at six different postprandial times (in starved fish (0), then 2, 6, 12, 24 and 48 h after the last meal). For each gene, means ( $n = 6$ ) without common superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Vertical bars show the standard error of the mean (SEM).

### *Expression of Genes Involved in the Digestion and Absorption of Carbohydrates*

The evolution over time of the expression of genes involved in the digestion and absorption of carbohydrates is shown in **Figure 3**. The gene expression of amylase in the pancreatic area (**Fig 3A**) varied widely between individuals. The graphic observation of this pattern of expression suggests the presence of two peaks, the first around 6 hours after the meal and the

second at approximately 24 hours, but there was no statistically significant difference between the 6 sampling times. The graphic observation of the pattern of gene expression of maltase in the proximal intestine (**Fig 3B**) suggests an increase at 2 hours after the meal and a decrease much later, after 24 hours, but in fact there was no statistically significant difference over time. The gene expression patterns of the two glucose transporters were similar, but statistically significant differences were only observed for the glucose transporter 2 (GLUT2): the expression had already increased 2 hours after the meal but a significant peak was only observed around 24 hours later, and the level of expression was still significantly high 48 hours later.



**Fig 3** Postprandial kinetics of the expression of genes involved in the digestion and absorption of carbohydrates in the proximal intestine of rainbow trout fed a commercial diet. Measurements were performed at six different postprandial times (in starved fish (0), then 2, 6, 12, 24 and 48 h after the last meal). For each gene, means (n = 6) without common superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Vertical bars show the standard error of the mean (SEM).

## Discussion

### *Filling Rate of the GIT and Inter-Individual Variability*

In our previous work (Borey et al. 2016) using trout (325g average body weight) reared at 17 °C, feed remained in the GIT 12 hours after the meal. In the present study using smaller rainbow trout (177 g average body weight) reared at a similar temperature (18 °C), feed

remained in the intestine and the stomach of all the fish sampled after 48 hours. Knowing that the trout had a larger meal than usual—as noted by the fish keeper—after the 72-hour period of starvation, could explain the lengthy duration of the chyme transfer. This was an obvious case of hyperphagia. We have previously observed a shorter chyme transfer duration in rainbow trout (30g body weight) reared at 17 °C and normally fed (without a prior starvation period) *ad libitum*: the emptying period was less than 24 hours for the stomach and less than 48 hours for the intestine (data not published).

The high variability between individuals observed in the present study in terms of GIT gene expressions could have various origins: 1) intrinsic, i.e. caused by differences in the enzymatic capacities of the various individuals; 2) caused by differences in the amount of feed actually ingested by each fish (indeed, feed was manually distributed to each group of fish (15 fish/group) up to visual satiation, but it was not possible to visually determine the intake of each individual and to make it equal); 3) finally, in the case of pancreatic enzymes, the strong heterogeneity of gene expression could be explained by an excessive heterogeneity of the pancreatic region sampled in terms of distribution in exocrine nodules.

### ***Different Patterns of GIT Gene Expression***

The present study demonstrated that the patterns of GIT gene expression differed according to the studied genes and their localization in the GIT.

In the stomach, the gene expression of pepsinogen increased a mere 2 hours after the meal and a peak expression was observed between 2 and 6 hours after feeding, with a return to a basal level after 12 hours. Our data are in good agreement with those of Borey et al. (2016) for rainbow trout, but contrast with those obtained by Yúfera et al. (2012) in juvenile white seabream (*Diplodus sargus*) fed once a day (morning meal). Indeed, these authors observed a drop in the gastric pH and an increase in pepsin activity following the meal, while daily changes in the mRNA expression of pepsinogen and proton pump occurred later (during the nocturnal period) and were not particularly related to the moment of food supply, but rather modulated by the circadian rhythm. These results clearly evidenced how the mRNA transcripts were overexpressed during the night-time, corresponding to a transcriptional effort occurring during the resting hours and suggesting that the activation of the proton pump is the key process regulating the acidic digestion in the stomach. Yúfera et al. (2014) showed later the existence of a pepsinogen upregulation in the few hours following meal ingestion, as observed in rats (Moshier et al. 1993). Other authors such as Einarsson et al. (1996) in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Caruso et al. (2008) in European eel (*Anguilla anguilla*), and Uys et al. (1987) in African catfish (*Clarias gariepinus*) have also observed a rapid release of

pepsin or a rapid increase in pepsin activity following feed delivery, but without information about pepsinogen gene expression. In our study, the trout were submitted to 72 hours of starvation prior to the kinetic study, and prior to this period of starvation, were fed two meals per day. This different protocol could explain the different pattern of pepsinogen gene expression observed compared to that observed by Yúfera et al. (2012). There was no statistically significant variation in the pattern of gene expression of gastric lipase, in contrast to what was observed in Borey et al. (2016). However the data suggest the presence of a peak 6 hours after the meal.

The expression increase in the intestine also started rapidly (2 hours after the meal) for some GIT genes, but expression peaks were observed later, and the return to a basal level occurred much later (24 hours after the meal or even later). This was particularly the case for the intestinal prolidase, peptide transporter PePT1, alkaline phosphatase, and glucose transporter GLUT2, but only suggested for the maltase and the sodium-dependent glucose transporter SGLT1. Results of previous studies also suggested that the increase in secretion of certain intestinal digestive enzymes is prolonged after feed intake in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Einarsson et al. 1996), European eel (Caruso et al. 2008), gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Fountoulaki et al. 2005; Montoya et al. 2010), African catfish (García-Ortega, 2000), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Guerra-Santos et al. 2017) and Goldfish (*Carassius auratus*) (Vera et al. 2007).

But the timing of the return to a basal level is surprising in our study. Indeed, the basal level in GIT gene expression seemed to be reached 12 hours after the meal was in the stomach, and 48 hours after the meal was in the intestine, while these GIT compartments were still full of feed. These results indicate that the signal to stop the expression of these genes is not the emptying of the stomach or that of the intestine.

With regards to pancreatic enzymes, Santigosa et al. (2008), who tested various postprandial timings (1, 3, 6 and 36 hours), showed a peak 3 hours after the meal for the activities of amylase and of total proteases corresponding to trypsin and chymotrypsin. In our study, variations of the gene expression over time for amylase, trypsinogen, chymotrypsinogen were not statistically significant. In fact, there were strong inter-individual variabilities, especially at two sampling times: 6 hours and 24 hours after the meal. Very high values were measured in some individuals at these two times, and further studies must be performed to determine whether this could correspond to the occurrence of two peaks in pancreatic enzyme expression. The data suggest a similar pattern in the case of an intestinal gene, encoding for aminopeptidase-N, even if the first peak occurred earlier (2 hours after the

meal). If the presence of a second peak, approximately 24 hours after the meal, is confirmed, this would suggest the presence of a circadian rhythm of excretion for certain genes, particularly the pancreatic genes, and of a food anticipatory activity (FAA). Such circadian rhythms, well known in mammals, have already been shown in other fish species, mainly in relation to pancreatic amylase activity (Vera et al. 2007; Caruso et al. 2008; Montoya et al. 2010), but also for trypsin and chymotrypsin or alkaline protease activities (Montoya et al. 2010) and the peptide transporter PePT1 (Bisesi et al. 2015).

### ***Consistent Dynamics in GIT Gene Expression***

Globally, the differences in gene expression patterns observed between stomach and intestine, i.e. delayed peaks in the intestine, make sense, considering that the feed first reaches the stomach and the chyme later reaches the intestine. Caruso et al. (2008) already suggested that GIT enzyme activity in the European eel reflects the progression of digesta along the intestinal tract, and data obtained in our previous study (Borey et al., 2016) were also in good agreement with this assumption. In contrast, further studies are necessary to clearly define how the pancreatic enzymes interact in this coherent system.

### ***Special Case of the Intestinal Alkaline Phosphatase***

The intestinal alkaline phosphatase (IAP) enzyme plays a role in the regulation of long-chain fatty acid absorption in the intestine, and is also a major regulatory enzyme of gut homeostasis and health. Its expression and activity are strongly related to the nutritional status in mammals (fed, starved, malnourished, etc.). It was previously reported that dietary fat, protein, carbohydrates, vitamins, and minerals are all important dietary modulators (Lallès, 2014). In our study, the expression level of IAP increased progressively after the meal and the higher value was observed after 48 hours, the last timing sampled, while gene expressions of the other GIT actors had already returned to their basal levels. The regulation of this gene seems atypical. This is another proof of the numerous roles of this enzyme in the GIT in addition to its involvement in the digestive processes, although its expression coincided with feed ingestion.

## **Conclusion**

The control and regulation of the digestive function so that all the various processes occur in a coordinated and timely way is complex. In our study, the increase in protein gene expression (enzymes and transporters) involved in feed digestion followed consistent dynamics in rainbow trout, i.e. it reflected the progression of digesta along the GIT, even though it was not

statistically significant for all the studied genes due to high response variabilities between individuals. However, if the arrival of feed into the GIT seems to be a trigger for gene expression (and hopefully secretion) increase of some GIT enzymes and transporters, it is less clear for others with the potential presence of a circadian rhythm. In addition, it is obvious that the gastric and intestinal emptying was not the (only) trigger for inducing a drop in gene expression, as, except in the case of the intestinal alkaline phosphatase, returns to basal levels were observed while these GIT compartments were still full of feed.

The results of this study show that, from a practical point of view, it is difficult to determine a single perfect time to sample the GIT in the context of nutritional studies due to the wide variety of postprandial patterns of gene expressions. It would be best to perform several samplings after the meal, or to choose several GIT enzymes or transporters to analyze according to the timing of the sampling time when imposed.

## Acknowledgments

This research was supported by the emergence program of INRA (2013). M. Borey was supported by a grant from the CD 64 (Conseil départemental des Pyrénées-Atlantiques), INRA, and the AGREENFISH Project (ANR-GUI-AAP-06).

## References

- Azarm HM, Kenari AA, Hedayati M (2013) Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquac Res* 44:634–644. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.03068.x
- Bisesi JH, NgoT, Ponnnavolu S, Liu K, Lavelle CM, Nabiul Afrooz ARM, Saleh NB, Ferguson PL, Denslow ND, SaboAttwood T (2015) Examination of single-walled carbon nanotubes uptake and toxicity from dietary exposure: tracking movement and impacts in the gastrointestinal system. *Nanomaterials* 5:1066-1086. doi:10.3390/nano5021066
- Borey M, Panserat S, Surget A, Cluzeaud M, Plagnes-Juan E, Herman A, Lazzarotto V, Corraze G, Médale F, Lauga B, Burel C (2016) Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition. *Fish Physiology and Biochemistry* 42 (4): 1187-1202. doi: 10.1007/s10695-016-0208-4
- Bucking C, Wood CM (2012) Digestion of a single meal affects gene expression of ion and ammonia transporters and glutamine synthetase activity in the gastrointestinal tract of freshwater rainbow trout. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 182:341–350. doi: 10.1007/s00360-011-0622-y
- Caruso G, Denaro MG, Genovese L (2008) Temporal changes in digestive enzyme activities in the gastrointestinal tract of European eel (*Anguilla anguilla*) (Linneo 1758) following feeding. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41 (4):215-228



- Einarsson S, Davies PS, Talbot C (1996) The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Fish Physiology and Biochemistry* 15 (5):439-446
- Ferraris RP, Ahearn G (1984) Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 77:397-413. doi: 10.1016/0300-9629(84)90204-4
- Fountoulaki E, Alexis MN, Nengas I, Venou B (2005) Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research* 36:1243-1251. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01232.x
- García-Ortega A, Verreth J, Segner H (2000) Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. *Fish Physiol Biochem* 22:237-244.
- Geurden I, Aramendi M, Zambonino-Infante JL, Panserat S (2007) Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R2275–R2283. doi: 10.1152/ajpregu.00444.2006
- Golchinfar F, Zamani A, Hajimoradloo A, Madani R (2011) Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*) : from hatching to primary stages after yolk sac absorption. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10(3): 403-414.
- Guerra-Santos B, López-Olmeda JF, Olivettinde Mattos B, Borba Baião A, Peixoto PereiraDS, Sánchez-Vázquez FJ, Cerqueira RB, Branco Albinati RC, Fortes-Silva R (2017) Synchronization to light and mealtime of daily rhythms of locomotor activity, plasma glucose and digestive enzymes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 204: 40-47
- Kamalam BS, Medale F, Kaushik S, Polakof S, Skiba-Cassy S, Panserat S (2012) Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *J Exp Biol* 215:2567–2578. doi: 10.1242/jeb.070581
- Kamalam BS, Panserat S, Aguirre P, Geurden I, Fontagne S, Médale F (2013) Selection for high muscle fat in rainbow trout induces potentially higher chylomicron synthesis and PUFA biosynthesis in the intestine. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 164:417-427. doi: 10.1016/j.cbpa.2012. 11.020
- Lalles, J. P. (2014) Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutrition Reviews* 72(2): 82-94
- Montoya A, López-Olmeda JF, Yúfera M, Sánchez-Muros MJ, Sánchez-Vázquez FJ (2010) Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 306:315-321
- Moshier J, Cornell T, Majumdar A (1993) Expression of protease genes in the gastric mucosa during aging. *Exp Gerontol* 28 (3):249-258.
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, Nichols PD (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources, *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15103-15110
- Ostaszewska T, Dabrowski K, Kamaszewski M, Grochowski P, Verri T, Rzepkowska M, Wolnicki J (2010a) The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 157:158-169
- Ostaszewska T, Kamaszewski M, Grochowski P, Dabrowski K, Verri T, Aksakal E, Szatkowska I, Nowak Z, Dobosz S. (2010b) The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system

- hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 155:107-114. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.017
- Pahlow M, Oel PR Van, Mekonnen MM, Hoekstra AY (2015) Science of the Total Environment Increasing pressure on freshwater resources due to terrestrial feed ingredients for aquaculture production. *Sci Total Environ* 536:847–857. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.124
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Polakof S, Skiba-Cassy S, Kaushik S, Seiliez I, Soengas J-L, Panserat S (2012) Glucose and lipid metabolism in the pancreas of rainbow trout is regulated at the molecular level by nutritional status and carbohydrate intake. *J Comp Physiol B* 182:507-516, DOI 10.1007/s00360-011-0636-5.
- Ramzanzadeh F, Yeganeh S, JaniKhalili K, Sedigheh Babaei S (2016) Effects of different photoperiods on digestive enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevin and fry. *Can. J. Zool.* 94: 435-442. dx.doi.org/10.1139/cjz-2015-0180
- Santigosa E, Sanchez J, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J, Gallardo MA (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282:68–74. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.007
- Terova G, Robaina L, Izquierdo M, Cattaneo A, Molinari S, Bernardini G, Saroglia M (2013) PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *Springerplus* 2:17. doi: 10.1186/2193-1801-2-17
- Uys W, Hecht T, Walters M (1987) Changes in digestive enzyme activities of chrias guriepinus (*Pisces: Clariidae*) after feeding. *Aquaculture* 63:243-250.
- Vera LM, De Pedro N, Gómez-Milán E, Delgado MJ, Sánchez-Muros MJ, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ (2007) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology & Behavior* 90:518-524
- Yúfera M, Moyano FJ, Astola A, Pousao-Ferreira P, Martínez-Rodríguez G (2012) Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS One* 7:1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0033687
- Yúfera M, Romero MJ, Pujante IM, Astola A, Mancera JM, Sánchez-Vázquez FJ, Moyano FJ, Martínez-Rodríguez G. (2014) Effect of feeding frequency on the daily rhythms of acidic digestion in a teleost fish (gilthead seabream). *Chronobiol Int* 31:1024-1033. doi: 10.3109/07420528.2014.944265



**6 ARTICLE 3 : ACUTE HYPOXIC CHALLENGE AS AN EFFICIENT TEST TO REVEAL  
DIVERSE ADAPTATION STRATEGIES TO FISH MEAL AND OIL DIET  
SUBSTITUTION BY PLANT FEEDSTUFF IN RAINBOW TROUT ISOGENIC LINES**



## **Préambule – Etude “challenge hypoxique”**

Une des stratégies adoptée pour pérenniser l’aquaculture consiste à sélectionner des truites qui répondent bien à l’alimentation végétale quant à leur croissance, cette capacité étant en effet sous déterminisme génétique. Cependant, l’identification d’individus dont le phénotype correspond au caractère recherché ne se limite pas à des mesures de performances de croissance. Imposer un stress supplémentaire à celui de la substitution végétale peut permettre de mieux discerner les poissons sur leur sensibilité à l’alimentation végétale. De plus, en aquaculture, des individus robustes présentant de faible sécrétion de cortisol en réponse à un stress sont davantage recherchés. L’objectif de cette étude est donc d’évaluer si un challenge hypoxique aigu permet de dissocier les individus bons et mauvais répondant à l’alimentation végétale. Afin de répondre à cette question, trois lignées isogéniques de truites qui divergent sur leur tolérance à l’alimentation végétale en matière de croissance ont été soumises depuis leur premier repas à deux aliments différents : un aliment de type marin M, riche en farine de poissons et dont l’huile est totalement issue de poissons, à contrario d’un aliment végétal PB dont la farine et l’huile sont totalement d’origine végétale. Lors de leur dixième mois, ces lignées ont été successivement soumises à deux challenges hypoxiques aigus, un premier lors d’un état à jeûn de 72 heures, à l’opposé d’un second réalisé deux heures après leur dernier repas. Leur sensibilité à l’hypoxie a été évaluée au travers du temps qui leur a été nécessaire pour quitter leur état de conscience, ce qui se manifeste par une absence de nage et un retournement.

Le manuscrit présenté est une version provisoire d'un projet d'article qui sera prochainement soumis à British Journal Of Nutrition.

**Acute hypoxic challenge as an efficient test to reveal diverse adaptation strategies to fish meal and oil diet substitution by plant feedstuff in rainbow trout isogenic lines**

Borey M<sup>1,2</sup>, Burel C<sup>2</sup>, Paroissin C<sup>3</sup>, Quillet E<sup>4</sup>, Terrier F<sup>2</sup>, Maunas P<sup>2</sup>, Lauga B<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS/ Univ Pau & Pays Adour, Equipe Environnement et Microbiologie (EEM), Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux – IPREM - MIRA, UMR5254, 64000, Pau, France

<sup>2</sup>INRA, UMR 1419 NUMEA Nutrition, Métabolisme et Aquaculture, Aquapôle INRA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

<sup>3</sup> CNRS / Univ Pau & Pays Adour, Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications de Pau – MIRA, UMR5142 64000, Pau, France

<sup>4</sup>INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-en-Josas, France

**\* Corresponding author**

**Keywords:** carnivorous fish – genotype – standard metabolic rate – hazard ratio - Cox proportional hazard model – phenotypic plasticity

# Abstract

## Background

Rainbow trout—a carnivorous fish—are increasingly being fed oil and meal from plant origin for environmental purposes. This dietary substitution leads to pathological responses and to the deterioration of growth performances. Trout are also reluctant to consume a plant-based (PB) diet. Deciphering the biological mechanisms that explain these responses are crucial to both improve the formulation and process of the substitutive diet and to guide fish selection. Isogenic lines constitute a good experimental model to investigate the genetic determinism, the mechanisms and the pathways that contribute to the trout's ability to maintain sufficient growth under a complete diet substitution, and to further implement selective programs.

## Methods

We tested the responsiveness of three heterozygous isogenic lines of rainbow trout, fed a marine (M) or a PB diet, to an acute hypoxic challenge in order to investigate whether genetic determinism—linked to the ability to maintain sufficient growth under the PB diet—also affects, or not, resistance to hypoxia. Two feeding were considered for each condition: Isogenic line responsiveness, i.e. time elapsed between water arrival cut-off and the moment of loss of equilibrium, was evaluated using a Cox proportional hazard model. Statistical tests were further applied to assess the significance of divergence observed between isogenic lines.

## Results

We showed that feeding status, diet and host genotype all had a significant impact on trout tolerance to hypoxia. Whereas each of the isogenic lines behaved differently under the tested conditions, our approach allowed us to distinguish the response of individual lines. Thus, we were able to show that only one trout isogenic line exhibited higher tolerance to hypoxia in response to diet replacement. Furthermore, intra-line variability highlighted additional factors, unrelated to genotype, that contribute to the phenotypic plasticity observed in the study.

## Conclusions

The hypoxic challenge test *per se* is a promising tool to assess trout adaptive capacity in response to diet replacement. This study therefore responds to the necessity of implementing fish-selective programs with indicators steering the identification of individuals highly tolerant, i.e. presenting minimal responsiveness to fully substituted alternative diets.



## Background

Global aquaculture output has increased at an annual rate of 10% since 1984 (FAO 2014) in response to a growing demand and to ensure sufficient fish production for human consumption. In intensive fish farming, carnivorous fish that require feeds with high levels of protein and oil (NRC 2011) have traditionally been fed diets elaborated from wild fish. However, the capture from wild fisheries is currently insufficient to provide for the growing demand. Consequently, plant ingredients have increasingly been incorporated into the diet as an alternative (Naylor et al. 2009) to maintain the sustainable production of carnivorous fish. Although novel diets are formulated to meet all known requirements and are processed to reduce the portion of anti-nutritional factors from plant origin, the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*, Walbaum 1792) remains reluctant to consuming such plant-based (PB) diets. The main deleterious effects observed when replacing marine proteins or marine oil individually are: decreased feed intake (Geurden et al. 2013), lower feed efficiency (Glencross et al. 2006) and digestibility (Santigosa et al. 2011a), altered gut integrity (Glencross et al. 2006) and metabolic pathways [7–9]. In this context, selective breeding of robust fish that would present minimal responsiveness to alternate diets is one of the strategies adopted to maintain aquaculture production of carnivorous fish while preserving wild resources (Le Boucher et al. 2012).

Isogenic lines constitute a good experimental model (Ihssen et al. 1990; Komen and Thorgaard 2007; Dupont-Nivet et al. 2009) to seek the genetic determinism, mechanisms and pathways that could contribute to the trout's ability to maintain sufficient growth under a PB diet fully devoid of fishmeal and therefore implement selective programs. We took advantage of the availability of such genetic material in rainbow trout (Quillet et al. 2007) to investigate the genetic variability of isogenic lines for growth performance and feed efficiency in response to the nature of the diet: a marine diet (M) based on fish meal (FM) and fish oil (FO) versus a PB diet (Dupont-Nivet et al. 2009; Geurden et al. 2013). In addition, isogenic lines chosen for their phenotypic divergences in response to a PB diet were also characterized through their behaviour (activity, stereotypies, aggressiveness) and their response to confinement as a stress factor (emotional reactivity and plasma cortisol levels) when fed a PB diet (Sadoul et al. 2015; Sadoul et al. 2016). Consequentially, the study highlighted the strong effects of the PB diet on physiological and behavioural welfare parameters in rainbow trout but failed to distinguish a more resistant genotype capable of utilizing all the nutrient of a PB diet despite its divergence for growth and survival (Sadoul et

al. 2015; Sadoul et al. 2016). It is thus interesting to further characterize these isogenic lines and investigate if they could diverge in their response to other types of stress factors involving other physiological mechanisms. Indeed, the genotype conservation of lines by way of reproduction between breeders from well-established homozygous clonal lines enables the comparison among different trials performed on the same lines (Dupont-Nivet et al. 2009). Thus it is essential to estimate the ability of the line to face potentially life-threatening challenges (Sadoul et al. 2015), while considering the nature of the diet they consumed, a PB diet or a M diet.

Interestingly, hypoxic challenges regroup all of these considerations: hypoxia is recognized as a major concern in aquaculture because fish are reared at a high stocking density requiring costly aeration energy systems (Wang et al. 2009). The evaluation of how isogenic lines face such life-threatening challenges when fed PB diet thus deserve attention in the context of fish farming. In addition, by impairing the oxygen cascade, hypoxia leads to a large range of physiological responses in reaction to the oxygen depleted environment (Chabot and Claireaux 2008). The hypoxic challenge test has thus been utilised in the present study to reveal underlying physiologic and metabolic traits in reaction to stress. The ability to adapt to a reduced oxygen concentration environment has already been studied in several species of fish (Speers-Roesch et al. 2012; Vanderplancke et al. 2014) and trout (Van Raaij et al. 1996; Dombkowski et al. 2011; Eliason and Farrell 2014). Succinctly, it has been demonstrated that the fish's ability to survive in tanks with reduced oxygen availability depends mainly on their capacity i) to uptake  $O_2$  from the  $O_2$ -depleted environment (Richards 2011), ii) to improve the efficiency of their heart contractions (Rytter and Gesser 2007), iii) to reduce and shift their metabolism from aerobic to anaerobic (Ishibashi et al. 2007; McKenzie et al. 2008; Almeida-Val et al. 2011), iv) to redistribute their blood flow toward priority organs (Skovgaard and Olson 2012), and v) to set an acute adrenergic stress response implicating cortisol release (Reid et al. 1998; Van Heeswijk et al. 2006; Perry et al. 2009; Thomas and Gilmour 2012). The hypoxic challenge will therefore investigate a large range of physiological responses concomitantly to diet replacement.

The primary goal of this study was thus to investigate the responsiveness of various rainbow trout isogenic lines—that diverge in their capacity to grow under a PB diet—when submitted to an acute hypoxic challenge test, and to compare their tolerance based on the dietary treatment they received (starved, M or PB diet). Opposing observations have been made about fish's ability to tolerate hypoxia according to their size: Nilsson and Sara (Nilsson and

Sara 2008) and to Roze et al. (Roze et al. 2013) have reported that larger fish are more resistant to hypoxia, while Zambonino-Infante et al. (Zambonino-Infante et al. 2013) noted that they are more sensitive to hypoxia. We thus hypothesised that the trout fed the marine diet, that had displayed a greater feed intake and a faster growth rate than the trout fed the PB diet, would exhibit marked differences in their tolerance to hypoxia. Additionally, Morgan and Iwama (Morgan and Iwama 1996) have demonstrated that corticoid release enhances oxygen consumption in fish. We therefore suspected that isogenic lines already known to diverge on their corticosteroid response during confinement (Sadoul et al. 2015; Sadoul et al. 2016) would also diverge on their tolerance to hypoxia. Furthermore, based on energy trade-off theories (Zera and Harshman 2001), it was posited that the most efficient lines fed the PB diet would dedicate a strong energy allocation to maintain an appropriate growth while reducing other energy expenditures (Sadoul et al. 2016). Consequently, we surmised that those fish would demonstrate a greater resistance to hypoxia.

We tested our hypotheses by performing hypoxic challenges on rainbow trout isogenic lines fed a fully substituted diet (PB) from their first meal, as opposed to trout fed a diet composed of fishmeal and fish oil (M). We further considered two feeding statuses to assess the contribution of meal digestion and feed intake to hypoxia tolerance. We first performed the challenges on starved trout—the basal metabolism of which is referred to as the standard metabolic rate (SMR) (Wang et al. 2009)—and then on fed trout. It was important to proceed this way because the post-prandial status requires an additional adaptation due to an increase in oxygen demand (Eliason and Farrell 2014) and in energy expenditure to ensure digestion, absorption and utilization of the food nutrients (Cho et al. 1982). This concomitant increase in metabolic rate following meal ingestion is referred to as the specific dynamic action (SDA) (Eliason et al. 2007) which subsequently leads to an increased blood flow toward the gastro-intestinal organs (Seth et al. 2010). This study was performed on the two isogenic lines previously investigated by Sadoul et al. (Sadoul et al. 2015; Sadoul et al. 2016) and Geurden et al. (Kamalam et al. 2013)—A22h and R23h respectively—and on a third divergent isogenic line, AB1h, that has not been the object of research until now.

## Methods

### Ethics statement

The experiment was conducted in strict compliance with the guiding principles for the use and care of laboratory animals and in compliance with French and European regulations on animal welfare (Decree No. 2001–464 of 29 May 2001 and Directive 2010/63/EU, respectively).

### Biological material

Three experimental families of rainbow trout previously characterized for their divergent ability to cope with plant-based diets (A22h, AB1h and R23h) were used for this experiment. These were obtained by crossing parents from the homozygous isogenic trout lines established at INRA (Quillet et al. 2007). To summarise, lines were obtained after two generations of gynogenesis and further maintained by within-line pair mating. To produce the experimental families, eggs from a single maternal homozygous line were collected and separated into three batches, each fertilized by one male from three other lines. Therefore, fish were expected to share the same heterozygous genotype (isogenic) within each family. The use of a single maternal line aimed at minimizing between-family sources of variation due to maternal effects associated with egg size and hatching time, so that the differences between families were due only to the paternal genetic origin. All individuals within one line were therefore expected to share the same genotype.

From hatching (Day 0) to Day 15, the trout fry were reared in an open circuit at the INRA Experimental Fish Farm of the Monts d'Arrée (PEIMA) (artificial photoperiod, water temperature of 11 °C). On Day 16, they were transferred to the Lées-Athas fish farm (Pyrénées-Atlantiques, France; natural photoperiod, constant water temperature of 8 °C). On Day 83, the trout were transferred to the Donzacq INRA fish farm (Landes, France; natural photoperiod) and distributed into 6 tanks supplied with spring water (constant temperature of 17 °C, oxygen at 9 ppm). The wide disparity in fish numbers (from 165 to 607 per tank) at the onset of the study (Day 84 post-hatching) was due to highly inconsistent rates of fertilization and hatching among the different lines. A series of tank changes and density adjustments were performed during the rearing phase to accommodate for fish growth and also because several fish samples were needed for purposes other than those for this hypoxic challenge. Only 34 fish remained in each tank prior to the hypoxic challenge.

### **Experimental design, feeding and experimental diets**

We used a bifactorial experimental design (3 isogenic lines x 2 diets), with one tank per experimental treatment. Each isogenic line was divided into two groups (one group per tank), and each group was fed either a diet rich in fishmeal and fish oil from their first meal (Day 28)—hereinafter referred to as the marine (M) diet—or a diet devoid of animal ingredients, hereinafter referred to as the plant-based (PB) diet. The diets were formulated to be as isonitrogenous and isoenergetic as possible (Table 1) and were prepared at the Donzacq INRA facility (France) by extrusion (Cletral, twin screw extruder), then dried, vacuum coated with oil and stored at 4 °C.

The fish were manually fed twice a day up to visual satiety starting on Day 84 at the Donzacq farm. Growth performance (fish weight) was monitored throughout the study (approximately 30 fish/tank were weighed as a sample or as the entire population by the end of the study), but feed intake was only monitored from Day 272 to Day 317 prior to the hypoxic challenge.

**Table 1:** Formulation and proximal composition of the marine (M) diet (fishmeal and fish oil-based) and plant-based (PB) diet (all fishmeal and fish oil replaced by plant protein and plant oil sources).

<i>Ingredients (g/100g diet)</i>	Diet	
	PB	M
Norwegian herring meal (CP 70; Sopropêche, France)	-	58.4
Corn gluten meal (CP 60; Inzo, France)	16.0	-
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)	17.7	-
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)	10.1	-
Soy protein concentrate (Estrilvo; CP 70; Sopropêche, France))	15.2	-
White lupine meal (Terrena, France)	6.8	-
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France)	4.3	-
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	3.4	25.3
Soy lecithin (Louis François, France)	2.1	-
L-Lysine (Eurolysine)	1.5	-
L-Methionine (Evonik, Germany)	0.3	-
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18% P; 22 % Ca)	3.2	-
Attractant Mix <sup>a</sup>	1.4	-
Mineral premix <sup>b</sup>	1.2	1.1
Vitamin premix <sup>c</sup>	1.2	1.1
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	-	14.1
Plant oil blend (rapeseed, linseed, palm) (Daudruy, France)	15.6	-
<i>Analysed Proximal Composition</i>		
Crude protein (% DM)	50.1	47.2
Crude fat (% DM)	18.3	18.5
Crude energy (kJ/g DM)	23.7	23.1

DM: dry matter

<sup>a</sup> Attractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g

<sup>b</sup> Mineral premix (g or mg kg<sup>-1</sup> diet): calcium carbonate (40% Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60% Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75 % I), 0.4 mg; zinc sulphate (36% Zn), 0.4 g; copper sulphate (25% Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33% Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20% Ca, 18%P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30 % Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA)

<sup>c</sup> Vitamin premix (IU or mg kg<sup>-1</sup> diet): DL-a tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamine, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium antothenate, 50 mg; choline chloride, 2000 mg (UPAE, INRA).

### **Hypoxic challenge tests**

One week before the first hypoxic challenge test (Day 317), individuals (50 g  $\pm$ 10 g) from the three isogenic lines were marked behind their left eye with coloured elastomers, using a different colour for each line. The trout from the six tanks were then pooled into two separate tanks (1 m<sup>3</sup>) based on their diet (M tank and PB tank). Thus, one tank dedicated to the M diet contained 90 marked trout from the three isogenic lines (A22h n=30, AB1h n=30, and R23h n=30), and an equivalent tank was dedicated to the PB diet. The first two hypoxic challenge tests were then conducted. The first challenge test (Day 325) was performed one week after marking the fish and followed a 72-hour starvation period, while the second test was performed two weeks later (Day 333) on the same fish (fed normally), 2 hours after their last meal. The protocol of this hypoxic challenge test was adapted from Zambonino-Infante et al. (Zambonino-Infante et al. 2013). Water arrival was cut off at H0 and water oxygen concentration was monitored every minute. The fish were considered to have faded and lost their equilibrium once they had started to turn over. Once a fish had lost its equilibrium, it was removed from the tank, identified by its colour marking, and quickly placed in another tank normally supplied with oxygenated water where it returned to swimming normally within a few seconds. The individual fade time is defined by the time elapsed between water arrival cut-off (H0) and the moment when loss of equilibrium is recorded.

### **Statistical analyses**

To test the significance of fish growth variations between the different groups of fish, we subjected the data (weight of the individuals, n=30-34) to a one-way variance analysis (ANOVA). If means were significantly different at a probability level of 5%, data were compared to the Student-Newman-Keuls test if they passed the Normality test and the Equal variance test; otherwise, the Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on ranks was used when they did not pass the tests. To differentiate line and diet effects and their interaction on fish growth, a two-way variance analysis was performed.

The data collected during the hypoxic challenges were analysed with methods adapted from survival analysis studies, the time elapsed up to the event of interest being the fade time (Zambonino-Infante et al. 2013). During the hypoxic challenge test, fade time was recorded ("arrested") every time a trout lost equilibrium, while the trout still resisting at the end of the challenges were assigned as "censored" individuals, which mean that due to non-occurrence of outcome event before the trial end, no fading time was available, but their participation to the challenge was still taken into account for the data analysis.

Diet, lines, and feeding status (starved or fed) were coded through 4 binary variables: Diet, A22h, AB1h, and Status, with the following classification:

- Diet=1 for trout fed the M diet, 0 otherwise;
- A22h=1 for trout from the A22h line, 0 otherwise;
- AB1h=1 for trout from the AB1h line, 0 otherwise;
- Status=1 for fed trout, 0 otherwise.

Let us represent that if  $A22h=0$  and  $AB1h=0$  for a given trout, its line is R23h (it is not necessary to consider R23h as a binary variable since, in such a case,  $A22h + AB1h + R23h = 1$  which would therefore generate a singularity in the regression analysis). In this statistical analysis, we considered the time elapsed between the start of the hypoxic challenge and fading as the event of interest and we aimed to determine which variables had an influence on this elapsed time. For each of the twelve subpopulations derived from the three initial variables (i.e., diet, lines and feeding status), survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method (Klein and Moeschberger 2005). Based on these empirical survival curves, covariate effects were studied by considering Cox proportional models. Models were stratified with the variables that did not satisfy the proportional hazard (PH) assumption. As both the status and A22h variables did not satisfy this PH assumption, the models were stratified on status, A22h, and AB1h variables to maintain homogeneity between the lines in the model. In contrast, there was no violation in the proportional hazard assumptions for the diet variable, which means that associations between diet and hazard ratio remained proportional throughout the challenge. Therefore, the Cox regression models using diet as a covariate and six stratifications (all possible combinations of the three lines subjected to two different statuses) were used to estimate the fade hazard ratio of trout fed the PB diet, in comparison to the trout fed the M diet. The first model tested was without any interaction between the covariate and the stratified variables. Potential interactions between these variables for their effect on fading were then studied in an interaction model (see Supplementary Materials for the mathematical formulation of the stratified Cox model). Given the outcome of a likelihood ratio test, the interaction model appears to be a more appropriate model. Consequently, this model was selected and the different parameters estimated. Based on the normality of log hazard ratio estimators, a Student-like test was performed to compare these estimators (hazard ratio difference).



For each isogenic line and feeding status considered, the hazard ratio ( $h_{ratio}$ ) was defined as the rate of equilibrium loss occurrence in the trout subpopulation fed the M diet to the corresponding rate in the trout subpopulation fed the PB diet. The  $h_{ratio}$  provided insight into the relative decrease or increase of fade risk, and represented instantaneous risk over the studied period. A  $h_{ratio}$  significantly exceeding 1 signifies that individuals fed the M diet are significantly less resistant to hypoxia than individuals fed the PB diet.

## Results

### Fish performance based on diet

Upon their arrival at Donzacq (Day 84), the six groups of trout were already showing significant differences in terms of mean body weight (Table 2). The fish presenting the lowest body weight were part of the A22h-PB group, while those with the highest body weight were part of the R23h-M group. There was a line effect (p-value <0.001; A22h <R23h <AB1h), a diet effect (p-value <0.001; PB <M), and an interaction between these two factors (p-value <0.001). The fish fed the M diet had the same body weight and thus the same growth; the fish fed the PB diet, however, showed slower growth, particularly those in the A22h line. At the end of the rearing phase and prior to the hypoxic challenge (Day 326), we observed a slightly different pattern (Table 2): the diet effect remained the same (p-value <0.001; PB <M), but the line effect had changed (p-value <0.001; AB1h <R23h ≤ A22h). Whereas all three groups fed the M diet had similar body weights on D326, the fish fed the PB diet all presented a lower body weight, with the lowest weight observed in the AB1h line. While it was not possible to run a statistical analysis on the daily growth index over such a large period, it appears that the growth rate of the A22h and R23h fish fed the PB diet closely matched that of those fed the M diet from a numerical standpoint. By Day 326, although the fish fed the PB diet had not reached the body weight of those fed the M diet, the differential had been reduced.

Feed intake and feed efficiency were only measured from Day 272 to Day 317 prior to the hypoxic challenge. Although it was not possible to assess a statistical significance, we noticed that the A22h line had a lower feed intake and feed efficiency when fed the PB diet compared to the M diet during that period. Conversely, fish in the AB1h and R23h lines fed the PB diet consumed a higher amount of feed over this period than those fed the M diet, but the feed efficiency remained lower with the PB diet.

**Table 2:** Data on growth, feed intake and feed efficiency of the three isogenic lines fed the two experimental diets since their first meal

Isogenic Line Diet	A22h		AB1h		R23h		p-value
	M	PB	M	PB	M	PB	
<i>Period day 84 to 326<sup>1</sup></i>							
Body weight (g) (Day 84)	0.47 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>b</sup>	<0.001
Body weight (g) (Day 326)	68.4 ± 0.9 <sup>c</sup>	54.9 ± 1.4 <sup>b</sup>	69.8 ± 1.2 <sup>c</sup>	44.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	69.1 ± 1.5 <sup>c</sup>	53.2 ± 1.2 <sup>b</sup>	<0.001
Daily Growth Index (DGI, % BW d <sup>-1</sup> )	1.37	1.38	1.38	1.19	1.37	1.33	-
<i>Period day 272 to 317<sup>2</sup></i>							
Voluntary feed intake (VFI, % BW d <sup>-1</sup> )	1.76	1.64	1.70	2.04	1.80	1.86	-
Feed efficiency (FE)	1.34	1.23	1.43	1.25	1.37	1.22	-

<sup>1</sup> Entire rearing period at the Donzacq fish farm (n=30-34 for body weight data and n=1 for DGI)

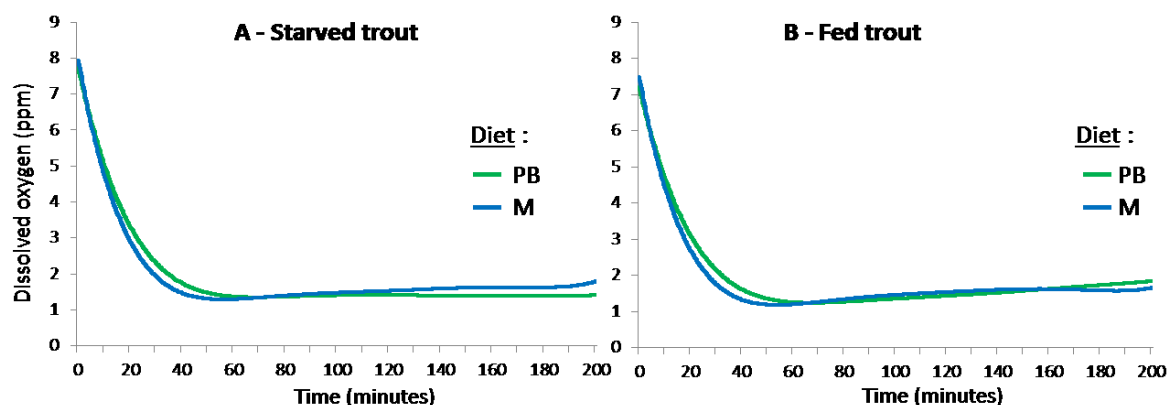
<sup>2</sup> Period during which feed intake was recorded (n=1 for VFI and FE).

DGI = 100 x (final body weight<sup>0.333</sup> – initial body weight<sup>0.333</sup>)/duration.

VFI = 100 x dry feed intake (g)/((initial body weight + final body weight)/2) x duration.

FE = wet weight gain (g)/dry feed intake (g)

### Decrease in water oxygen concentration during the hypoxic challenge



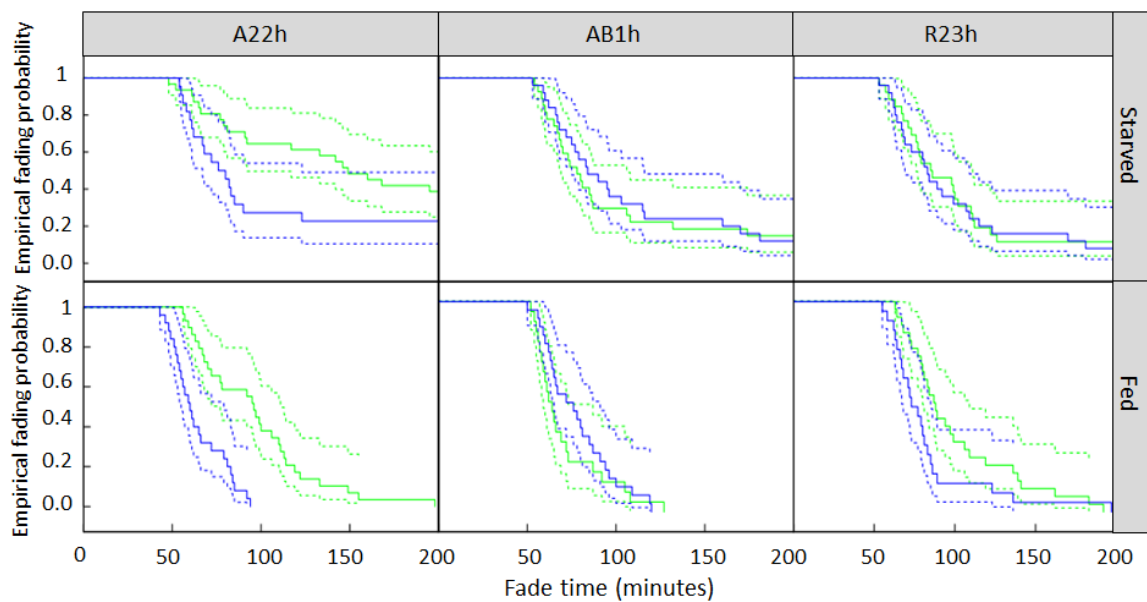
**Figure 1:** Dissolved oxygen concentration over time after water arrival cut-off to the trout tanks during the first hypoxic challenge performed on starved trout (A) and during the second challenge performed on fed trout (B). One tank contained the trout reared on the PB diet while the other one contained the trout reared on the M diet.

Regardless of the hypoxic challenge (whether performed on starved or fed trout) or the trout's nutritional history (reared on a PB or M diet), the patterns of dissolved oxygen concentration over time remain similar (**Figure 1**). The initial concentration of approximately 7.3-7.9 ppm decreased rapidly after water arrival cut-off, and reached a plateau 45–50 minutes later at approximately 1.2-1.5 ppm.

### Intra-isogenic line plasticity

In this experiment, 305 trout were subjected to an oxygen shortage. Of these, 277 faded, while 28 were still awake at the end of the challenge test.

On average, 86 minutes separated the moment between the first trout faded and the most resistant trout faded, revealing that fish response to a given condition is highly heterogeneous (**Figure 2**). For instance, 50% of the starved fish in the A22h line faded within the first 90 minutes, whereas 30% faded within the last 110 minutes of the experiment, and 20% did not fade at all over the duration of the experiment.



**Figure 2:** Empirical survival (fade) probability of trout throughout the two hypoxic challenges (upper graphs, challenges with starved trout, lower graphs, challenges with fed trout). Blue lines represent rainbow trout isogenic lines reared on the M diet, while green lines represent rainbow trout isogenic lines reared on the PB diet.

### Genotype response to hypoxia

A closer examination of the fade time median ( $FT_m$ ) reveals that fish response to hypoxia was significantly similar among all isogenic lines for starved fish on the M diet, whereas we noted differences for the fed fish just prior the challenge, on the M diet (**Table 3**): In that case, the A22h isogenic line was less tolerant to hypoxia than the R23h and AB1h lines (Median comparison test, A22h-AB1h and A22h-R23h  $FT_m$  differences, p-value  $<2.10^{-4}$  and  $<9.10^{-4}$ , respectively). Overall, the PB diet amplified the differences between A22h and the other two isogenic lines but the A22h trout on this diet were more tolerant to hypoxia regardless of the

feeding status (higher  $FT_m$ ) (Median comparison test, A22h-AB1h and A22h-R23h  $FT_m$  differences, p-value at least  $<2.10^{-4}$ ). Under the PB diet, the AB1h and R23h lines—whether fed or starved—also behaved differently, with the R23h line being more tolerant to hypoxia than AB1h (Median comparison test, AB1h-R23h  $FT_m$  differences, p-value  $<7.10^{-4}$ ).

**Table 3:** Fade Time empirical median ( $FT_m$  in minutes) at which 50% of the rainbow trout isogenic lines fade (data calculated from the empirical survival function), confidence interval at 95% between brackets.

Diet	Status	Isogenic lines			Median comparison test - p-value		
		A22h	AB1h	R23h	A22h-AB1h	A22h-R23h	AB1h-R23h
M	starved	78 [67–123]	84 [75–116]	83 [69–109]	ns	ns	ns
PB	starved	149 [92-na]	78 [69–106]	86 [76–111]	$<10^{-8***}$	$<10^{-8***}$	$<3.10^{-4***}$
M	fed	60 [55–79]	76 [65–91]	75 [68–85]	$<2.10^{-4***}$	$<9.10^{-4***}$	ns
PB	fed	96 [77–111]	64 [59–87]	88 [81–109]	$<10^{-8***}$	$<2.10^{-4***}$	$<7.10^{-4***}$

\*\*\* highly significant p-value.

### Influence of the dietary regime, status and genotype in response to hypoxia

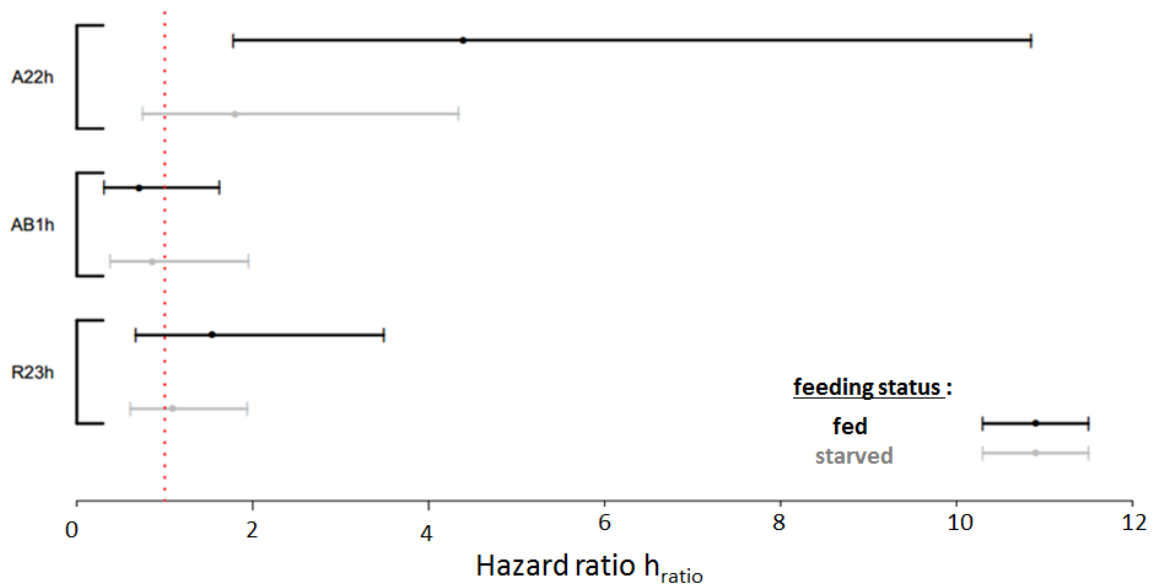
The trout's ability to resist hypoxia was impacted by dietary regime, nutritional status and genotype (**Table 4, Figure 3**). When the A22h trout were fed, the PB diet was significantly and positively associated with a higher tolerance to hypoxia with a  $h_{ratio}$  of 4.39 (Chi squared test from stratified Cox model with interaction, p-value=0.00133). The A22h individuals reared on the PB diet also showed a better tolerance when starved, but given the high variability, the difference between the two diets was not significant ( $h_{ratio}>1$ , Chi squared test from stratified cox model with interaction, p-value=0.19). Although not significant, this tendency was also observed in R23h individuals at the fed status ( $h_{ratio}>1$ ), whereas in contrast, the AB1h fish were slightly more tolerant to hypoxia regardless of the feeding status (starved or fed) when reared on the M diet ( $h_{ratio}<1$ ).

**Table 4:** Fade hazard ratios ( $h_{ratio}$ ) of rainbow trout isogenic lines reared on the M diet compared to rainbow trout isogenic lines reared on the PB diet. N is the number of trout in each subpopulation, and 'Fade' the number of trout that had faded by the end of the trial.

Line	Status	N	Fade	Hazard ratio	95% Confidence interval		p-value
A22h	fed	54	54	4.39	1.78	10.85	0.00133**
A22h	starved	53	36	1.80	0.75	4.34	0.19
AB1h	fed	46	46	0.71	0.31	1.62	0.41
AB1h	starved	52	46	0.86	0.38	1.95	0.71
R23h	fed	49	49	1.54	0.67	3.49	0.30
R23h	starved	51	46	1.09	0.61	1.94	0.77

\*\*\* highly significant p-value.

The effect of dietary regime on trout tolerance to hypoxia varied significantly between isogenic lines based only on their fed status (**Table 5**). The largest difference was observed between the A22h and AB1h lines (p-value <0.001), with the dietary regime showing a higher impact on the ability to resist hypoxia for A22h individuals than for AB1h individuals. Similarly, the impact was significantly higher in A22h versus R23h individuals (p-value=0.02), and in the AB1h versus R23h lines (p-value=0.03). Consequently, the effect of diet on trout ability to resist hypoxia was less pronounced overall for R23h line individuals.



**Figure 3:** Fade hazard ratios ( $h_{ratio}$ ) of rainbow trout isogenic lines reared on the M diet compared to rainbow trout isogenic lines reared on the PB diet. Dots represent the mean  $h_{ratio}$ , and the horizontal segments represent the  $h_{ratio}$  95% confidence interval. Ratios are provided for the three trout isogenic lines A22h, AB1h, and R23h and the two feeding statuses (starved versus fed). The red line corresponds to a hazard ratio of 1 indicating that there is no behaviour difference between individuals reared on the M diet and individuals reared on the PB diet.

**Table 5:** Estimator differences of hazard ratios

	Estimator Differences	p-value
A22h fed - A22h starved	1.82	0.035 *
AB1h fed - AB1h starved	-0.45	0.165
R23h fed - R23h starved	0.52	0.7
A22h starved - AB1h starved	1.65	0.049 *
A22h starved - R23h starved	0.73	0.23
AB1h starved - R23h starved	-0.36	0.18
A22h fed - AB1h fed	3.92	0.00004***
A22h fed - R23h fed	2.27	0.01*
AB1h fed - R23h fed	-1.83	0.015*

Stars indicate significant p-value < 0.05 (\*) and <0.001 (\*\*\*).

## Discussion

Having experienced an exponential growth since 1950, farmed rainbow trout production was estimated in 2013 to be the highest among worldwide salmonid production after that of the Atlantic salmon (Adeli and Baghaei 2013). In the context of sustainable farming, replacement of fishery-derived fish meal and fish oil by terrestrial plant resources is an important concern in carnivorous fish production including rainbow trout. At the moment, however, full substitution is ineffective because PB diets affect the performance of high trophic level species (Panserat et al. 2009). Thanks to rainbow trout isogenic lines, consistently characterized for disparate survival and growth performances when fed a totally plant-based diet, it is possible to further investigate the possible mechanisms of adaptation to substitution of fish meal and fish oil that will help to select for fish combining growth and robustness traits in breeding programs (Dupont-Nivet et al. 2009). Bearing in mind that a full dietary substitution constitutes a stress imposed on carnivorous fish, the ability to study line response while subjecting them simultaneously to a second type of stress allows to differentiate lines based on their robustness, and to steer selective programs toward genotype identification that would present minimal responsiveness, i.e. no difference or limited differences, to the alternative diet. In the present study, we observed that replacing fish meal and fish oil with plant feedstuff significantly impacted fish tolerance to acute hypoxia of some genotypes only, i.e. the A22h line which was more resistant to hypoxia 2 hours after the last meal (fed state). Furthermore, if we consider only the trout reared on the PB diet, the A22h line displayed an increased tolerance to hypoxia. The R23h and AB1h isogenic lines exhibited similar responses to hypoxia whatever the diet while being nevertheless more robust, showing adaptive capacity and flexibility to dietary substitution by plant feedstuff. Finally, despite the trial being performed on isogenic individuals, we observed phenotypic plasticity.

### **Tolerance to hypoxia revealed a genotype-dependent ability in response to PB diet**

While body weight is known to impact fish tolerance to hypoxia, two opposing trends have been reported: according to Nilsson and Sara (Nilsson and Sara 2008) and to Roze et al. (Roze et al. 2013), larger fish demonstrate a better ability to tolerate hypoxia, while Zambonino-Infante et al. (Zambonino-Infante et al. 2013) point out the opposite reaction for fast-growing fish. Trout fed the M diet most often displayed a higher weight than those fed the PB diet. Consistent with the growth performance observations made by Geurden et al.

(Geurden et al. 2013) and Sadoul et al. (Sadoul et al. 2016), we showed in this study that trout in the A22h, AB1h and R23h isogenic lines reared on an M diet were significantly heavier and thus faster-growing than those reared on a PB diet. Interestingly, the fish reared on the M diet did not exhibit an increased resistance to acute hypoxia in the present study but were instead either more vulnerable or indifferent when compared to their counterparts reared on the PB diet. Indeed, a significant impact of the dietary substitution on the ability to resist acute hypoxic conditions emerged in A22h line individuals in the fed status, with heavier individuals (i.e. fed the M diet) losing consciousness more rapidly, while leaner individuals fed the PB diet faded later than those from any other line. In contrast, and despite marked differences in body weight between individuals fed the M and the PB diet, the AB1h and R23h trout lines behaved similarly in hypoxia conditions, regardless of the diet. Thus, although we observed a decreased tolerance to hypoxia in the faster-growing fish (A22h), as predicted by the Zambonino-Infante et al. (Zambonino-Infante et al. 2013) assumption, this relationship only holds true for the A22h isogenic line reared on an M diet. As suggested by these authors, lower resistance to hypoxia in large fish may result from a higher standard metabolic rate and therefore higher oxygen requirements for heavier fish, whereas in contrast, leaner fish fed a PB diet may have a reduced standard metabolic rate. Because this relation was only observed in one line, the hypothesis of weight as a sole variable cannot explain the variations observed in trout response to hypoxia. Additionally, estimator  $h_{ratio}$  differences revealed that all isogenic lines at the fed state were differently affected by the oxygen shortage, with the following sensitivity gradient: A22h > R23h > AB1h. The AB1h line indicating broad body weight differences between trout fed the M and PB diets was ultimately less impacted by the dietary substitution under hypoxic conditions than the A22h and R23h isogenic lines for which differences in body weight were lesser. This difference in sensitivity to dietary substitution between isogenic lines reinforces the theory that weight only had a reduced influence on fish response to acute hypoxia. Additional physiological factors that should be controlled by host genotype must thus be considered. Feed intake volume and metabolic rate could both explain the observed divergence. Indeed, even though it was not possible to check for statistical significance, the A22h isogenic line showing higher tolerance to hypoxia with dietary substitution also reduced its feed intake under the PB diet. Furthermore, we suspect that individuals from the A22h line fed the PB diet weakened their standard metabolic rate and their energy expenditure in favour of growth. Consequently, lower oxygen requirements could increase tolerance to hypoxia during the challenge, as suggested by Zambonino-Infante et al. (Zambonino-Infante et al.



2013). This is consistent with the results of Sadoul et al. (Sadoul et al. 2016) which show that A22h isogenic line individuals fed a PB diet in a stressful environment such as confinement, significantly reduce their swimming activity in comparison with their genetic counterpart fed an M diet. Interestingly, similarly to our study, no significant impact of the diet was recorded for R23h individuals. Here, we also show that the AB1h isogenic line—not tested in the Sadoul et al. (Sadoul et al. 2016) study—had a similar response to that of the R23h line. Hence R23h and AB1h fish are more robust and have a larger adaptive capacity and flexibility to dietary substitution by plant feedstuff as revealed by the hypoxic challenge test.

The present trial therefore reinforces the importance of genetic background on sensitivity to environmental stress as previously highlighted by Sadoul et al. (Sadoul et al. 2016). Isogenic lines effectively diverged in terms of their tolerance to hypoxia under the PB diet, with A22h individuals displaying a significantly higher median fade time ( $FT_m$ ) than those in the AB1h and R23h lines. This implies that the A22h line demonstrates a higher resistance to hypoxia under the PB diet. Conversely, the opposite response was obtained for individuals fed the M diet, with line A22h displaying a significantly lower median fade time ( $FT_m$ ) than the AB1h and R23h lines, which implies a diminished resistance to hypoxia in the A22h line under the M diet in post-prandial conditions. In accordance with energy trade-off theories (Zera and Harshman 2001), fish in the A22h line fed a PB diet must have reduced their standard metabolic rates and their oxygen requirements by reducing their energy expenditure (Sadoul et al. 2016). This was not observed for AB1h and R23h lines. Thus, the life-threatening challenge we performed by means of hypoxia suggests that the range of phenotypic divergences between lines may result from a difference in standard metabolic rate under the PB diet. Interestingly, the highlighted divergence between lines contributed to explaining the divergent results reported in literature (Nilsson and Sara 2008; Roze et al. 2013; Zambonino-Infante et al. 2013).

### **Response to hypoxia induced phenotypic plasticity within isogenic lines**

The present trial was performed on isogenic lines. Nevertheless, heterogeneous lag times were observed before loss of consciousness within each line. This individual variability within a trout isogenic line was also reported in behavioural studies performed under different types of stress (Millot et al. 2014; Sadoul et al. 2015) and in a survey on growth performances conducted on a larger set of isogenic lines (Dupont-Nivet et al. 2009). Because all individuals in a given isogenic line are expected to share an identical genotype, the different components of the phenotypic variance may be deconvoluted: genotypic variance

being null, only the environmental variance subsists. Consequently, the observed phenotypic variability provides a direct measure of the genotype's environmental tolerance to the environment (Dupont-Nivet et al. 2009). Although the fish were reared in a common environment, sources of variation may still subsist and was already noticed for other traits (weight, resistance to pathogen, ovule size, laying date,..) (Quillet et al. 2007). We agree with Millot et al. (Millot et al. 2014) and with Sadoul et al. (Sadoul et al. 2015) who suggested that phenotypic plasticity could be the result of individual life history and residual environmental heterogeneity (e.g. pre-challenge social environment, food intake, social status). Although the biological explanation of phenotypic plasticity is still not resolved we could also suggest, as it has already been proposed, that the epigenetic profile of an individual might contribute to alleviating individual responses (Sadoul et al. 2016). Besides, we also hypothesize that gut microbiota that contribute to the digestion process may interfere with host physiology to shape how the fish ultimately responds to the hypoxic challenge.

### **Physiological inferences and significance**

The response to acute hypoxia requires several physiological and behavioural mechanisms that aim at securing additional O<sub>2</sub> from the environment and/or limiting the metabolic consequences of too little O<sub>2</sub> at the mitochondrial level (Richards 2009). Either of these mechanisms could explain the contrasting sensitivity of rainbow trout isogenic lines in the fed state to M diet replacement with the PB diet, as well as the interline variabilities, and the increased tolerance of A22h to diet replacement. More interestingly, several other mechanisms deserve further attention to better characterize the traits involved in the acceptance of diet replacement. For example, it would be interesting to measure leptin and lactate hormone levels at the time of the hypoxic challenge test in fish subjected to either the M or PB diet. Leptin is a pleiotropic hormone that regulates appetite, metabolic processes, and energy reallocation during an environmental challenge. An increased expression of this hormone has been shown to lessen the stress axis by lowering cortisol release during life-threatening challenges. Lower lactate plasmatic levels, a terminal product of anaerobic energetic metabolism, were also associated with a better tolerance to hypoxia in common sole (Zambonino-Infante et al. 2013). It has further been shown that lactate production increases with enhanced muscular activity (Sugita et al. 2001). Lastly, given that white muscle produces more lactate than red muscle (Omlin and Weber 2010), the differential density of white and red muscular cells could also be investigated.

The importance of the feeding status on hypoxia tolerance could also be investigated concurrently with cardiac activity, as it has been shown that food intake leads to a significant reduction of the compensatory bradycardia during hypoxia in Dungeness crab *Cancer magister* (McGaw 2005). Moreover, differential plasmatic metabolite levels could be implicated in the higher tolerance to hypoxia manifested by the A22h line fed the PB diet. Due to wheat gluten incorporation, the M diet contained higher starch levels than the PB diet. Given that a diet containing higher starch levels and vegetable oil generally leads to higher plasmatic glucose and lipid levels in rainbow trout (Borey et al. 2016), and given that higher glycemia and lipid levels have been significantly associated with a reduced tolerance to hypoxia in common sole (Zambonino-Infante et al. 2013), the plasmatic glucose and lipid levels should be monitored during the hypoxic trial on the isogenic line. Plasmatic metabolite levels are highly linked to energetic metabolism and sensing, both of which have already been reported for their importance in hypoxia tolerance (Zambonino-Infante et al. 2013; Mazurais et al. 2014). Thus, the transcription of genes involved in energy metabolism (PCK1, G6PC) and in hypoxia or energy sensing (hypoxia-inducible factor, AMPK) (Mazurais et al. 2014) at the hepatic level would potentially constitute good indicators to estimate the ability of rainbow trout to adapt their metabolic activity to oxygen depletion and face diet replacement.

Trout-selective programs need a wide range of indicators to categorize fish on their aptitude to maintain sufficient growth under PB diets. This aptitude is the result of the combination of several biological mechanisms including feed intake, metabolism, muscular growth, and digestion. In the present study, the results highly suggest that trout divergence with respect to sensitivity to vegetable feeding under hypoxia is due to standard metabolic rate differences, but the precise mechanisms involved were not investigated. Conducting further research on the respective contributions of the aforementioned factors to trout tolerance to hypoxia while fed a PB diet could allow to implement selective programs with relevant biological indicators worthy of consideration.

## **Conclusion**

This study is consistent with previous behavioural studies performed on the three isogenic lines highlighting different responses when subjected to environmental stress (Geurden et al. 2013; Sadoul et al. 2015; Sadoul et al. 2016). The A22h isogenic line, known for its

increased aggressive behaviour and its reduced swimming activity under a similar dietary substitution was also the line that displayed a higher sensitivity to dietary substitutions during hypoxia (Sadoul et al. 2015). The fact that trout sensitivity to hypoxia and divergence between isogenic lines only appeared at the fed state when considering the effect of diet replacement, highlighted the implication of the digestive process as an explanation for line phenotypic divergence. Interestingly, the physiological response to hypoxia allowed us to distinguish robust and sensitive isogenic lines to diet replacement. Our results are in agreement with the fact that sensitivity to hypoxia is correlated with a deterioration of the digestive efficiency and consequently with an enhancement of ecological waste (Lefèvre et al. 2007). Thereby this study responds to the necessity of implementing fish-selective programs with indicators that steer toward the identification of individuals highly tolerant to fully substituted alternative diets. In fact, since a partial and/or late substitution is supposed to mask the genotype-diet interaction, the use of a fully substituted diet with protein and oil from vegetable origin from their first feeding makes it possible to investigate the phenotypic response of carnivorous fish in a context of dietary stress (Dupont-Nivet et al. 2009).

## **Declarations**

### **Availability of data and materials**

The datasets supporting the results of this article are included within the article and its additional files.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This research was supported by the ANR AGREENFISH Project (ANR-GUI-AAP-06). M. Borey was supported by a grant from the CD 64 (Conseil départemental des Pyrénées-Atlantiques), INRA, and the AGREENFISH Project (ANR-GUI-AAP-06).

### **Authors' contributions**

BM and BC conceived and performed the experiment. BM, PC and LB contributed to the mathematical design and BM, PC and BC performed the analysis. BM and BC drafted the manuscript and LB revised and improved the manuscript. TF and MP reared trout and

participated in the hypoxic challenge experiment. QE created and provided the heterozygous isogenic lines. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We thank the team of the INRA PEIMA facilities for the isogenic lines production, N. Turonnet from the INRA experimental facilities of Lées-Athas (Pyrenées-Atlantiques, France) for its contribution in rearing of trout alevins and F. Sandres and A. Lanuque for manufacturing the experimental diets, for their contribution in rearing the juvenile trout (INRA, Donzacq, France), and for helping in the hypoxic challenge organisation. We also thank J. Zambonino-Infante for helpful discussions that lead to the performance this study.

### References

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome; 2014.
2. NRC. National Research Council. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, DC; 2011.
3. Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:15103–10.
4. Geurden I, Borchert P, Balasubramanian MN, Schrama JW, Dupont-Nivet M, Quillet E, et al. The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future and utilisation in rainbow trout. *PLoS One.* 2013;8:e83162.
5. Glencross B, Evans D, Rutherford N, Hawkins W, McCafferty P, Dods K, et al. The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture.* 2006; 253:512–22.
6. Santigosa E, Garc I, Maria J, Navarro I, Pe J. Plant oils' inclusion in high fish meal- substituted diets: effect on digestion and nutrient absorption in gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*). *Aquac. Res.* 2011;42:962–74.
7. Gómez-Requeni P, Mingarro M, Calduch-Giner JA, Médale F, Martin SAM, Houlihan DF, et al. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.* 2004;232:493–510.
8. Panserat S, Kolditz C, Richard N, Plagnes-Juan E, Piumi F, Esquerre D, et al. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oilfree diets. *Br. J. Nutr.* 2008;100:953–67.

9. Torstensen BE, Espe M, Stubhaug I, Lie Ø. Dietary plant proteins and vegetable oil blends increase adiposity and plasma lipids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Br. J. Nutr. [Internet]. 2011;106:633–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535902> [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0007114511000729](http://journals.cambridge.org/abstract_S0007114511000729)
10. Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, Kerneis T, Goardon L, Labbé L, et al. Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. PLoS One. 2012;7:3–9.
11. Ihssen PE, McKay LR, Mcmillan I, Phillips RB. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes : cytogenetic and fisheries applications. Trans. Am. Fish. Soc. 1990;119:698–717.
12. Dupont-Nivet M, Médale F, Leonard J, Le Guillou S, Tiquet F, Quillet E, et al. Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. Aquaculture [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;295:15–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.031>
13. Komen H, Thorgaard GH. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. Aquaculture. 2007;269:150–73.
14. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. Fish Shellfish Immunol. 2007;22:510–9.
15. Sadoul B, Leguen I, Colson V, Friggens NC, Prunet P. A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress. Physiol. Behav. [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;140:139–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.006>
16. Sadoul B, Foucard A, Valotaire C, Labbé L, Goardon L, Lecalvez JM, et al. Adaptive capacities from survival to stress responses of two isogenic lines of rainbow trout fed a plant-based diet. Nat. Publ. Gr. [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35957>
17. Wang T, Lefevre S, Thanh Huong DT, Cong N van, Bayley M. Chapter 8 The effects of hypoxia on growth and digestion. Fish Physiol. 2009;27:361–96.
18. Chabot D, Claireaux G. Environmental hypoxia as a metabolic constraint on fish: the case of Atlantic cod, *Gadus morhua*. Mar. Pollut. Bull. 2008;57:287–94.
19. Speers-Roesch B, Brauner CJ, Farrell AP, Hickey a. JR, Renshaw GMC, Wang YS, et al. Hypoxia tolerance in elasmobranchs. II. Cardiovascular function and tissue metabolic Responses during progressive and relative hypoxia exposures. J. Exp. Biol. 2012; 215:103–14.
20. Vanderplancke G, Claireaux G, Quazuguel P, Madec L, Ferraresso S, Sévère A, et al. Hypoxic episode during the larval period has long-term effects on European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). Mar. Biol. 2014;367–76.

21. Van Raaij MT, Pit DS, Balm PH, Steffens a B, van den Thillart GE. Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Horm. Behav.* 1996;30:85–92.
22. Dombkowski RA, Naylor MG, Shoemaker E, Smith M, DeLeon ER, Stoy GF, et al. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and hypoxia inhibit salmonid gastrointestinal motility: evidence for H<sub>2</sub>S as an oxygen sensor. *J. Exp. Biol.* 2011;214:4030–40.
23. Eliason EJ, Farrell AP. Effect of hypoxia on specific dynamic action and postprandial cardiovascular physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;171:44–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534150>
24. Richards JG. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 2011;214:191–9.
25. Rytter D, Gesser H. The effect of adrenaline and high Ca<sup>2+</sup> on the mechanical performance and oxygen consumption of the isolated perfused trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 2007;147:1083–9.
26. Ishibashi Y, Kotaki T, Yamada Y, Ohta H. Ontogenic changes in tolerance to hypoxia and energy metabolism of larval and juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 2007;352:42–9.
27. McKenzie DJ, Lund I, Pedersen PB. Essential fatty acids influence metabolic rate and tolerance of hypoxia in Dover sole (*Solea solea*) larvae and juveniles. *Mar. Biol.* 2008;154:1041–51.
28. Almeida-Val VMF, Oliveira AR, da Silva MDNP, Ferreira-Nozawa MS, Araújo RM, Val AL, et al. Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A\* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. *Genet. Mol. Biol.* 2011;34:315–22.
29. Skovgaard N, Olson KR. Hydrogen sulfide mediates hypoxic vasoconstriction through a production of mitochondrial ROS in trout gills. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012;303:R487–94.
30. Reid SG, Bernier NJ, Perry SF. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 1998;120:1–27.
31. Van Heeswijk JCF, Vianen GJ, Van Den Thillart GEEJM. The adrenergic control of hepatic glucose and FFA metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Increased sensitivity to adrenergic stimulation with fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006;145:51–61.
32. Perry SF, McNeill B, Elia E, Nagpal A, Vulesevic B. Hydrogen sulfide stimulates catecholamine secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;296:R133–40.
33. Thomas JB, Gilmour KM. Low social status impairs hypoxia tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2012; 182:651–62.
34. Nilsson E, Sara O. Does size matter for hypoxia tolerance in fish ? *Biol. Rev.* 2008; 83:173–89.

35. Roze T, Christen F, Amerand A, Claireaux G. Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish. *J. Therm. Biol.* 2013;38:98–106.
36. Zambonino-Infante JL, Claireaux G, Ernande B, Jolivet A, Quazuguel P, Sévère A, et al. Hypoxia tolerance of common sole juveniles depends on dietary regime and temperature at the larval stage: evidence for environmental conditioning. *Proc. Biol. Sci.* [Internet]. 2013;280:20123022. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3619455&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
37. Morgan JD, Iwama GK. Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiol. Biochem.* 1996;15:385–94.
38. Zera AJ, Harshman LG. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2001;32:95–126.
39. Cho CY, Slinger SJ, Bayley HS. Bioenergetics of salmonid fishes - Energy-intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochemistry Mol. Biol.* 1982;73:25–41.
40. Eliason EJ, Higgs DA, Farrell AP. Effect of isoenergetic diets with different protein and lipid content on the growth performance and heat increment of rainbow trout. *Aquaculture* [Internet]. 2007;272:723–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.006>
41. Seth H, Gräns A, Axelsson M. Cholecystokinin as a regulator of cardiac function and postprandial gastrointestinal blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010;298:R1240–8.
42. Kamalam BS, Panserat S, Aguirre P, Geurden I, Fontagné-Dicharry S, Médale F. Selection for high muscle fat in rainbow trout induces potentially higher chylomicron synthesis and PUFA biosynthesis in the intestine. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;164:417–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.020>
43. Klein P, Moeschberger M. Survival analysis: techniques for censored and truncated data. *Statistics for biology and health.* Springer S. Media SS& B, editor. New York; 2005.
44. Adeli A, Baghaei F. Production and supply of rainbow trout in Iran and the world. *World J. Fish Mar. Sci.* 2013;5:335–41.
45. Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-cassy S. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;294:123–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.013>
46. Millot S, Péan S, Labbé L, Kerneis T, Quillet E, Dupont-Nivet M, et al. Assessment of genetic variability of fish personality traits using rainbow trout isogenic lines. *Behav. Genet.* 2014;44:383–93.
47. Richards JG. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. 2009.



48. Sugita T, Shimeno S, Nakano N, Hosokawa H, Masumoto T. Response of enzyme activities and metabolic intermediate concentrations to a long burst of exercise and following resting in muscle and the hepatopancreas of carp. *Fish. Sci.* 2001;67:904–11.
49. Omlin T, Weber J. Hypoxia stimulates lactate disposal in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 2010;213:3802–9.
50. McGaw IJ. Does feeding limit cardiovascular modulation in the Dungeness crab *Cancer magister* during hypoxia? *J. Exp. Biol.* 2005;208:83–91.
51. Borey M, Panserat S, Surget A, Cluzeaud M, Herman A, Plagnes-Juan E, Lazzarotto V, Corraze G, Médale F, Lauga B, Burel C. Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition. *Fish Physiol.* 2016;42:1187–202.
52. Mazurais D, Ferrarresso S, Gatta PP, Desbruyères E, Severe A, Corporeau C, et al. Identification of hypoxia-regulated genes in the liver of common sole (*Solea solea*) fed different dietary lipid contents. *Mar. Biotechnol.* (NY). [Internet]. 2014;16:277–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24091821>
53. Lefèvre F, Aubin J, Louis W, Labbé L, Bugeon J. Moderate hypoxia or hyperoxia affect fillet yield and the proportion of red muscle in rainbow trout. *Cybiuim.* 2007;31:237–43.

# Supplementary Materials to "Acute hypoxia challenge reveals genetic divergence in rainbow trout isogenic lines adaptation to fish meal and oil replacement with plant feedstuff"

M. Borey *et al.*

## 1 Stratified Cox model

To simplify, we will consider the following notations:

$$Z = \begin{cases} 1 & \text{if marine diet} \\ 0 & \text{if plant-based (PB) diet} \end{cases}$$

$$X_1 = \begin{cases} 1 & \text{if A22h line} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

$$X_2 = \begin{cases} 1 & \text{if AB1h line} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

$$X_3 = \begin{cases} 1 & \text{if fed} \\ 0 & \text{if starved} \end{cases}$$

As explained in the paper, from checking the PH assumption,  $Z$  will serve as a covariate while  $X_1$ ,  $X_2$  and  $X_3$  will be used to define strata. We will denote by  $G$  the set of all possible strata. From the constraint on  $X_1$  and  $X_2$  (see the paper),  $G$  contains 6 different strata which are the following:

$$G = \{(1, 0, 0), (1, 0, 1), (0, 1, 0), (0, 1, 1), (0, 0, 0), (0, 0, 1)\}.$$

For any  $(x_1, x_2, x_3) \in G$ , we consider a Cox model with interaction defined through its hazard function as follows:

$$\forall t \geq 0, \quad h_g(t|z) = h_{g,0}(t) \exp(\beta_0 z + \beta_1 z x_1 + \beta_2 z x_2 + \beta_3 z x_3 + \beta_4 z x_1 x_3 + \beta_5 z x_2 x_3)$$

where  $h_{g,0}$  is the (unknown) baseline hazard function for the strata  $g$  (independent of the covariate) and where  $\underline{\beta} = (\beta_0, \dots, \beta_5)$  are unknown parameters. Let us recall that, within a strata, hazard functions are proportionnal, i.e. the ratio  $h_g(t|1)/h_g(t|0)$  is independent of time  $t$  (but the constant depends on the strata). We will denote  $\hat{\underline{\beta}}$  the estimation of  $\underline{\beta}$ .

## 2 Statistical test for hazard ratio

Within a strata, hazard ratio corresponds to one single coefficient. Here, we aim at proposing a test to determine whether two coefficients are statistically identical or not. Based on the asymptotic normality of  $\hat{\underline{\beta}}$ , we can derive a Student test like in the case of a linear model. Indeed we have:

$$\sqrt{n} \left( \hat{\underline{\beta}} - \underline{\beta} \right) \xrightarrow[n \rightarrow \infty]{d} \mathcal{N}(0, \Sigma)$$

where  $\Sigma$  is the inverse of the Fisher information matrix (and that could be estimated by plug-in). Consider that one wishes to test  $H_0: \beta_i = \beta_j$  (for any  $i \neq j$ ) against  $H_1 = \bar{H}_0$ . We have :

$$\sqrt{n} \left( (\hat{\beta}_i - \hat{\beta}_j) - (\beta_i - \beta_j) \right) \xrightarrow[n \rightarrow \infty]{d} \mathcal{N}(0, \sigma_{ii} + \sigma_{jj} - 2\sigma_{ij})$$

where  $\sigma_{ii}$  and  $\sigma_{jj}$  are the asymptotic variance of  $\hat{\beta}_i$  and  $\hat{\beta}_j$  and where  $\sigma_{ij}$  is the asymptotic covariance between  $\hat{\beta}_i$  and  $\hat{\beta}_j$ . It follows that one can consider the following test:

$$T_{i,j} = \frac{\hat{\beta}_i - \hat{\beta}_j}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}_{ii} + \hat{\sigma}_{jj} - 2\hat{\sigma}_{ij}}{n}}}.$$

### 3 Statistical test for median comparisons

We aim here at comparing statistically the median of the fading times between two groups or strata. For the  $i$ -th strata with  $n_i$  individuals, we denote by  $\hat{S}_i$  its Kaplan-Meier estimator (of the survival/fading function) and  $\hat{m}_i$  the estimated median based on  $\hat{S}_i$ :

$$\hat{m}_i = \inf\{t \geq 0; \hat{S}_i(t) \geq 1/2\}.$$

From the asymptotically normality of the Kaplan-Meier estimator, we deduce that

$$\sqrt{n_i}(\hat{m}_i - m_i) \xrightarrow[n_i \rightarrow \infty]{d} \mathcal{N}(0, \sigma_i^2)$$

where  $n_i$  is the number of observations,  $m_i$  is the (unknown) median and  $\sigma_i^2$  the asymptotic variance. Hence, roughly speaking,  $\hat{m}_i \sim \mathcal{N}(m_i, \sigma_i^2/n_i)$ , so that, for any  $i \neq j$ ,

$$\hat{m}_i - \hat{m}_j \sim \mathcal{N}\left(m_i - m_j, \frac{\sigma_i^2}{n_i} + \frac{\sigma_j^2}{n_j}\right)$$

and thus we get

$$\frac{(\hat{m}_i - \hat{m}_j) - (m_i - m_j)}{\sqrt{\frac{\sigma_i^2}{n_i} + \frac{\sigma_j^2}{n_j}}} \sim \mathcal{N}(0, 1).$$

We can now propose a statistic to test the medians equality, i.e. for the following null assumption  $H_0 : m_i = m_j$ . Under  $H_0$ ,

$$D_{i,j} = \frac{\hat{m}_i - \hat{m}_j}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}_i^2}{n_i} + \frac{\hat{\sigma}_j^2}{n_j}}} \sim \mathcal{N}(0, 1)$$

where  $\hat{\sigma}_i^2$  and  $\hat{\sigma}_j^2$  are estimated asymptotic variances (see Equations (2.12) and (2.13) in [1, p. 34]).

### References

- [1] Tableman, M. and Kim, J.S. (2004). *Survival analysis with S. Analysis of time-to-event data*. Chapman & Hall / CRC.





**7 ARTICLE 4: DISENTANGLING THE EFFECT OF FULL PLANT-BASED DIET  
AND HOST GENOTYPE ON THE DIVERSITY OF MUCOSA MICROBIOTA USING  
ISOGENIC LINES IN THE CARNIVOROUS RAINBOW TROUT**



## Préambule – Etude “Microbiote”

Une des stratégies adoptée pour pérenniser l’aquaculture consiste à sélectionner des truites qui répondent bien à l’alimentation végétale quant à leur croissance, cette capacité étant en effet sous déterminisme génétique. Cependant, les mécanismes biologiques impliqués dans cette tolérance sont multiples : acceptation et ingestion de l’aliment, modification du métabolisme face à des variations des teneurs plasmatiques en glucose et en certains acides aminés, sensibilité et réponse métabolique des cellules à l’insuline, régulation de la protéolyse, de la croissance musculaire, ainsi que des capacités digestives. La contribution du microbiote intestinal à la physiologie de l’hôte est connue chez les mammifères et certains poissons comme la truite. Certaines communautés microbiennes sont suspectées d’apporter un avantage à leur hôte, au niveau métabolique, immunitaire, ou de l’homéostasie intestinale, tandis que l’absence ou la présence d’autres communautés est suspectée d’impacter négativement la physiologie de leur hôte. Afin de répondre à cette question, trois lignées isogéniques de truites qui divergent sur leur tolérance à l’alimentation végétale en matière de croissance, ont été soumises depuis leur premier repas à deux aliments différents : un aliment de type marin M, riche en farine de poissons et dont l’huile est totalement issue de poissons, à contrario d’un aliment végétal PB dont la farine et l’huile sont totalement d’origine végétale. L’objectif étant de caractériser les communautés microbiennes associées à la muqueuse de l’intestin distal en fonction de l’aliment reçu et du génotype de l’hôte, afin de regarder comment le génotype et le régime alimentaire orientent leur profil. La caractérisation du microbiote a été faite en matière de diversité  $\alpha$  et  $\beta$ , de core communautés partagés entre les poissons des différentes conditions, d’OTU spécifiques à certains régimes alimentaires et à certaines lignées, et de prévisions fonctionnelles associées aux différentes communautés observées.

Le manuscrit présenté est une version provisoire d'un projet d'article susceptible d'être modifié avant sa soumission dans une revue scientifique spécialisée.



# **Disentangling the effect of full plant-based diet and host genotype on the diversity of mucosa microbiota using isogenic lines in the carnivorous rainbow trout**

Borey M<sup>1,2</sup>, Rigal F<sup>1</sup>, Burel C<sup>2</sup>, Carbon A<sup>1</sup>, Pennarun S<sup>1</sup>, Quillet E<sup>3</sup>, Terrier F<sup>2</sup>,  
Lauga B<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS/ Univ Pau & Pays Adour, Equipe Environnement et Microbiologie (EEM), Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux – IPREM - MIRA, UMR5254, 64000, Pau, France

<sup>2</sup>INRA, UMR 1419 NUMEA Nutrition, Métabolisme et Aquaculture, Aquapôle INRA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

<sup>3</sup>INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-en-Josas, France

**\* Corresponding author**

**Keywords:** *Onchorynchus mykiss*, plant-based diet, bacterial community, allochthonous bacteria, replacement, richness, functional prediction.

## INTRODUCTION

Intestinal microbiota contributes to host physiology and homeostasis through different pathways that have been widely documented in mammals and to a lesser extent in fish. In humans, intestinal microbiota is involved in glycosaminoglycan biodegradation, and in short-chain fatty acids (SCFA), lipopolysaccharides, bile acids, vitamins, and essential amino acids metabolism (Lloyd-Price et al. 2016; Vernocchi et al. 2016). Possible mechanisms explaining the dynamic relationship between the gut microbiota and the immune system came out with the study on germ-free mice. Hence Vaikunthanathan et al. (2016), showed that microbe-associated molecular patterns (MAMPs) including polysaccharide A (PSA) lead to the activation of membranous toll like receptors (TLR), and intracellular Nod like receptors (NLR) that subsequently play an essential role in both microbial and intestinal homeostasis. Moreover, some specific bacteria as single filamentous bacteria (SFB) or clusters IV, XIVa, and XVIII from the Clostridia class activate regulatory T cells. Furthermore, through its metabolic activity which limits the nutritional resources, and its presence which restrains the available binding sites, the commensal gut microbiota induced an environmental competition against potential pathogens and invaders (Vaikunthanathan et al. 2016). Similar microbiota's contribution to the metabolism and immunity acquisition have been reported in rainbow trout fish fed a yeast supplemented diet. Probiotic supplementation was there associated with increase immunoglobulin M and lysozyme activity in the serum, blood leukocyte respiratory burst activity, and trypsin and lipase activity in the intestinal lumen (Adel et al. 2016). Deciphering the biotic and abiotic factors that shape rainbow trout gut microbiota is necessary because this carnivorous fish is of nutritive importance and represented up to 14% of the European aquaculture production in 2011 (Justino et al. 2016). However, fish farms have been confronted to an increasing shortage in fish meal and oil due to the global restriction set on industrial fishing to protect the environmental resources. To ensure the sustainability of farmed fish production, meal and oil from vegetable origin are now incorporated in trout's diet at increasing substitution rate (Naylor et al. 2009). It has been highlighted that rainbow trout could be fed with oil totally from vegetable origin, but still with fish meal, without impairing their growth performances (Turchini et al. 2010), nonetheless fish meal replacement with meal from vegetable origin up to 90 % could be proposed without detrimental effect on growth (Lazzarotto 2016). However, full

substituted diet are still poorly accepted by trout and other carnivorous fish. Main consequences are, a growth reduction, lesser feed intake, and poor nutrients digestibility due to an impaired digestion or absorption, or a development of intestinal inflammation (Glencross et al. 2006). The role of the intestinal microbiota in the aforementioned deleterious traits is highly suspected since plant feedstuff incorporation into the diet lead to changes of the gut bacterial community (Heikkinen et al. 2006; Merrifield et al. 2009), and, additionally, growth performances of rainbow trout fed with plant based diet can sometimes be improved by using pro- or pre-biotic supplementation (Dimitroglou et al. 2014; Ozorio et al. 2016).

However, the mechanisms involved in fish response are still poorly understood. It is thus crucial to decipher the role of environmental variables in shaping carnivorous fish gut microbiota, and to investigate the microbial contribution to the host physiology.

It is yet widely known that diet and host genotype fashion the gut microbiota of many terrestrial species and fish, even though, in trout, it was showed that a large core microbiota remained stable when fish were fed a grain-based diet supplemented with fish oil (Wong et al. 2013). For instance partial soybean meal inclusion into trout diet lead to a reduced relative abundance of *Proteobacteria*, and to an increase of *Firmicutes* (Desai et al. 2012). At the species level, it reduced *Weissella confusia* and *Sphingomonas* in Salmon (Reveco et al. 2014). Importantly however, most of the studies conducted so far reported either the impact of fish meal or oil replacement, whereas total substitution with plant feedstuff is still scarcely investigated in rainbow trout. Moreover, reported results on the contribution of host fish genotype are most often inferred from study on siblings or individuals harbouring close genotype as evaluated on their microsatellite profile (Navarrete et al. 2012). Investigating the effect of a total and double substitution on individuals with high genotype resemblance is thus necessary to pursue these studies. Finally, the choice of the intestinal segments harbouring the microbiota is of critical importance since, in carnivorous fish, anterior and posterior intestinal segments are implicated in different biological pathways. In European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), posterior segments display genes which are significantly more active in immune defence mechanism, and in sensing of short-chain fatty acid, which are the end products of dietary fiber fermentation by anaerobic bacteria (Calduch-giner et al. 2016). The bacterial community activating these pathways are located in the loopy colon mucus layer at the surface of the gut epithelial microvilli and are considered as autochthonous bacteria,

whereas the allochthonous bacteria are present in the intestinal luminal content (Kim et al. 2007). To assess potential metabolic and immunological contributions of a bacterial community to the host, it is thus appropriate to select the distal intestine associated mucosa (Galley et al. 2014). Furthermore, as some host-microbiota symbiosis hypothesis can be inferred both from the relative abundance of some specific bacterial species and from the associated functionality of the global community, it is thus relevant to describe the trout intestinal bacterial microbiota both at the taxonomic and the functional level (Turnbaugh et al. 2009; Lloyd-Price et al. 2016). Microbial functionality can be hypothesised through cultivation technique (Vasquez et al. 2005). However, even though it offers results from empirical observation, this approach supports the disadvantage that when microorganisms are removed from the gut, and cultured under different environmental conditions, their community composition shifts (Clements et al. 2014). A first way to avoid this bias is to perform Phylogenetic Investigation of communities by reconstruction of unobserved states through PICRUSt bioinformatics software. Provided that the studied community is composed with species phylogenetically similar to the bacterial species present in the PICRUSt databases reference, it enables to predict metagenome functional content from 16S rRNA marker gene survey (Langille et al. 2013). Thus, trout intestinal taxonomic community characterisation through 16S rRNA sequencing enables to complete the ecological description of the microbiota with hypothetical functionality.

The objectives of the present study was thus to: 1) determine the impact of a total substitution of fish meal and oil with meal and oil from vegetable origin on the bacterial microbiota associated to the rainbow trout's mucosa in the distal intestine; 2) assess if the bacterial microbiota was driven by the host genotype; 3) examine if both diet and host genotype interact to shape the mucosa's microbiota and finally 4) look for both host genotype, diet, and species' specific taxons, if any, and 5) explore their metabolic potential in relation to the niche they occupied. The use of rainbow trout cohort from three different isogenic lines enabled to precisely examine each of these five objectives.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fish selection**

The experiment was carried out in accordance with the Guidelines of the National Legislation on Animal Care of the French Ministry of Research (Decree N°2001-464, May 29, 2001) and the Ethics Committee of INRA (INRA 2002-36, April 14, 2002). Three experimental families of rainbow trout previously characterized for divergent ability to cope with plant-based diets (A22h, AB1h and R23h) were used in this experiment. They were obtained in the PEIMA experimental fish farm (Sizun, Finistère, France) by crossing parents from the homozygous isogenic trout lines established at INRA (Quillet et al. 2007). Briefly, lines were obtained after two generations of gynogenesis and further maintained by within line pair-mating. To produce the experimental families, eggs from a single maternal homozygous line were collected and distributed into three batches receiving spring water treated with bronopol still mouth opening. Each batch was fertilized by one male from three other lines. Therefore, within each family, fish are expected to share the same heterozygous genotype (isogenic). The use of a single maternal line aimed at minimizing between family sources of variation due to maternal effects associated with egg size and hatching time, so that differences between families are of paternal genetic origin only.

### **Experimental design**

Each line was subjected to two different diets since their first feeding: a plant-based (PB) diet in opposition to a marine (MA) diet, which lead to separate rearing into 6 different conditions: “A22h MA”, “A22h PB”, “AB1h MA”, “AB1h PB”, “R23h MA”, and “R23h PB”. Eggs were randomly distributed into 12 different 9.72 dm<sup>3</sup> Heath Cupboard (constant water temperature: 11.4°C, oxygen saturation) from fertilization until hatching (PEIMA experimental fish farm, Sizun, France). At 16 days post hatching (dph), rainbow trout larva were transferred to Lées-Athas facilities into 3 different basins per condition (basin capacity: 90 dm<sup>3</sup>, constant water temperature: 8°C, oxygen saturation) until 130 dph. They received their first feeding at 25 dph (Lées-Athas experimental fish farm, France). Lines were then transferred to Donzacq fish farm (constant water temperature: 17°C, oxygenation rate: 7.2 ppm) and randomly distributed into 60 m<sup>3</sup> tanks (3 replicates per condition, 35-40 fish per basin) (Donzacq experimental fish farm, Donzacq, France).

Each line was handfed from the first feeding by two different diets to apparent satiation: a MA diet rich in fish meal (FM) and with lipids of fish oil (FO) origin, in opposition to the PB diet prepared from a blend of soy, lupine, peas and wheat, and with lipids from a blend of palm, rape and flax oils. PB diet was only elaborated with animal ingredients (See **Table 1**). All diets were manufactured at the Donzacq INRA facility (France) using a twin-screw extruder (Clextral). The diets meet the nutritional requirements of rainbow trout (NRC 2011). In order to avoid exceeding antinutritional factors content, and to ensure adapted profiles of amino acids to rainbow trout requirements as defined by the NRC, a blend of different plant species were used to formulate the PB diet. Synthetic L-lysine, L-methionine,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and soy lecithin were added to the PB diet to correct any deficiency in essential amino acids, phosphorous and phospholipids. The three experimental diets were formulated to be as isonitrogenous and isoenergetic as possible, however, although the measured energy content was similar, the protein content levels measured were lower with the MA diet, while the lipid content levels were slightly lower with the PB diet.

**Table 1.** Formulation and nutritional value of the MA diet (fishmeal and fish oil-based) and PB diet (all fishmeal and fish oil replaced by plant proteins and plant oil sources).

<i>Ingredients (g/100g diet)</i>	Diet	
	PB	MA
Norwegian herring meal (CP 70; Sopropêche, France)	-	58.4
Corn gluten meal (CP 60; Inzo, France)	16.0	-
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)	17.7	-
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)	10.1	-
Soy protein concentrate (Estrilvo; CP 70; Sopropêche, France))	15.2	-
White lupine meal (Terrena, France)	6.8	-
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France)	4.3	-
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	3.4	25.3
Soy lecithin (Louis François, France)	2.1	-
L-Lysine (Eurolysine)	1.5	-
L-Methionine (Evonik, Germany)	0.3	-
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18% P; 22 % Ca)	3.2	-
Attractant Mix <sup>a</sup>	1.4	-
Mineral premix <sup>b</sup>	1.2	1.1
Vitamin premix <sup>c</sup>	1.2	1.1
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	-	14.1
Plant oil blend (rapeseed, linseed, palm) (Daudruy, France)	15.6	-
<i>Analysed Proximal Composition</i>		
Crude protein (% DM)	50.1	47.2
Crude fat (% DM)	18.3	18.5
Crude energy (kJ/g DM)	23.7	23.1

DM: dry matter

<sup>a</sup> Attractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g

<sup>b</sup> Mineral premix (g or mg kg<sup>-1</sup> diet): calcium carbonate (40 % Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60 % Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75 % I), 0.4 mg; zinc sulphate (36 % Zn), 0.4 g; copper sulphate (25 % Cu), 0.3 g; manganese sulphate(33 % Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20 % Ca, 18 %P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30 % Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA)

<sup>c</sup> Vitamin premix (IU or mg kg<sup>-1</sup> diet): DL- $\alpha$  tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamine, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium antothenate, 50 mg; choline chloride, 2000 mg (UPAE,INRA).

### Sampling and sequence acquisition

Ten months after their first feeding and 8 hours after their last meal, 12 fish (average weight 75-105 g) per condition were randomly sampled and then killed by anaesthetic overdose (benzocaine at 0.06 %). The distal intestine was lengthily opened, the remaining food was gently removed, the mucosa was then rapidly flushed with physiological salt solution (NaCl 0.9 %), and was scrubbed with a swab (Sterile Dry Swab, 155C, COPAN). Swabs were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until DNA extraction. Total DNA from 9 samples per condition was extracted from the swab with Zymogene DNA extraction kit (ZR fecal DNA miniprep™) according to manufacturer instructions. High-throughput sequencing was conducted on the sequencing facility of the PREMICE platform (Pau, France) using Illumina Miseq Sequencing system. A 464 bp fragment targeting the hypervariable V3-V4 region from bacterial 16S rRNA gene was amplified with the following primers : 460-F-III-16S (adapter-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-343-ACGGRAGGCAGCAG-357), and 460-R-III-16S (adapter - GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-781-TACCAGGGTATCTAATCCT-806), in accordance with primer adapter previously reported by Lluch (2015). The first PCR reaction was conducted with 2 or 3 µL of genomic DNA and 1 or 1.4µL of each primer (20µM) according to sample DNA concentration, 25 µL of Amplitaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) and H<sub>2</sub>O qsp 50 µL. PCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 95°C for 45 s, annealing at 59°C for 45 s, extension at 72°C for 1 min and final elongation step at 72°C for 10 min. Agarose gel electrophoresis was then used to verify that the PCR generate a unique product at the expected fragment length. Amplicons were then purified with PCR Clean kit (Mokasciences, La Madeleine, France). A second PCR round that introduced barcodes was performed on the purified amplicons using the following primers: P5 (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGAC) and P7 (TGTGCAGACTTGAGGTCAGTG-index-TAGAGCTATCGGCAGAAGACGAAC). PCR was conducted with 30 ng of DNA, 25 µl of AmpliTaQ Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems), 1.25 µl of each primer (20 µM) according to the protocol instructions reported by Lluch (2015), 20.5 µl of H<sub>2</sub>O (50 µl final) . PCR amplifications were conducted according to the following protocol: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 15 cycles of 95°C for 45 sec, 65°C for 45 sec, 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 10 min. Another purification



step was performed on the final PCR products with the PCR clean kit (Mokasciences, La Madeleine, France). Amplicon concentrations were measured using Xpose spectrophotometer (Trinean, Gentbrugge, Belgium) and the quality of a subsample composed of 12 amplicons was evaluated after electrophoresis on a Agilent DNA 7500 chips using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Libraries were then pooled in equimolar ratios. DNA concentration of the resulting pool was quantified by qPCR on a LightCycler® 480 Roche instrument using KAPA Library Quantification Kits for Illumina® platforms (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA) prior to sequencing. Sequencing was then performed according to the manufacturer's instruction (Illumina, San Diego, CA, USA).

### **Sequence quality control, OTU clustering and taxonomic assignments**

Paired end reads generated by Illumina's Miseq were processed on Genotoul bioinformatics platform (Bioinfo Genotoul) using Mothur v .1.33.1 software pipeline and following the Miseq SOP recommendations with some adaptations (Schloss et al. 2009). Only contigs ranging from 430 to 460 bps and with a minimal overlap of 25 bp were kept for the analysis. Furthermore, contigs with more than 2 mismatches in the overlap were removed from the data set singletons were removed just before the alignment of the sequences against SILVA 123 database (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-123/>) (Quast et al. 2013). SILVA 123 database, which provides taxonomy and sequences references of 16S rRNA genes for 152 308 bacteria, was used to define OTU for the ecological and taxonomic description of the studied microbiota (alpha and beta diversity). OTU (Operational Taxonomic Units) were defined at 97% pairwise identity, and assigned using furthest neighbor algorithm. Consequently, a total of 13 321 representative unique sequences were assigned to 1 873 different OTU.

### **Functional Predictions**

Functional profiles from the 1873 OTU present in the studied communities were predicted using the Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) (Langille et al. 2013). PICRUSt uses evolutionary modeling to predict metagenomes from 16S data compared with gene data present in Greengenes reference genome database. The 13.5 Greengenes reference taxonomy databases from august 2013 provides sequences references for 202 421 bacteria.

Metagenome prediction and OTU contribution to some selected KEGG pathway was conducted as described by Langille (2013). From the 293 predicted functions, only 97 that were in relation with carbohydrate, lipid, or protein metabolism or with immunity were selected for further analysis. Functional microbial prediction with PICRUSt analysis could help to set hypothesis before launching laborious set of investigations of the biological process involved in the gut-microbiota symbiosis. Issues from such predictive functionality enable to suspect the implication of some specific OTU in some beneficial or rather pathological metabolic or immunological mechanisms. However, the functional predictions made with PICRUSt should be considered only as an indication of the functional potential held by the gut-microbiota.

### **Statistical Analysis**

We first tested whether fish weight, mortality and proportion of the most represented phylum differed between experimental conditions using two-ways ANOVA followed by Tukey HSD *post-hoc* tests with lines, food treatment and their interactions as predictors. Fish weight and mortality were log-transformed and proportion were arcsine-transformed (Sokal and Rohlf 1981) prior to the analysis and ANOVAs were implemented using generalized least square models (GLS) (Pinheiro and Bates 2000) to account for unequal variances among experimental conditions.

We quantify the OTU and phylogenetic diversity within each sample using OTU richness, OTU evenness calculated with the index  $E_{var}$  of Smith and Wilson (Smith et al. 1996), phylogenetic richness, variability and evenness assessed with the indices PSE, PSV and PSE respectively (Helmus et al. 2007). To avoid biases arising from variation in sample size, we applied a correction via a rarefaction analysis to estimate all diversity indices at the same number of sequences. More precisely, we down-sampled the number of sequences in each sample by randomly selecting 10847 sequences 1000 times (10847 being the minimum number of sequences obtained in any sample). For each random sample, diversity indices were calculated, such that the rarefied values for these indices corresponded to the averages of the 1000 random samples. To test whether OTU and phylogenetic diversity differ between experimental conditions, we applied two-ways ANOVA as specified above.

We quantified dissimilarity in OTU and phylogenetic composition between samples using Jaccard and UniFrac dissimilarity index respectively as overall  $\beta$  diversity measures

( $\beta_{\text{total}}$ ). UniFrac is similar to the Jaccard index excepted that it incorporates branch lengths in the computation of  $\beta$  diversity (Lozupone and Knight 2005). Following Cardoso et al. (2015) , we further partitioned Jaccard and UniFrac indices into their replacement ( $\beta_{\text{repl}}$ ) and richness difference ( $\beta_{\text{rich}}$ ) components as the overall  $\beta_{\text{total}} = \beta_{\text{repl}} + \beta_{\text{rich}}$ .  $\beta_{\text{repl}}$  between two samples reflects the substitution of  $n$  OTU/ branches in a given sample from  $n$  OTU/ branches in the other sample (true turn-over) while  $\beta_{\text{rich}}$  quantifies the loss or gain of OTU/branches among samples. All  $\beta$  diversity measures were weighted with log-transformed abundances. For functional prediction, we quantified dissimilarity between samples using Bray-Curtis distance computed on the log-transformed KEGG pathway composition matrix including only the 97 pathways retained for the study.

To test whether OTU, phylogenetic composition and functional pathways differ between experimental conditions, we applied two-ways non-parametric permutational multivariate analysis of variance (PerMANOVA) (Anderson 2006) followed by *post-hoc* t tests with dissimilarity matrix as response variable and lines, food treatment and their interactions as predictors. Prior to PerMANOVA, homogeneity of variance between experimental conditions was tested using permutational analysis of multivariate dispersions (PERMDISP) (Anderson 2006).

Both PerMANOVAs and PERMDISP were performed using permutation tests with 9999 iterations. Differences in OTU and phylogenetic composition were further visualized using constrained analysis of principal coordinates.

To determine the extent to which OTU were shared across conditions, we identified the core community as all OTU common to all samples ( $n=53$ ) regardless of the treatment and the lines.

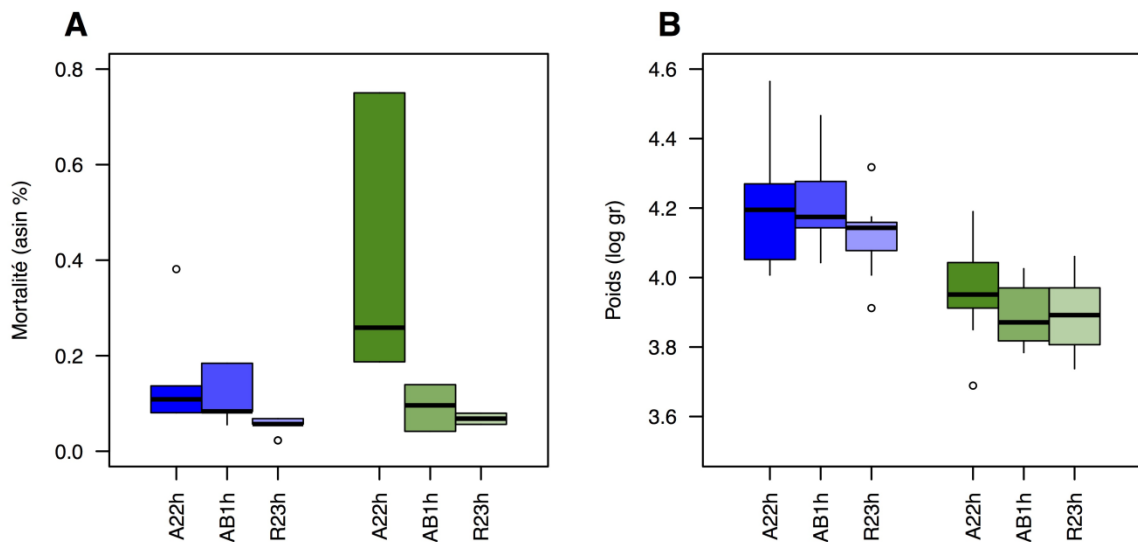
## RESULTS

### Final fish weights and experimental mortality

Final fish weights and values of mortality are presented in Table 2 and Figure 1. Both lines and the interaction between lines and treatment had a significant effect on mortality (GLS; effect line  $F_{2,47}= 12.246$ ,  $P<0.001$ ; interaction  $F_{2,47}= 5.871$ ,  $P=0.005$ ) with the line A22h fed a PB diet displaying the higher mortality (Post-hoc tests  $P<0.05$ ). Only the treatment impacted significantly the final fish weights (GLS; treatment  $F_{1,47}= 5.871$ ,  $P<0.001$ ) with fish fed a PB diet being the leaner.

**Table 2.** Results of the Generalized Least Square models (GLS) testing the effect on lines, treatment and their interaction on values of experimental mortality and final fish weights. Values of mortality and weights were arcsine and log-transformed respectively prior to the analysis. The degree of freedom (df), F-ratio (F) and its associated p-values (P) are given.

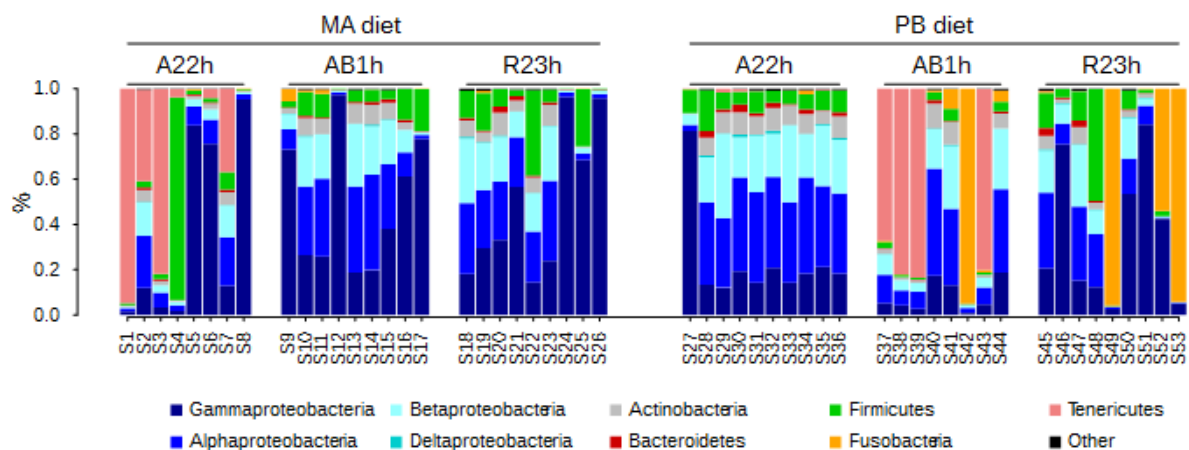
	Variables	df	F	P
Mortality	diet	1,47	1.4604	0.2329
	line	2,47	12.2461	<b>&lt;0.001</b>
	diet x line	2,47	5.8713	<b>0.0053</b>
Final fish weight	diet	1,47	66.89	<b>&lt;0.001</b>
	line	2,47	1.76	0.1829
	diet x line	2,47	0.90	0.4130



**Figure 1.** (A) Distribution of the global mortality of the trout isogenic lines recorded from the first feeding to the tenth months and (B) of rearing (B) Distribution of the final fish weight of the trout isogenic lines after 10 months of rearing with either the MA-diet (blue boxplots) or PB diet (green boxplot).

## Abundant profile

The dominant phylum was Proteobacteria in 38 of the 53 observed samples (mean average abundance across all samples = 67%), with mainly Gammaproteobacteria (33%) and Alphaproteobacteria (20%). Five other groups were also highly represented namely Betaproteobacteria (13.3%), Tenericutes (10.9%), Firmicutes (9.2%), Fusobacteria (6.9%) and Actinobacteria (4.5%) (See Figure 2). Gammaproteobacteria were significantly more abundant in fish fed the MA diet (GLS  $F_{1,47}=7.6033$ ,  $P=0.008$ ). Interaction between the host genotype and the diet was significant for Alpha-, Beta- and Delta-proteobacteria, Actinobacteria and Tenericutes (Table S1). Fusobacteria were significantly more abundant in trout fed the PB diet ( $F_{1,47}=5.167$   $P= 0.027$ ) (Table S2).



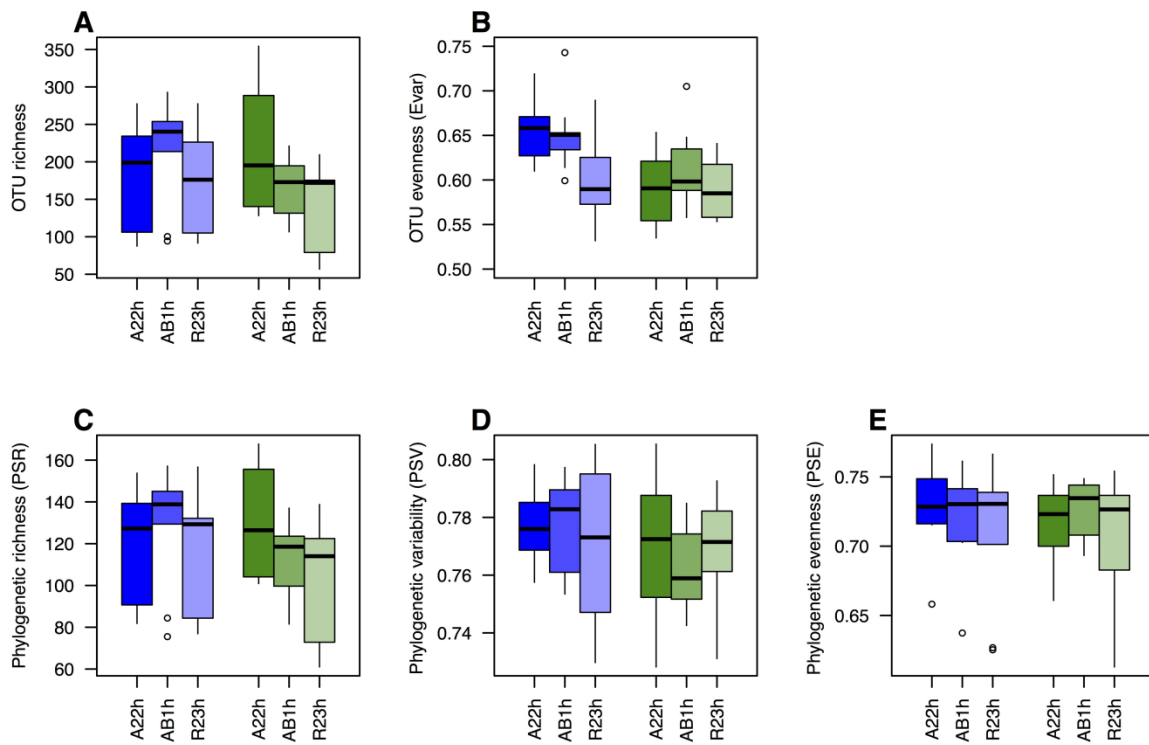
**Figure 2.** Relative abundance dispersal of bacterial taxon associated to the intestinal mucosa between replicates. Individual abundances are presented at the phylum level, excepted for the Proteobacteria abundances which are presented at the class level. For each diet and host genotype, abundances are presented individually, with a sample size varying between 8 and 10 individuals per condition.

## Diversity patterns

We did not find significant differences between diet and host genotypes for most of the  $\alpha$  diversity metrics (Figure 3 and Table S2) except a significant drop of the Evenness index between MA and PB-diet feeding (GLS,  $F_{1,47}=19.010$ ,  $P < 0.001$ ).

Overall,  $\beta$  diversity between experimental conditions was high with on average 70% of dissimilarity between conditions (Table S3) with species turn-over ( $\beta_{\text{replacement}}$ ) being the dominant component (40% Table S3). Homogeneity of variance between experimental conditions was fulfilled for all  $\beta$  measurements ( $P > 0.05$ , Table S4). Both diet and host

genotype had a significant effect on species turn-over ( $\beta_{\text{replacement}}$ ,  $F_{1,47} = 4.648$ ,  $R^2 = 0.08$ ,  $P = 0.001$  and  $F_{1,47} = 2.168$ ,  $R^2 = 0.08$ ,  $P = 0.01$  respectively Table 3) with R23h being significantly different from A22h and AB1h (*Post-hoc* test  $P < 0.05$ , Table S4). In contrast, differences in species richness ( $\beta_{\text{rich}}$ ) were marginally affected by the interaction between diet and host genotype (PerMANOVA  $F_{1,47} = 3.3$ ,  $R^2 = 0.12$ ,  $P = 0.033$ ). When considering the most abundant phyla or Proteobacteria classes separately, high  $\beta$  diversity was present on bacterial community of the Firmicutes phylum and the Betaproteobacteria classes, with significant interaction between the line and the diet on the total  $\beta$  diversity ( $\beta_{\text{total}}$ ,  $F_{1,47} = 2.009$ ,  $R^2 = 0.07$ ,  $P = 0.007$  and  $F_{1,47} = 2.572$ ,  $R^2 = 0.177$   $P = 0.001$ , respectively). Considering the explaining variables separately, diet had a significant impact on the total dissimilarity and on species turnover of Firmicutes, while line had a significant impact on total Betaproteobacteria. (Tables S5 and S6, respectively). No significant effect of dietary treatment or line were observed on Actinobacteria, nor on Alpha-, Gamma-, or Delta-proteobacteria (Data not shown). When considering phylogenetic relationship between OTU,  $\beta$  diversity dropped by almost 20% (average UniFrac<sub>total</sub> across condition: 51%, Fig. 4C) with phylogenetic turn-over becoming the least dominant component (UniFrac<sub>replacement</sub> = 0.16, Fig. 4D). However, phylogenetic turn-over was significantly explained by the diet and its interactions with the host genotype although the latter had a marginal effect (UniFrac<sub>replacement</sub> PerMANOVA  $F_{1,47} = 11.582$ ,  $R^2 = 0.16$ ,  $P = 0.004$  and  $F_{1,47} = 3.569$ ,  $R^2 = 0.10$ ,  $P = 0.036$ , Table 3). In contrast, difference in species richness was only marginally and significantly explained by the interaction (UniFrac<sub>rich</sub> PerMANOVA  $F_{1,47} = 3.058$ ,  $R^2 = 0.11$ ,  $P = 0.044$ , Table 3).

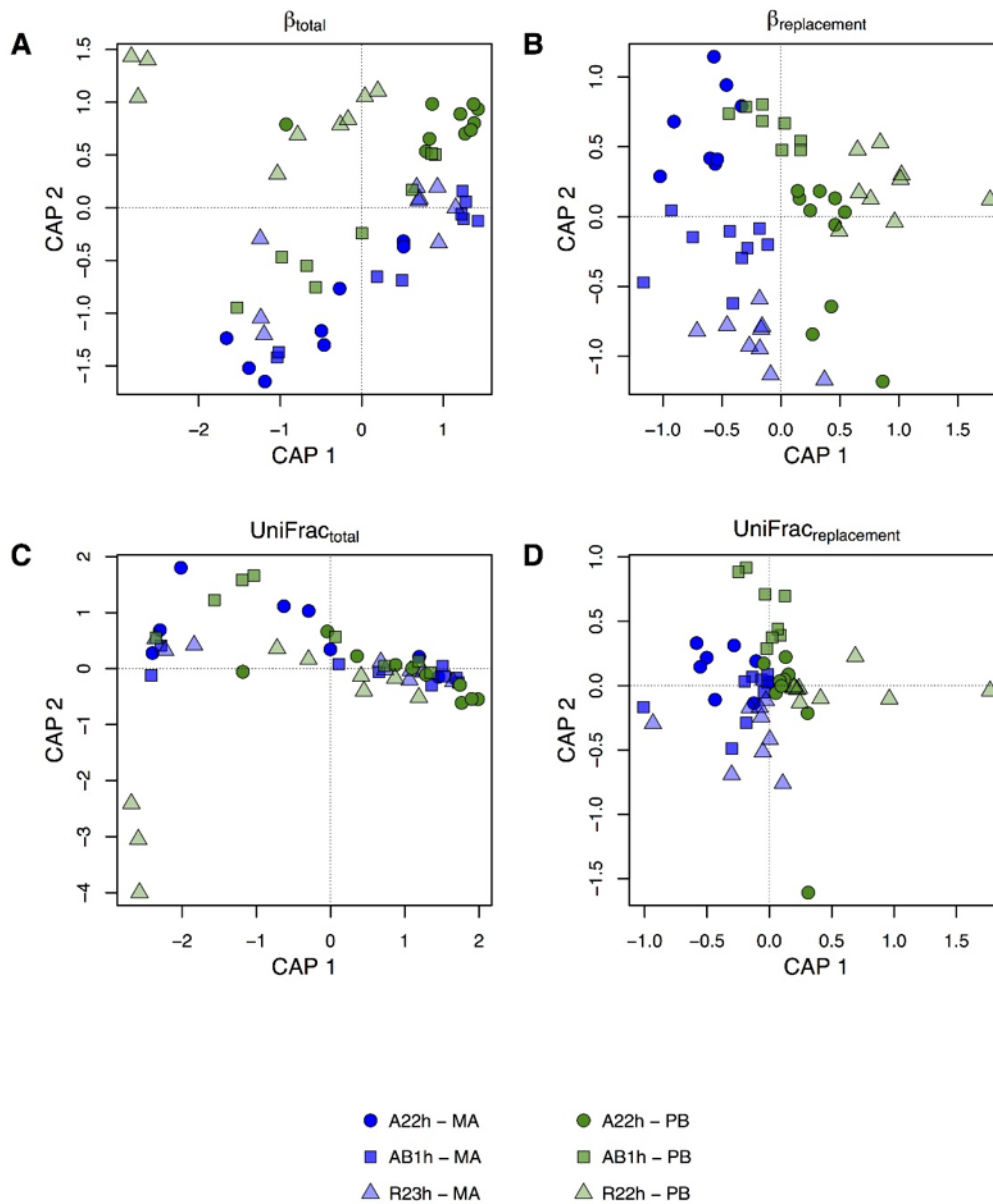


**Figure 3.** OTU and phylogenetic diversity for six experimental conditions i.e. two treatments x three lines. (A) OTU richness, (B) OTU evenness (Evar), (C) Phylogenetic richness (PSR), (D) Phylogenetic variability (PSV) and (E) Phylogenetic evenness (PSE). For each index, the first three boxplots on the left correspond to the MA diet, and last three boxplots on the right correspond to the PB diet.

**Table 3.** Results of the PerMANOVA testing the effect of lines, diet and their interactions on  $\beta$  diversity and functional composition (Bray-Curtis distance). The degree of freedom (df), F-ratio (F),  $R^2$  and p-values (P) are given. Significant results are marked in bold.

	Variables	df	F	$R^2$	P
$\beta_{\text{total}}$	diet	1,47	2.3905	0.04297	<b>0.007</b>
	line	2,47	1.1833	0.04254	0.175
	diet x line	2,47	1.9362	0.06961	<b>0.003</b>
$\beta_{\text{repl}}$	diet	1,47	4.6479	0.08148	<b>0.001</b>
	line	2,47	2.1681	0.07602	<b>0.010</b>
	diet x line	2,47	0.5289	0.01854	0.827
$\beta_{\text{rich}}$	diet	1,47	-0.4071	-0.00755	1.000
	line	2,47	0.3511	0.01302	0.779
	diet x line	2,47	3.3088	0.12275	<b>0.033</b>
UniFrac <sub>total</sub>	diet	1,47	2.3548	0.04086	0.077
	line	2,47	0.7591	0.02635	0.618
	diet x line	2,47	3.3752	0.11715	<b>0.005</b>
UniFrac <sub>repl</sub>	diet	1,47	11.5826	0.16358	<b>0.004</b>
	line	2,47	2.5419	0.07180	0.143
	diet x line	2,47	3.5695	0.10083	<b>0.036</b>
UniFrac <sub>rich</sub>	diet	1,47	-0.09489	-0.00176	0.997
	line	2,47	0.45119	0.01673	0.738
	diet x line	2,47	3.05871	0.11344	<b>0.044</b>
Functional Bray-Curtis distance	diet		5.779	0.0970	<b>0.008</b>
		1,47			
	line	2,47	1.250	0.0420	0.297
	diet x line	2,47	2.149	0.0721	0.107





**Figure 4.** Two-dimensional ordination based on constrained analysis of principal coordinates for  $\beta$  diversity estimates. (A)  $\beta_{total}$  measured with Jaccard index using OTU abundance data (B)  $\beta_{replacement}$  corresponding to the component of  $\beta_{total}$  that is due to OTU turn-over between samples (C)  $UniFrac_{total}$  measured with Jaccard index incorporating branch lengths and (D)  $UniFrac_{replacement}$  corresponding to the component of  $UniFrac_{total}$  that is due to branch turn-over between samples. MA = Marine diet and PB = Plant-based diet. For  $\beta_{rich}$  and  $UniFrac_{rich}$  see supplementary information.

**Table 4.** Core community identified in the trout intestinal mucosa regardless of the diet and the host genotype.

<b>Phylum</b>	<b>Class</b>	<b>Order</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>	
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	<i>Nocardioides</i>	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Nocardioides</i>	
				<i>unclassified</i>	
				<i>Phenylobacterium</i>	
				<i>Brevundimonas</i>	
				<i>Brevundimonas</i>	
				<i>unclassified</i>	
				<i>Rubellimicrobium</i>	
				<i>Paracoccus</i>	
				<i>Sphingomonas</i>	
				<i>unclassified</i>	
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	<i>unclassified</i>	
			Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Rubellimicrobium</i>
			Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Paracoccus</i>
					<i>Sphingomonas</i>
					<i>unclassified</i>
					<i>unclassified</i>
Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Rhizobiales	Oxalobacteraceae	<i>Noviherbaspirillum</i>	
				<i>Massilia</i>	
				<i>Massilia</i>	
				<i>Massilia</i>	
				<i>Alkanindiges</i>	
				<i>Moraxella</i>	
				<i>total</i>	

### **Core community in the whole trout population**

The whole trout population shared 17 OTU. This core community was mainly composed of bacteria belonging to the genera *Moraxella*, *Massilia*, *Brevundimonas*, and *Paraccocus* (Table 4). Interestingly, the 17 OTU represented less than 1% of the 1873 OTU but 22% of the 1 562 490 sequences of the 16S rRNA gene sequences found in this study.

### **Predicted functionality associated with the mucosal microbiota**

Nearest Sequenced Taxon Index (NSTI) quantify the availability of nearby genome representatives for each microbiome sample. In the present study the NSTI value indicates an accurate metagenome predictions (mean NSTI =  $0.076 \pm 0,026$  s.d), as it remained close to the average threshold reported by Langille et al. (2013) on data analysis from the Human Microbiome Project (HMP) (HMP, mean NSTI =  $0.03 \pm 0,026$  s.d) that was the better NSTI value obtained across the four environment evaluated by those authors. Homogeneity of variance between experimental conditions was not fulfilled for functional Bray-Curtis distance matrix ( $P < 0.05$ , Table S7); the line R23h in PB diet being significantly more functionally dispersed than A22h, AB1h in MA diet and A22 in PB diet. Thus PerMANOVA was applied. It revealed that fish diet was significantly different in their functional composition ( $F_{1,47} = 5.779$ ,  $R^2 = 0.09$ ,  $P = 0.008$ ) while line and interaction between line and diet did not have any significant effect on the functional composition (Table 3). Some pathway related to the catabolism or on the contrary to the *de novo* synthesis of some essential amino acids (histidine, phenylalanine, taurine, arginine and tryptophane), saturated fatty acids, phospholipids, glycosphingolipids, or glucosaminoglycans were significantly associated with the inferred metagenome of the microbiote of the trout fed the marine diet (**Table 5**). These pathways include various genes that are potentially expressed by many different OTU. Considering the functional genes implicated in immunity and infectious diseases, 8 OTUs were significantly associated with acid clavulanic synthesis in metagenome of the trout fed the marine diet ( $P < 0.035$ ). All the OTU implicated in this function belonged to Nocardioideae, and most of them to the *Nocardioides* genus (data not shown). Considering amino acids metabolism, genes dedicated to glutamate catabolism were significantly specific to the functional prediction of PB fed trout ( $P = 0.02$ ), with 595 and 599 OTUs potentially involved in the synthesis of two identified enzymes. The microbiota present in the trout fed with the PB diet, also potentially harbour more gene involved in phosphatidyl choline synthesis ( $P = 0.01$ ).

**Table 6:** Predicted up-regulated functions in relation with lipid, carbohydrate, and amino acid metabolism and immunity in mucosa-associated microbiota in trout fed a marine (MA) diet and a plant-based (PB) diet.

Diet	Pathway (number of genes*) function	p-value <sup>2</sup>	KEGG orthology (OTU number <sup>2</sup> ) enzyme	Phylum	Class	Order	Family	Genus	OTU Contribution	
MA	Lipid metabolism : desaturase (3) from Lipid Biosynthesis Proteins pathway	0.010	K00507 (232) Delta-9 desaturase	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae		0.032	
				Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae		0.008	
	acyl coA synthase (1) from Lipid Biosynthesis Proteins pathway	0.010	K00508 (139) linoleoyl-CoA desaturase	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideae	Nocardioides		0.027
			K01897 (502) long-chain acyl-CoA synthetase	Proteobacteria	Deltaproteobacteria <sup>1</sup>	Desulfobacterales <sup>1</sup>	Desulfobacteraceae <sup>1</sup>	Desulfatitales <sup>1</sup>		0.017
	fatty acid synthase (1)	0.020	K01897 (502) long-chain acyl-CoA synthetase	Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>		0.015
				Proteobacteria	Deltaproteobacteria <sup>1</sup>	Desulfobacterales <sup>1</sup>	Desulfobacteraceae <sup>1</sup>	Desulfatitales <sup>1</sup>		0.017
	glycosphingolipide anabolism (1)	0.020	K12373 (162) hexosaminidase	Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>		0.015
				Bacteroidetes	Cytophagia <sup>1</sup>	Cytophagales <sup>1</sup>	Cytophagaceae <sup>1</sup>	Hymenobacter <sup>1</sup>		0.018
	lipoic acid anabolism (1)	0.005	K03644 (465) lipoyl synthase	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae			0.017
				Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>		0.017
	phospholipide acyltransferase (2) from Lipid Biosynthesis Proteins pathway	0.010	K00655 (590) 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>		0.012
				Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>		0.01
	alpha linolenique acid catabolism (1)	0.005	K00632 (375) lysophosphatidate acyltransferase	Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>		0.026
				Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>		0.009
	sphingolipide anabolism (3)	0.005	K01117 (1) sphingomyelin phosphodiesterase	Spirochaetes	Leptospirae	Leptospiraceae	Leptonema			0.161
				K01201 (97) glucosylceramidase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	Phenyllobacterium	
	sphingolipide catabolism (1)	0.005	K01634 (38) sphinganine-1-phosphate aldolase	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae <sup>1</sup>			0.014
				Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideae	Nocardioides		0.037
	Carbohydrate metabolism : Glycosaminoglycan catabolism (5)	0.035	K01132 (1) N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Saprospiraceae	Lewinella		0.161
				K01136 (13) iduronate 2-sulfatase	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		0.06
Bacteroidetes				Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Parapedobacter		0.02	
K01197 (26) hyaluronoglucosaminidase				Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonas		0.056	
			Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella		0.025	

<sup>1</sup> OTU taxonomic assignment obtained after alignment of its sequence with RDP software (in case of unassigned taxon of the corresponding OTU after its sequence alignment with GreenGenes database).

<sup>2</sup> p-value corresponding to the PERMANOVA statistical analysis that test the dietary treatment effect on each predicted pathway with PICRUST software.

<sup>3</sup> OTU number: number of identified OTU in the bacterial community that harbors genes coding for proteins involved in the identified KEGG pathway.

\*number of gene identified in the predicted genome of the bacterial community that code for enzymes or proteins implicated in the corresponding pathway.

**Table 6:** continued

MA	Amino acid metabolism :								
histidine catabolism (1)	0.015	K01745 (341) histidine ammonia-lyase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>	0.047	
			Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>	0.017	
histidine anabolism (2)	0.015	K00013 (510) Histidinol dehydrogenase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>	0.028	
			Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>	0.013	
phenylalanine catabolism (12)	0.05	K01089 (92) histidinol-phosphatase	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae		0.048	
			Bacteroidetes	Cytophagia <sup>1</sup>	Cytophagales <sup>1</sup>	Cytophagaceae <sup>1</sup>	Hymenobacter <sup>1</sup>	0.024	
arginine catabolism (7)	0.030	K10775 (1) phenylalanine ammonia-lyase	Actinobacteria	Rubrobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	Rubrobacter	0.161	
			Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>	0.09	
arginine catabolism (7)	0.030	K01593 (34) aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	0.01	
			Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae		0.111	
b alanine catabolism (1)	0.035	K00934 (6) arginine kinase	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridium		0.024	
			Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		0.093	
b alanine anabolism (5)	0.035	K01918 (482) pantoate--beta-alanine ligase	Verrucomicrobia	Spartobacteria <sup>1</sup>	Terrimicrobium <sup>1</sup>			0.046	
			Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>	0.028	
b alanine anabolism (5)	0.035	K00276 (43) primary-amine oxidase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>	0.01	
			Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>	0.072	
tryptophane catabolism (6)	0.040	K01580 (74) glutamate decarboxylase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae <sup>1</sup>	Mesorhizobium <sup>1</sup>	0.05	
			Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	Actinomycetales <sup>1</sup>	Microbacteriaceae <sup>1</sup>	Microbacterium <sup>1</sup>	0.069	
tryptophane catabolism (6)	0.040	K01667 (56) tryptophanase	Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae		0.012	
			Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideaceae	Nocardioides	0.0000001	
tryptophane catabolism (6)	0.040	K01593 (34) aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales			0.011	
			Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	0.00001	
Immunity :	0.035	K12675 (8) clavamate synthase	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Pedomicrobium	0.00001	
			Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideaceae	Nocardioides	0.0001	
acide clavulanique (1)	0.035	K12675 (8) clavamate synthase	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideaceae	Aeromicrobium	0.0002	

<sup>1</sup> OTU taxonomic assignation obtained after alignment of its sequence with RDP software (in case of unassigned taxon of the corresponding OTU after its sequence alignment with GreenGenes database).

**Table 6:** continued

PB	<u>Lipid metabolism :</u>									
	glycerophospholipide anabolism (5)	0.010	K00968 (10)		Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i> <sup>1</sup>		0.138
			choline-phosphate cytidyltransferase		Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Actinomycetales</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	0.023
			K01004 (33)							
			phosphatidylcholine synthase		Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i> <sup>1</sup>	<i>Mesorhizobium</i> <sup>1</sup>	0.093
					Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>	0.009
	<u>Amino acid metabolism :</u>									
	glutamate catabolism (2)	0.020	K01924 (599)							
			UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase		Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	<i>Actinomycetales</i> <sup>1</sup>	<i>Microbacteriaceae</i> <sup>1</sup>	<i>Microbacterium</i> <sup>1</sup>	0.014
					Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i> <sup>1</sup>	<i>Mesorhizobium</i> <sup>1</sup>	0.01
			K01925 (595)							
			UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase		Actinobacteria					0.014
					Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i> <sup>1</sup>	<i>Mesorhizobium</i> <sup>1</sup>	0.01
	taurine anabolism (1)	0.015	K00456 (3)							
			cysteine dioxygenase		Proteobacteria	Deltaproteobacteria	<i>Myxococcales</i>	<i>Cystobacteraceae</i>		0.108
				Proteobacteria	Deltaproteobacteria	<i>Myxococcales</i>	<i>Myxococcaceae</i>	<i>Myxococcus</i>	0.054	
taurine catabolism (3)	0.015	K07255 (6)								
		taurine dehydrogenase small subunit		Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>		0.093	
				Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus</i>	0.056	
		K03119 (113)								
		taurine dioxygenase		Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i> <sup>1</sup>	<i>Mesorhizobium</i> <sup>1</sup>	0.037	
				Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>		0.013	
<u>Immunity :</u>										
b lactalase class b (1)	0.010	K01467 (364)								
		beta-lactamase class C		Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>		0.018	
				Actinobacteria	Actinobacteria <sup>1</sup>	<i>Actinomycetales</i> <sup>1</sup>	<i>Microbacteriaceae</i> <sup>1</sup>	<i>Microbacterium</i> <sup>1</sup>	0.015	

<sup>1</sup> OTU taxonomic assignment obtained after alignment of its sequence with RDP software (in case of unassigned taxon of the corresponding OTU after its sequence alignment with GreenGenes database).

## Discussion

The present study extends the few reports on the rainbow trout intestinal microbiota with the effects of total and combined fish oil and meal replacement with feedstuff from vegetable origin (Ramos et al. 2013; Lyons et al. 2015). Moreover, unlike former studies which mostly focussed on the transient microbiota from the rainbow trout intestinal lumen (Jaafar et al. 2013; Ortiz et al. 2013; Ramos et al. 2013; Ingerslev et al. 2014; Giannenas et al. 2015), the present description carry on the trout autochthonous microbiota closely associated to the intestinal mucosa. This specific microbiota is of beneficial interest for its host as it delivers vital nutrients, such as vitamins (Leblanc et al. 2012) or amino acids (Neis et al. 2015), hydrolyses some indigestible feedstuff (glycans or fibre), permits the development of the immune system (Round and Mazmanian 2009), and, by antagonism, hinders colonization of the mucosal surfaces by potentially pathogenic organisms (Vaikunthanathan et al. 2016). Therefore, any disruption or modification of the diversity and composition of the trout autochthonous microbial community can have substantial consequences on the host physiology (Schippa and Conte 2014). A dysbiotic microbiota is effectively unable to provide as much benefit in comparison to a well-balanced microbiota (Schippa and Conte 2014). Finally, both the biological material and the procedure used in the present study enabled to deeper investigate the concomitant effect of diet and host genotype on the trout microbiota. Effectively, the use of trout isogenic lines permitted to drastically reduced intra group genotype variability. Furthermore, the microbiota was described through NGS analysis, which permitted to launch an investigation of community dissimilarity at the operational taxonomic unit (OTU) level (Schloss and Westcott 2011). OTU were clustered at 3% dissimilarity that is equivalent to the rank of species for Bacteria (Yarza et al. 2014) .

Considering the microbial alpha diversity, the diet and the host genotype did not have any effect on Chao1 richness index, which is concomitant with a similar study on different species of surgeonfish eating different diets (Miyake et al., 2015). Indeed, OTU evenness was the unique index that highlight differences between diet oil and meal sources, with significantly lower values in fish fed with the vegetable diet (See supplementary data, **Table S1**). This drop of evenness under vegetable feeding can be regarded as the response of a stress imposed to the fish that lead to the dominance of one or some few OTU. This is not surprising since evenness, in comparison with other diversity indices differentiated itself for it reliability and sensitivity to environmental changes (Stirling and

Wilsey 2001), and also for its robustness (Haegeman et al., 2013). Usually, a drop of evenness decrease ecosystem functioning (Worm and Duffy 2003; Ives and Carpenter 2007). Therefore, plant-based diet acted as a filter, sorting and/or favouring specific strategies so that only OTU having functions suitable to cope with this diet can pass through this filter. It is widely known that vegetable feedstuff incorporation modify some specific bacterial abundances in a broad range of mammals and fish species (Sullam et al. 2012). Fish meal replacement disturbed intestinal microbiota profile in many different fish species. Soy bean meal inclusion led to a higher *Firmicutes:Proteobacteria* ratio in rainbow trout (Desai et al. 2012), and in *Weissella confusia* and *Sphingomonas* abundance in salmon (Reveco et al., 2014). Pea protein concentrate inclusion modified *Lactobacillacea* abundance in salmon, and a blend of soybean, pea, sunflower, and bean meal disturbed *Photobacterium*, *Pseudomonas*, and *Firmicutes* abundances in sea bream (Estruch et al. 2015). Nevertheless, none of the patterns reported by these studies were observed in our experiment. We rather observed some similarities with the reported effects of fish oil replacement with oil from vegetable origin. Marine oil substitution with a blend of rapeseed, sunflower and linseed oil had yet induced a decrease of *Shewanella* bacterial counts in bacterial culture from trout digestive tracts (Ringø et al. 2016). In the present study, *Shewanella* was only present in the core community of trout fed with the MA diet, and its abundance was significantly higher in trout fed with this diet. *Shewanella* may probably contribute to some metabolic or immunological mechanisms. For instance, its supplementation in germfree zebra fish was followed with a rescuing of pancreatic  $\beta$  cell involved in glucose homeostasis (Hill et al. 2016) In the present study, the diet had also a significant impact on *Gammaproteobacteria* and *Fusobacteria* abundances, with more *Gammaproteobacteria* and less *Fusobacteria* observed in the intestinal bacterial community of trout fed with the MA diet. *Actinobacteria*, *Alpha-* and *Beta-proteobacteria* were rather sensible to both diet and host genotype.

Results from  $\beta$  diversity that the diet induced more significant dissimilarity than the host genotype, which is concomitant with the results from Miyake on sturgeon fish (Miyake et al. 2015). The dissimilarity on the whole community between the different experimental conditions reached 70% and was mainly driven by some specific phylum and classes. For instance, we detected significant differences on *Firmicutes* and  *$\beta$ -Proteobacteria* OTU composition with composition on *Firmicutes* being mainly impacted by the dietary treatment, and composition on  *$\beta$ -Proteobacteria* being mainly impacted by the



interactions between diet and trout genotype. Firmicutes higher sensibility to the diet, in comparison to other phylum is concomitant with a similar study in rainbow trout, where individuals fed with a grain-based diet had significantly more *Lactobacillus* and *Streptococcus*, than individuals fed with a marine diet harbouring more *Clostridiales* (Wong et al. 2013). Finally, even if the host genotype had a weaker effect than the diet, the impact we observed confirms and states its previously reported implication in the selection of the allochthonous microbiota (Navarrete et al. 2012).

Such differential sensibility of some specific taxons to either the diet or the host genotype was also observed in human and chicken. However, in these two terrestrial species, specific species from the *Firmicutes* phylum were mostly selected by the host genotype, with *Christensenellaceae* being the taxon with the highest heritability in humans (Goodrich et al. 2016), while *Lactobacillus crispatus*, *C.leptum* and *C.coccoides* to *E.ratio* displaying moderate heritability in chicken. The biological mechanism that could explain this selectivity was investigated through correlations between specific Quantitative Trait Loci (QTL) and heritable taxons. As a result, some genes implicated in immunity and gastrointestinal tract motility generates transcripts that could be involved in the microbiota selectivity process (Mignon-grasteau et al. 2015). In humans, *Bacteroidaceae* is the taxa that is most affected by the diet (Shapira 2016). Such inconsistency in the phylum shaped by the different variables with the results from the present study is not surprising as freshwater and terrestrial species harbour a quite distinct microbiota (Sullam et al. 2012). Moreover the present study did not investigate the allochthonous but rather the autochthonous microbiota.

At the opposite, we were able to identify some specific bacterial taxa of the trout's intestinal mucosa regardless of the diet or the host genotype. This group of bacteria shaped a bacterial core community composed of 17 OTU present in all individuals. This core community represented in abundance up to 23% of the present OTU in the gut, and was mainly composed with *Moraxella*, *Massillia*, and *Brevundimonas*, and more marginally with *Nocardioides*, *Phenylobacterium*, *Rubellimicrobium*, *Parracoccus*, *Sphingomonas*, *Noviherbaspirillum* and *alkanindiges* genera from  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -*Proteobacteria* and from *Actinobacteria* classes. The concept of a core gut microbiota has been widely explored in mammalian hosts (Turnbaugh et al. 2009), and was latter applied in bonny fish like zebra fish, which was shown to harbour a core community of 21 OTU regardless the geographic locations of their rearing lab facilities (Roeselers et al. 2011).

Core microbiota richness is an important parameter to take into consideration as its low value is associated to a frailty status in human (Toole and Jeffery 2015). As a comparison, zebra fish reported core community is composed with *γ-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteria* and *Actinobacteria* classes, which looks like the trout core community we described. Core community from the rainbow trout whole intestine had already been reported, with 52 bacterial lineages observed across all individuals. The observed core was primarily composed with bacteria from *Bacilli*, *Alpha-*, and *Gamma-proteobacteria* classes (Wong et al. 2013). Thus, in accordance with the results from the present study, where bacteria from *Gamma-* and *Alpha-proteobacteria* accounted for 68% of the present bacteria in the core community, these two classes appeared effectively to be the main taxa encountered in trout core community. Bacterial species present in the trout core community may contribute to digestion, intestine's immunity maturity, or to any metabolism crosstalk with the trout. For instance, *Brevundimonas* have already been reported to hydrolyse cellulose and phytate, which are nutrient and antinutritional factor that can't be merely metabolized by the rainbow trout enzymes (Huang et al. 2009; Hu et al. 2014). Even if not assessed, their involvement in this metabolic activity can be suspected. This core community of bacteria shared between all individuals could be the result of three distinct patterns that are known to induce a selection on the gut microbiota. First, before the spawning step, maternal vertical transmission of antimicrobial compounds, or bacterial fragments into trout eggs participate to the immune system acquisition and subsequently shape the gut microbiota. Identical environmental temperature and water that surround the eggs and the following fish also tend to favor the implementation of a specific microbiota around the eggs and then in the developed gut (Giatsis et al. 2015; Colston and JacksonColin 2016). Finally, from a metabolic perspective, the similarity of the maternal origin could also explain the observed core community. It has effectively been shown that the host mitochondrial genome influences the structure of the gut microbiota (Ma et al. 2014). Since all the isogenic lines came from eggs spawned by a same female, and were reared in the same flow through system all these events may have contribute to shape the core community. Several factors can explain the remaining variability of the encountered microbiota in the same isogenic line fed with the same diet. First, the modulation of the genome expression by epigenetics programing is initiated as soon as the embryo stages in fish and has yet been encountered in homozygote twins (Li and Leatherland 2013; Jonsson and Jonsson

2014). Egg spawning time, which varied over a ten days period of time in the present experiment could thus have impacted the genome expression. Finally, possible traces of food could have remained on the intestinal mucosa during sampling, and have subsequently brought some bacteria from the digesta in some mucosal samples.

Bacterial community description was extended at the functional level. Effectively, as similar genes can be harboured by different bacteria, it is relevant to describe the functionality of the entire community. Bacterial contribution to the host physiology can be investigated by many different approaches ranging for instance from *in vitro* measure of antagonistic activity of intestinal cultured bacteria against potential bacterial pathogen (Pham et al. 2014), to specific bacterial challenge test on axenic animals (Dierckens et al. 2009), or for instance to the correlation measure between the abundance of some specific bacterial species in the gut and the transcription level of some inflammatory or immunological genes in the intestinal tissue of the corresponding host (Forberg et al. 2012; Mcknite et al. 2012). In the present study, we identified OTU implicated in lipid, carbohydrate and essential amino acid catabolism or anabolism, or in immunological pathways. Even if the effective contribution of those metabolic pathways was not assessed, we could presume that it would be beneficial for the host to avoid the establishment of OTU potentially implicated in essential amino acid or phospholipid catabolism. On the contrary, it would be of beneficial interest for the host to favor the implantation of OTU that have the capacity to synthesis essential amino acid or phospholipid and especially phosphatidylcholine. Each identified pathways harbour different genes that were manifestly carried by many different OTU, which makes difficult the selection of some potentially beneficial OTU. Nevertheless, PICRUSt software enable to estimate the relative contribution of each OTU in the expression of considered gene according to the differential abundance of each OTU in the whole set of sample. Thus, for bacterial enzyme of potentially beneficial interest, selecting the more contributing OTU to investigate bacterial host symbiosis could permit to ensure a good coverage of the studied OTU in a whole population. Researching OTU with good coverage is relevant before launching investigation on bacterial with beneficial interest for it host as probiotic are definite by their ability to settle in the long term on the intestinal mucosa (Servin and Coconnier 2003). Results from the functional prediction highlighted that the phosphatidylcholine synthase gene (K01004) was significantly more abundant in the predicted microbial metagenome of the trout fed with the PB diet, and

was due to 33 OTU, and principally *Mesorhizobium* and *Devosia* genus from *Rhizobiales* order. Phosphatidylcholine level is reduced in fish diets formulated with vegetable oil and soy lecithin in comparison with more traditional diets. Its deficiency has been linked with the decrease of feed intake that currently occurred in carnivorous fish fed with plant feedstuff, and its supplementation improve feeding consumption (Azarm et al. 2013). Favouring the implementation of *Mesorhizobium* and *Devosia* on the trout mucosa could be a way to improve the aforementioned negative repercussions due to phosphatidylcholine deficiency associated to PB diet. Similarly, the functional predictions suggest that fish fed vegetable PB diet harbour a microbial community more susceptible to decrease glutamate level for metabolic purpose due to UDP N-acetylmuramate alanine ligase and UDP N-acetylmuramoylalanine D-glutamate ligase gene abundance (K01924 and K01925 respectively). As glutamate is the main energetic sources of enterocytes in carnivorous fishes (Tome 2009), its actual deficiency in trout enterocyte of fish fed a PB diet should be further investigated. For instance, the redox status in enterocyte and the amount of glutamine synthase, glutaminase and other enzymes implicated in the ATP production pathways in the intestine are related to the intestinal energy status (Tome 2009). Bacterial community are also potentially involved in lipid metabolism. In fish fed the MA diet, delta-9-desaturase gene (K00507) was more abundant in the microbial community, and was due to 232 OTU. The higher abundance of this gene may bring some benefits to its host as the encoded enzyme is involved in polyunsaturated fatty acids (PUFA) synthesis, which makes part of fish requirements (NRC 2011; Lee et al. 2016). Consequently, results from PICRUSTt analysis permitted to suspect at least part of the contribution of the bacterial community to the trout host, but, it would also be interesting to assess such hypothesis with analysis on 16S sequencing from both DNA and RNA extraction from intestinal sample in order to identify the metabolically active OTU. Furthermore, performing such investigations through deep metagenomic shotgun sequencing would permit to propose more accurate predictions on the bacterial community functionality (Wang et al. 2013).

Consequently, microbiota deposition, binding, survival and renewal inside the intestinal mucosa layer are both explained by the composition of the diet, and by the host genotype, the diet paying more contribution to the selective process through bacterial turnover. The substitution of fish meal and oil with plant feedstuff is a chronic stress that reduced microbial evenness and led to highly dissimilar bacterial community, with some

potentially distinct functionalities that may favour or on the contrary disadvantage their host, according the considered metabolic pathway. Consequently, further investigation should be performed to assess if the different communities are actually involved in divergent metabolic activity including phosphatidylcholine, glutamine, and other amino-acid metabolisms.

## REFERENCES

- Adel M, Lazado CC, Safari R, et al (2016) Aqualase<sup>®</sup>, a yeast-based in-feed probiotic, modulates intestinal microbiota, immunity and growth of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Res* 1–12. doi: 10.1111/are.13019
- Anderson MJ (2006) Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* 62:245–253. doi: 10.1111/j.1541-0420.2005.00440.x
- Azarm HM, Kenari AA, Hedayati M (2013) Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquac Res* 44:634–644. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03068.x
- Calduch-giner JA, Sitjà-bobadilla A, Pérez-sánchez J (2016) Gene expression profiling reveals functional specialization along the intestinal tract of a carnivorous teleostean fish (*Dicentrarchus labrax*). *Front Physiol* 7:1–17. doi: 10.3389/fphys.2016.00359
- Cardoso P, Rigal F, Carvalho JC (2015) BAT - Biodiversity assessment tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods Ecol Evol* 6:232–236. doi: 10.1111/2041-210X.12310
- Clements KD, Angert ER, Montgomery WL, Choat JH (2014) Intestinal microbiota in fishes: What's known and what's not. *Mol Ecol* 23:1891–1898. doi: 10.1111/mec.12699
- Colston T, Jackson Colin (2016) Invited review : microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life : what's known and unknown ? *Mol Cell Biol*. doi: 10.1111/mec.13730
- Crecy JP, Conway T (2015) Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 23:133–140. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.011
- Desai AR, Links MG, Collins S a., et al (2012) Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350–353:134–142. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.005
- Dierckens K, Rekecki A, Laureau S, et al (2009) Development of a bacterial challenge test for gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Environ Microbiol* 11:526–533. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01794.x
- Dimitroglou A, Merrifield DL, Moate R, et al (2014) Dietary mannan oligosaccharide

- supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87:3226–3234. doi: 10.2527/jas.2008-1428
- Dufrêne M, Legendre P (1997) Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol Monogr* 67:345–366. doi: 10.2307/2963459
- Estruch G, Collado MC, Penaranda DS, et al (2015) Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One* 10:1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0136389
- Forberg T, Vestrum RI, Arukwe A, Vadstein O (2012) Bacterial composition and activity determines host gene-expression responses in gnotobiotic Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Vet Microbiol* 157:420–427. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.007
- Galley JD, Yu Z, Kumar P, et al (2014) The structures of the colonic mucosa-associated and luminal microbial communities are distinct and differentially affected by a prolonged murine stressor. *Gut Microbes* 976:748–760. doi: 10.4161/19490976.2014.972241
- Giannenas I, Karamaligas I, Margaroni M, et al (2015) Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 41:119–128. doi: 10.1007/s10695-014-0010-0
- Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, et al (2015) The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Nat Publ Gr* 1–15. doi: 10.1038/srep18206
- Glencross B, Evans D, Rutherford N, et al (2006) The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture* 253:512–522. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.009
- Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, et al (2016) Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. *Science* (80- ) 352:29–32. doi: 10.1126/science.aad9379
- Haegeman B, Moriarty J, Neal P, et al (2013) Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. 1092–1101. doi: 10.1038/ismej.2013.10
- Heikkinen J, Vielma J, Kemiläinen O, et al (2006) Effects of soybean meal based diet on

- growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261:259–268. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.012
- Helmus MR, Bland TJ, Williams CK, Ives AR (2007) Phylogenetic measures of biodiversity. *Am Nat* 169:E68–E83. doi: 10.1086/511334
- Hill JH, Franzosa EA, Huttenhower C (2016) A conserved bacterial protein induces pancreatic beta cell expansion during zebrafish development. 1–18. doi: 10.7554/eLife.20145
- Hu X, Yu J, Wang C, Chen H (2014) Cellulolytic bacteria associated with the gut of *dendroctonus armandi* larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Forests* 5:455–465. doi: 10.3390/f5030455
- Huang H, Shi P, Wang Y, et al (2009) Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Appl Environ Microbiol* 75:1508–1516. doi: 10.1128/AEM.02188-08
- Ingerslev HC, von Gersdorff Jørgensen L, Lenz Strube M, et al (2014) The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 424–425:24–34. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.12.032
- Ives AR, Carpenter SR (2007) Stability and diversity of ecosystems concepts of stability. *Science* (80 ) 317:58–63.
- Jaafar RM, Kania PW, Larsen a. H, et al (2013) Gut microbiota changes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during organic acid feed supplementation and *Yersinia ruckeri* infection. *J Fish Dis* 36:599–606. doi: 10.1111/jfd.12047
- Jonsson B, Jonsson N (2014) Early environment influences later performance in fishes. 151–188. doi: 10.1111/jfb.12432
- Justino CIL, Duarte KR, Freitas AC, et al (2016) Trends in analytical chemistry contaminants in aquaculture: overview of analytical techniques for their determination. *Trends Anal Chem* 80:293–310. doi: 10.1016/j.trac.2015.07.014
- Kim D-H, Brunt J, Austin B (2007) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol* 102:1654–1664. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al (2013) Analysis predictive functional



- profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31:814–821. doi: 10.1038/nbt.2676
- Lazzarotto V (2016) Conséquences à long-terme d'une alimentation à base de matières premières végétales sur la régulation du métabolisme énergétique et lipidique chez la truite arc-en-ciel : focus particulier sur les effets trans-générationnels et les stades précoces.
- Leblanc JG, Milani C, Giori GS De, et al (2012) Bacteria as vitamin suppliers to their host : a gut microbiota perspective. 1–9.
- Lee JM, Lee H, Kang S, Park WJ (2016) Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients* 8:1–13. doi: 10.3390/nu8010023
- Li M, Leatherland JF (2013) The implications for aquaculture practice of epigenomic programming of components of the endocrine system of teleostean embryos : lessons learned from mammalian studies. 528–553. doi: 10.1111/j.1467-2979.2012.00486.x
- Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C (2016) The healthy human microbiome. *Genome Med* 8:51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y
- Lluch J, Servant F, Païssé S, Valle C, Valière S, Kuchly C, Vilchez G, Donnadiou C, Courtney M, burcelin R, Amar J, Bouchez O, Lelouvier B (2015) The characterization of novel tissue microbiota using an optimized 16S metagenomic sequencing pipeline. *PLoS One* 10:1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0142334
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac : a new phylogenetic method for comparing microbial communities uniFrac : a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71:8228–8235. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228
- Lyons PP, Turnbull JF, Dawson KA, Crumlish M (2015) Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquac Res* 1–15. doi: 10.1111/are.12863
- Ma J, Coarfa C, Qin X, et al (2014) mtDNA haplogroup and single nucleotide polymorphisms structure human microbiome communities.
- Mcknite AM, Perez-munoz ME, Lu L, et al (2012) Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0039191

- Merrifield DL, Dimitroglou A, Bradley G, et al (2009) Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 32:755–766. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01052.x
- Mignon-grasteau S, Rideau N, Chantry-darmon C (2015) Impact of selection for digestive efficiency on microbiota composition in the chicken. PLoS One 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0135488
- Miyake S, Ngugi DK, Stingl U (2015) Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. Mol Ecol 24:656–672. doi: 10.1111/mec.13050
- Navarrete P, Magne F, Araneda C, et al (2012) PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. PLoS One 7:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0031335
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, et al (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proc Natl Acad Sci U S A 106:15103–15110. doi: 10.1073/pnas.0905235106
- Neis EPJG, Dejong CHC, Rensen SS (2015) The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. nutrient 7:2930–2946. doi: 10.3390/nu7042930
- NRC (2011) National Research Council. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, DC
- Ortiz L, Rebolé A, Velasco S, et al (2013) Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac Nutr 19:475–482. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00981.x
- Ozorio ROA, Kopecka-pilarczyk J, Peixoto MJ, et al (2016) Dietary probiotic supplementation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under cage culture production: effects on growth, fish welfare, flesh quality and intestinal microbiota. Aquac Res 47:2732–2747. doi: 10.1111/are.12724
- Pham D, Ansquer D, Chevalier A, et al (2014) Archimer selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. Aquaculture 432:475–482. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.04.031
- Pinheiro J, Bates D (2000) Mixed-effects models in S and S-PLUS. Statistics and computing series, Springer. New York

- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, et al (2007) Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 22:510–519. doi: 10.1016/j.fsi.2006.07.002
- Ramos MA, Weber B, Gonçalves JF, et al (2013) Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol Part A* 166:302–307. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.025
- Reveco FE, Overland M, Romarheim OH, Mydland LT (2014) Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 420–421:262–269. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.007
- Ringø E, Zhou Z, Vecino JLG, et al (2016) Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquac Nutr* 22:219–282. doi: 10.1111/anu.12346
- Roehe R, Dewhurst RJ, Duthie C, et al (2016) Rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS Genet* 1–20. doi: 10.1371/journal.pgen.1005846
- Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, et al (2011) Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J* 5:1595–1608. doi: 10.1038/ismej.2011.38
- Round JL, Mazmanian SK (2009) The gut microbiota shapes intestinal and disease. *9:313–324*. doi: 10.1038/nri2515
- Schippa S, Conte MP (2014) Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *nutrient* 6:5786–5805. doi: 10.3390/nu6125786
- Schloss PD, Westcott SL (2011) Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 77:3219–3226. doi: 10.1128/AEM.02810-10
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. doi:

10.1128/AEM.01541-09

- Servin AL, Coconnier M-H (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:741–754. doi: 10.1016/S1521-6918(03)00052-0
- Shapira M (2016) Gut microbiotas and host evolution : scaling up symbiosis. *Trends Ecol Evol* 31:539–549. doi: 10.1016/j.tree.2016.03.006
- Smith GW, Constable PD, Haschek WM (1996) Cardiovascular responses to short-term fumonisin exposure in swine. *Fundam Appl Toxicol* 33:140–148. doi: 10.1006/faat.1996.0151
- Sokal R, Rohlf F (1981) *Biometry* WH Freeman and Company. San Francisco
- Stirling G, Wilsey B (2001) Empirical relationships between species richness, evenness , and proportional diversity.
- Sugita H, Miyajima C (1991) The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquac Eng* 92:267–276.
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, et al (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol Ecol* 21:3363–3378. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x
- Tome D (2009) Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines 1 – 3. *Am J Clin Nutr* 90:814–821. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462S.814S
- Toole PW, Jeffery IB (2015) Gut microbiota and aging. *Aging (Albany NY)* 350:1214–1215.
- Tsuchiya C, Sakata T, Sugita H (2008) Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett Appl Microbiol* 46:43–48. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x
- Turchini G, Ng W-K, Tocher D (2010) *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*, CRC Press.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484. doi: 10.1038/nature07540
- Vaikunthanathan T, Safinia N, Lombardi G, Lechler RI (2016) Microbiota, immunity and the liver. *Immunol Lett* 171:36–49. doi: 10.1016/j.imlet.2016.01.008
- Vasquez J, Gonzales M, Murado MA (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245:149–161. doi:

10.1016/j.aquaculture.2004.12.008

- Vernocchi P, Chierico F Del, Putignani L (2016) Gut microbiota profiling : metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01144
- Vigors S, Doherty JVO, Kelly AK, Shea CJO (2016) The effect of divergence in feed efficiency on the intestinal microbiota and the intestinal immune response in both unchallenged and lipopolysaccharide challenged ileal and colonic explants. *PLoS One* 11:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0148145
- Wang J, Qi J, Zhao H, et al (2013) Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential. 1–10. doi: 10.1038/srep01843
- Wong S, Waldrop T, Summerfelt S, et al (2013) Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. *Appl Environ Microbiol* 79:4974–4984. doi: 10.1128/AEM.00924-13
- Worm B, Duffy JE (2003) Biodiversity, productivity and stability in real food webs. *Trends Ecol Evol* 18:20–21. doi: 10.1016/j.tree.2003.09.003
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, et al (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12:635–645. doi: 10.1038/nrmicro3330

# Appendix

**Table S1.** Results of the Generalized least square models (GLS) testing the effect on lines, treatments and their interaction on the proportion of the most abundant phyla. Proportions were arcsine-transformed prior to the analysis. The degree of freedom (df), F-ratio (F) and its associated p-values (P) are given.

<b>Phyla or classes (Proteobacteria)</b>	<b>Variables</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Gammaproteobacteria	diet	1,47	7.6033	<b>0.008271</b>
	line	2,47	0.8741	0.423915
	diet x line	2,47	0.8724	0.424620
Alphaproteobacteria	diet	1,47	2.6648	0.109274
	line	2,47	1.1142	0.336683
	diet x line	2,47	6.5098	<b>0.003195</b>
Betaproteobacteria	diet	1,47	2.0766	0.156202
	line	2,47	0.4526	0.638728
	diet x line	2,47	7.1725	<b>0.001912</b>
Deltaproteobacteria	diet	1,47	2.5933	0.11402
	line	2,47	0.9910	0.37882
	diet x line	2,47	4.4114	<b>0.01755</b>
Actinobacteria	diet	1,47	1.0118	0.319625
	line	2,47	1.1309	0.331359
	diet x line	2,47	7.3325	<b>0.001692</b>
Bacteroidetes	diet	1,47	1.3130	0.2576
	line	2,47	1.3764	0.2625
	diet x line	2,47	2.6890	0.0784
Firmicutes	diet	1,47	0.8452	0.3626
	line	2,47	0.8631	0.4284
	diet x line	2,47	0.1355	0.8737
Fusobacteria	diet	1,47	4.4563	<b>0.04012</b>
	line	2,47	1.8284	0.17191
	diet x line	2,47	1.6268	0.20743
Tenericutes	diet	1,47	0.0548	0.816
	line	2,47	3.2369	<b>0.048</b>
	diet x line	2,47	10.7644	<b>&lt;0.001</b>

**Table S2.** Results of the Generalized least square models (GLS) testing the effect on lines, treatment and their interaction on the OTU and phylogenetic diversity (alpha diversity metrics). The degree of freedom (df), F-ratio (F) and its associated p-values (P) are given. Significant results are marked in bold.

	<b>Index</b>	<b>Variables</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
OTU	Richness	diet	1,47	1.9288	0.1714
		line	2,47	1.3012	0.2818
		diet x line	2,47	1.7818	0.1795
	Evenness	diet	1,47	19.010	<b>0.0001</b>
		line	2,47	2.509	0.0922
		diet x line	2,47	1.624	0.2080
Phylogenetic	Richness	diet	1,47	0.6744	0.4157
		line	2,47	1.2502	0.2958
		diet x line	2,47	1.3509	0.2689
	Variability	diet	1,47	4.04	0.0501
		line	2,47	0.33	0.7189
		diet x line	2,47	0.50	0.6102
	Evenness	diet	1,47	0.000	0.9859
		line	2,47	0.924	0.4040
		diet x line	2,47	0.445	0.6432



**Table S3.** Average  $\beta$  diversity values between pairs of experimental conditions.

<b><math>\beta</math> diversity indices</b>			<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>PB</b>	<b>PB</b>
<b><math>\beta_{total}</math></b>			A22h	AB1h	R23h	A22h	AB1h
	MA	AB1h	0.71				
	MA	R23h	0.72	0.69			
	PB	A22h	0.73	0.70	0.71		
	PB	AB1h	0.69	0.68	0.69	0.68	
	PB	R23h	0.76	0.76	0.75	0.75	0.72
<b><math>\beta_{repl}</math></b>			A22h	AB1h	R23h	A22h	AB1h
	MA	AB1h	0.33				
	MA	R23h	0.36	0.36			
	PB	A22h	0.37	0.41	0.39		
	PB	AB1h	0.36	0.33	0.36	0.37	
	PB	R23h	0.39	0.37	0.38	0.38	0.37
<b><math>\beta_{rich}</math></b>			A22	AB1	R23	A22	AB1
	MA	AB1h	0.38				
	MA	R23h	0.36	0.33			
	PB	A22h	0.36	0.29	0.31		
	PB	AB1h	0.33	0.36	0.33	0.32	
	PB	R23h	0.36	0.38	0.37	0.37	0.35
<b>UniFrac<sub>total</sub></b>			A22h	AB1h	R23h	A22h	AB1h
	MA	AB1h	0.49				
	MA	R23h	0.49	0.46			
	PB	A22h	0.50	0.42	0.45		
	PB	AB1h	0.46	0.47	0.47	0.45	
	PB	R23h	0.53	0.53	0.53	0.52	0.51
<b>UniFrac<sub>repl</sub></b>			A22h	AB1h	R23h	A22h	AB1h
	MA	AB1h	0.08				
	MA	R23h	0.09	0.09			
	PB	A22h	0.10	0.10	0.10		
	PB	AB1h	0.10	0.08	0.10	0.10	
	PB	R23h	0.13	0.10	0.12	0.11	0.11
<b>UniFrac<sub>rich</sub></b>			A22h	AB1h	R23h	A22h	AB1h
	MA	AB1h	0.42				
	MA	R23h	0.40	0.37			
	PB	A22h	0.41	0.33	0.35		
	PB	AB1h	0.37	0.40	0.37	0.36	
	PB	R23h	0.41	0.43	0.41	0.42	0.39

**Table S4.** Results of the *post-hoc* tests performed for significant effects in PERMANOVAs involving more than two levels (all  $\beta$  measurement). Significant results are marked in bold.

Effects						
$\beta_{\text{total}}$	Interaction	MA/A22h	MA/AB1h	MA/R23h	PB/A22h	PB/AB1h
	MA/AB1h	0.104				
	MA/R23h	0.126	0.830			
	PB/A22h	<b>0.001</b>	<b>0.027</b>	0.070		
	PB/AB1h	0.210	<b>0.023</b>	0.062	<b>0.020</b>	
	PB/R23h	<b>0.026</b>	<b>0.018</b>	0.073	<b>0.013</b>	<b>0.046</b>

$\beta_{\text{repl}}$	Lines	A22h	AB1h
	AB1h	0.228	
	R23h	0.070	<b>0.011</b>

$\beta_{\text{rich}}$	Interaction	MA/A22h	MA/AB1h	MA/R23h	PB/A22h	PB/AB1h
	MA/AB1h	0.274				
	MA/R23h	0.408	0.810			
	PB/A22h	<b>0.004</b>	0.475	0.123		
	PB/AB1h	0.792	0.441	0.718	<b>0.015</b>	
	PB/R23h	1.000	0.446	0.776	<b>0.015</b>	0.932

UniFrac <sub>total</sub>	Interaction	MA/A22h	MA/AB1h	MA/R23h	PB/A22h	PB/AB1h
	MA/AB1h	0.188				
	MA/R23h	0.250	0.760			
	PB/A22h	<b>0.007</b>	0.150	0.102		
	PB/AB1h	0.565	0.127	0.186	<b>0.013</b>	
	PB/R23h	0.207	0.175	0.270	<b>0.010</b>	0.224

UniFrac <sub>repl</sub>	Interaction	MA/A22h	MA/AB1h	MA/R23h	PB/A22h	PB/AB1h
	MA/AB1h	0.613				
	MA/R23h	0.221	0.759			
	PB/A22h	0.669	0.062	0.107		
	PB/AB1h	0.139	<b>0.034</b>	<b>0.001</b>	0.219	
	PB/R23h	<b>0.008</b>	0.068	0.055	0.074	<b>0.005</b>

UniFrac <sub>rich</sub>	Interaction	MA/A22h	MA/AB1h	MA/R23h	PB/A22h	PB/AB1h
	MA/AB1h	0.225				
	MA/R23h	0.397	0.826			
	PB/A22h	<b>0.007</b>	0.406	0.128		
	PB/AB1h	0.749	0.354	0.614	<b>0.016</b>	
	PB/R23h	0.976	0.340	0.616	<b>0.008</b>	0.832

**Table S5.** Results of the PerMANOVA testing the effect of lines, treatment and their interactions on the  $\beta$  diversity calculated between pairs of samples for Firmicutes only. The degree of freedom (df), F-ratio (F),  $R^2$  and p-values (P) are given. Significant results are marked in bold.

	<b>Variables</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
$\beta_{\text{total}}$	diet	1,47	4.7294	0.08203	<b>0.001</b>
	line	2,47	0.9547	0.03312	0.495
	diet:line	2,47	2.0090	0.06969	<b>0.007</b>
$\beta_{\text{repl}}$	diet	1,47	8.3834	0.14452	<b>0.001</b>
	line	2,47	0.6235	0.02150	0.759
	diet:line	2,47	0.6886	0.02374	0.720
UniFrac <sub>total</sub>	diet	1,47	4.5772	0.07736	<b>0.001</b>
	line	2,47	0.8865	0.02997	0.565
	diet:line	2,47	2.9081	0.09830	<b>0.006</b>
UniFrac <sub>repl</sub>	diet	1,47	10.4845	0.17299	<b>0.001</b>
	line	2,47	0.1808	0.00597	0.852
	diet:line	2,47	1.3800	0.04554	0.299

**Table S6.** Results of the PerMANOVA testing the effect of lines, treatment and their interactions on the  $\beta$  diversity calculated between pairs of samples for  $\beta$ aproteobacteria only. The degree of freedom (df), F-ratio (F),  $R^2$  and p-values (P) are given. Significant results are marked in bold.

	<b>Variables</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
$\beta_{\text{total}}$	diet	1,47	1.3259	0.02353	0.157
	line	2,47	1.4344	0.05092	<b>0.038</b>
	diet:line	2,47	2.5721	0.09131	<b>0.001</b>
$\beta_{\text{repl}}$	diet	1,47	0.6997	0.01153	0.657
	line	2,47	1.1101	0.03660	0.421
	diet:line	2,47	5.3697	0.17704	<b>0.001</b>
UniFrac <sub>total</sub>	diet	1,47	1.5768	0.02728	0.128
	Line	2,47	1.3811	0.04779	0.151
	diet:line	2,47	3.2287	0.11173	<b>0.001</b>
UniFrac <sub>repl</sub>	diet	1,47	0.8419	0.01171	0.493
	line	2,47	0.8020	0.02230	0.508
	diet:line	2,47	11.2366	0.31248	<b>0.001</b>

**Table S7.** Results of the analysis of multivariate homogeneity of variance (PERMDISP) performed on  $\beta$  diversity measurement and the functional Bray-Curtis distance matrix between experimental conditions. Degree of freedom (df), the F-ratio and its associated P-values are given.

<b><math>\beta</math> diversity indices</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
$\beta_{\text{total}}$	5,47	1.399	0.242
$\beta_{\text{repl}}$	5,47	2.207	0.069
$\beta_{\text{rich}}$	5,47	0.595	0.704
UniFrac <sub>total</sub>	5,47	1.103	0.372
UniFrac <sub>repl</sub>	5,47	1.619	0.174
UniFrac <sub>rich</sub>	5,47	0.526	0.755
Functional Bray-Curtis distance	5,47	3.63	0.007



**8 ARTICLE 5: IMPACT OF PLANT-BASED DIET ON THE GROWTH, FEED  
UTILIZATION AND DIGESTIVE CAPACITIES OF DIFFERENT ISOGENIC LINES OF  
RAINBOW TROUT**



## Préambule – Etude “Nutrigénomique”

Alors que la substitution partielle de l’huile et de la farine de poissons par des huiles et farines d’origine végétale, non conjointement, à hauteur de 100 et 90 % respectivement (Turchini et al. 2010), est tolérée par les truites en matière de croissance, leur substitution quasi-totale entraîne une forte mortalité, ainsi qu’une réduction de la croissance. Pourtant la pression imposée par les quotas sur les captures de pêche minotière et l’augmentation de la demande en poissons destinés à la consommation humaine, contraint le secteur de l’aquaculture à alimenter les poissons carnivores avec des aliments dont les taux de substitution en farine et huile de poissons par des matières premières essentiellement d’origine végétale sont de plus en plus importants. L’impact de ces aliments végétaux sur les capacités digestives des truites peut contribuer à leur mauvaise réponse. Il est donc judicieux d’identifier des marqueurs digestifs potentiellement impliqués dans la sensibilité des truites aux végétaux. Etant donné qu’une variabilité génétique est impliquée dans la capacité des truites à s’adapter aux végétaux, il a été décidé de décrire la réponse de leur système digestif à une alimentation de type végétal chez trois lignées isogéniques qui divergent sur leur tolérance à cette alimentation en matière de croissance. Deux aliments ont été délivrés jusqu’à satiété aux truites depuis leur premier repas: un aliment de type marin « M » formulé avec de l’huile de poissons et riche en farine de poissons, à contrario d’un aliment « PB » dont la totalité de la farine et de l’huile est d’origine végétale. Etant donné la baisse d’ingestion observée chez les truites nourries avec l’aliment de type végétal, il a été choisi de mettre en place des lots de truites nourries avec une troisième condition alimentaire « Mr » qui consiste à distribuer l’aliment M en quantité restreinte, cette quantité étant similaire à la quantité d’aliments ingérés par les truites nourries avec l’aliment « PB ». Cet aliment marin restreint ayant pour but de différencier les réponses de la truite dues à une baisse d’ingestion, des réponses dues au changement de composition de l’aliment.

Les performances de survie et de croissance ont été évaluées durant environ 6 mois après l’éclosion des truites des trois lignées isogéniques et leurs performances de prise alimentaire et d’utilisation alimentaire (coefficient d’efficacité alimentaire, composition des carcasses, et bilan d’utilisation des protéines et de l’énergie) ont été mesurées sur les 52 derniers jours de l’élevage expérimental. La réponse du système digestif a été évaluée chez l’alevin de 30 jours et chez le juvénile de 6 mois et concerne la capacité digestive de l’estomac, de l’intestin et du pancréas exocrine. Le stade alevin est étudié car c’est un stade critique en



élevage, surtout chez des truites recevant un aliment très riche en végétaux (forte mortalité et décrochage de la croissance observés dès le stade alevin). Le stade juvénile a également été observé, étant donné qu'il correspond au stade le plus long avant l'abattage des truites et que c'est à ce moment qu'elles reçoivent les aliments les plus riches en végétaux. La réponse du système digestif aux différents régimes a été évaluée sur ses capacités digestives : la transcription des principales enzymes impliquées dans la digestion des nutriments du bol alimentaire (pepsinogène, trypsinogène, chymotrypsinogène, phospholipase, maltase, aminopeptidase-N, prolidase), et dans l'homéostasie intestinale (intestinale alcaline phosphatase), des principaux transporteurs de nutriments (PepT1, SGLT1, GLUT2, MTP), et d'une neuro-hormone régulatrice de la motricité intestinale (CCK-t) a été évaluée chez les différentes lignées aux stades alevins et juvéniles. Étant donné que les enzymes digestives sont souvent soumises à des régulations post-transcriptionnelles, les activités enzymatiques de certaines enzymes ont également été mesurées chez les juvéniles ( $\alpha$ -amylase, trypsine, aminopeptidase-N, maltase, phospholipase, intestinale alcaline phosphatase). Parallèlement à l'étude des capacités digestives au stade juvénile, les concentrations plasmatiques en métabolites (glucose, acides aminés totaux, triglycérides) ont été mesurées. Finalement, la digestibilité des composants alimentaires des aliments M et PB a été mesurée chez les trois lignées isogéniques à la suite de l'essai de croissance.

Le manuscrit présenté est une première version d'un projet d'article. Des compléments d'analyses seront apportés ce qui devrait conduire à des remaniements de structure et d'écriture. Il sera également soumis à la relecture des différents co-auteurs avant sa soumission à une revue scientifique spécialisée.

# Impact of plant-based diet on the growth, feed utilization and digestive capacities of different isogenic lines of rainbow trout

Borey M<sup>1</sup>, Geurden I<sup>1</sup>, Médale F<sup>1</sup>, Quillet E<sup>3</sup>, Dupont-Nivet M<sup>3</sup>, Callet T<sup>3</sup>, Aguirre P<sup>1</sup>, Véron V<sup>1</sup>, Surget A<sup>1</sup>, Plagnes-Juan E<sup>1</sup>, Cluzeaud M<sup>1</sup>, Herman A<sup>1</sup>, Labbe L<sup>4</sup>, Kerneis T<sup>4</sup>, Terrier F<sup>1</sup>, Lauga B<sup>2</sup>, Burel C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INRA, UMR1419 NuMea Nutrition Métabolisme Aquaculture, F64310 Saint Pee sur Nivelles, France

<sup>2</sup>EEM, UMR 5254 IPREM, Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, F64013 Pau, France

<sup>3</sup>INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup>INRA, UE937 PEIMA, F-29450 Sizun, France

\*Corresponding author: Christine Burel

E-mail address [cburel@st-pee.inra.fr](mailto:cburel@st-pee.inra.fr); Tel +335 59 51 59 77; fax: +335 59 54 51 52.

## Introduction

In a cohort of a given animal species, the variability of individual physiological response to certain environmental stress factors or modifications is the result of the cohort genetic variability. Correlations between some specific quantitative trait loci (QTL) or single nucleotide polymorphism (SNP) and certain behavioural traits have effectively been observed in mammals and fish. For instance, the level of plasmatic cortisol response to a stress factor is partially under QTL control in rainbow trout (Quillet et al. 2014), while in humans plasmatic triglyceride response to dietary omega 3 fatty acid supplementation can be explained by some specific SNP (Vallée Marcotte et al. 2016). Farmed fish are susceptible to be exposed to different stress factors ranging from high density rearing, poor water quality, transient oxygen shortage or radical dietary shift. It has been mainly reported that fish meal substitution with plant based (PB) diet did not equally disturb individuals in salmonids (Lazzarotto et al. 2015). This intriguing growth dispersal has been explained by the existence of genetic variability for growth, and was subsequently investigated through genotype-diet interaction research in rainbow trout (Palti et al. 2006; Pierce et al. 2008). Elucidate the biological mechanisms that could explain the better ability of this carnivorous

fish to cope with plant-based diets is crucial to preserve endangered marine resources, and especially the stocks of wild small fish, ensuring nevertheless

Carnivorous fish feeding producers are forced to incorporate a wide range of meals and oils of plant origin in the new feed formulations, ensuring nevertheless that the final feed meets the nutrients requirements of farmed fish (NRC 2011). However, high substitution levels of fish meal and fish oil with products of plant origin impair growth performance and protein digestibility in carnivorous fish, including rainbow trout (Santigosa et al. 2008; Santigosa et al. 2011b; Hua and Bureau 2012), while their effects on lipid digestibility seems more controversial (Reyes et al. 2015). A decrease of intestinal digestive and absorptive capacities under vegetable feeding is suspected to partly explain this growth delay (Nordrum et al. 2000; Ducasse-Cabanot et al. 2007; Kamalam et al. 2013). In addition, PB diets lead generally to considerable mortality in rainbow trout fry, just after the yolk sac resorption (Gu et al. 2014; Lazzarotto et al. 2015). These early deaths occur while gastric tissues differentiate and grow, intestine matures, and pancreatic nodules began to secrete digestive enzymes. Consequently, it was proposed that an impaired intestinal maturity could affect digestive capacities for proteins and starch (Cahu et Infante, 1994). Moreover, the use of vegetable oil instead of fish oil, even in the case of a dietary supplementation with soy lecithin, causes reduced phospholipid content in the feed. A phospholipid deficiency leads to intestinal steatosis and reduces the intestinal lipid absorption in rainbow trout fry (Daprà et al. 2011), and thus can contribute to the reduced growth of fry fed PB diets. The deleterious impact of PB diets on growth performance, protein digestibility (Santigosa et al. 2011b), intestinal inflammation, bile secretion and feed efficiency (Glencross et al. 2006) goes on in rainbow trout at the juvenile stage, which support the difficulty of trout to accommodate with vegetable even after a long term PB feeding.

In this context, there is a necessity of implementing fish-selective programs with indicators that steer toward the identification of individuals highly tolerant to PB diet. It is one of the strategies adopted to maintain aquaculture production of carnivorous fish while preserving wild resources (Le Boucher et al, 2012). Isogenic lines constitute a good experimental model (Ihssen et al. 1990; Komen and Thorgaard 2007) to implement selective programs and to seek the genetic determinism, mechanisms and pathways that could contribute to the trout's ability to maintain sufficient growth under a PB diet.

In the present study, we took advantage of the availability of such genetic material in rainbow trout (Quillet et al, 2007) to investigate the genetic variability of isogenic lines of rainbow trout for growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, and digestive

and absorptive capacities. Three isogenic lines (A22h, AB1h and R23h) were compared when fed a fully-PB diet devoid of fish meal and fish oil or a marine (M) diet at the opposite rich in fish meal and fish oil, in a 6-months long term study, starting from the trout's first meal (mouth opening) up to the juvenile stage. We have chosen to perform a total substitution of both fish meal and fish oil with meals and lipids from plant origin in the PB diet which makes possible to investigate the phenotypic response of carnivorous fish in a context of dietary stress (Dupont-Nivet et al., 2009). Moreover, the presence even in few proportion of fish meal or fish oil, may blur some important effects of vegetables as previously showed by Santigosa et al. (2008). Gene expression and the activity of gastrointestinal enzymes and nutrient transporters are widely studied to evaluate in the context of the evolution of the aqua feed formulations; their variations are monitored, aiming to confirm that a fish can fully maintain its gastrointestinal capacities and efficiently digest and absorb a diet containing unusual ingredients (Santigosa et al. 2008; Ostaszewska et al. 2010a). Therefore, the digestive capacities of the isogenic lines of trout confronted with a PB diet versus a M diet will be assessed by the measure of dietary components digestibility, plasma metabolites levels as they originate in part from digestive feed processing, and the gene expression and activity of a panel proteins acting in the GIT functioning (enzymes, nutrient transporters...).

## **Materials and Methods**

### ***Ethics Statement***

The study was conducted in strict compliance with the guiding principles for the use and care of laboratory animals and in compliance with French and European regulations on animal welfare (Decree No. 2001–464 of 29 May 2001 and Directive 2010/63/EU, respectively).

### ***Fish and experimental facilities***

Three experimental families of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) previously characterized for their divergent ability to cope with PB diets (A22h, AB1h and R23h) were used for this experiment. These were obtained by crossing parents from the homozygous isogenic trout lines established at INRA (Quillet et al, 2007). To summarize, lines were obtained after two generations of gynogenesis and further maintained by within-line pair mating. To produce the experimental families, eggs from a single maternal homozygous line were collected and separated into three batches, each fertilized by one male from three other lines. Therefore, fish were expected to share the same heterozygous genotype

(isogenic) within each family. The use of a single maternal line aimed at minimizing between-family sources of variation due to maternal effects associated with egg size and hatching time, so that the differences between families were due only to the paternal genetic origin. All individuals within one line were therefore expected to share the same genotype.

After hatching (Day 0), the fry were placed in incubators. At day 17, prior the first feeding, the fry were randomly distributed in 27 tanks (340 fish per tank as average). Tanks were supplied with spring water (11.4°C as average; water flow rate for one renewal per hour) in a flow through rearing system. The volume of water in the tanks was gradually increased from 0.08 to 0.2 m<sup>3</sup> in relation with the increased size of the fish. The rearing was conducted under artificial light with a fixed photoperiod (light from 8:00 am to 8:00 pm).

### ***Feeding and rearing conditions***

The three lines of trout were fed from the mouth opening (Day 17) two different diets: M (6 groups of fish) and PB (3 groups of fish). The basis of the marine (M) diet was rich in fish meal (FM) and contained only fish oil (FO). At the opposite, the plant based (PB) diet was formulated with a blend of plant ingredients and vegetal oils (Table 1). Diets were formulated in order to meet the nutritional requirements of rainbow trout (NRC 2011). Synthetic L-lysine, L-methionine, CaHPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O and soy lecithin were added to the PB diet to correct any deficiency in essential amino acids, phosphorous and phospholipid. The two diets were formulated also to be as iso-nitrogenous, iso-lipidic, and iso-energetic as possible. However, although the measured lipid contents were similar, the gross protein and energetic contents levels were lower in the M diet compared to what measured in the PB diet. All diets were manufactured at the Donzacq INRA facility (France) using a twin-screw extruder (Clextral). Different batches of diets were prepared all along the experiment with increasing pellet size (granulometry) in order to well match with the increasing fish size.

**Table 1.** Ingredient composition and nutrient composition of the experimental diets

Ingredients (% as fed basis)	M	PB
Norwegian herring meal (CP 70; Sopropêche, France)	65	
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	21	4
Corn gluten meal (CP 60; Inzo, France)		17
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)		17
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)		12
White lupin meal (Terrena, France)		5
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France) Pois lysamine		12.5
Féverole (CP)		10
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	11	
Rapeseed oil (Daudruy, France)		6
Linseed oil (Daudruy, France)		3.6
Palm oil (Daudruy, France)		2.4
Soy lecithin (Louis François, France)		2
L-lysine (Eurolysine)		0.5
L-methionine (Evonik, Germany)		0.5
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18 %P; 22 % Ca)		3
Attractant mix <sup>a</sup>		1.5
Mineral premix <sup>b</sup>	1.5	1.5
Vitamin premix <sup>c</sup>	1.5	1.5
<b>Measured nutrients composition <sup>d</sup></b>		
Dry matter (DM, % diet)	97.7	97.0
Protein (% DM)	50.2	51.2
Fat (% DM)	18.5	18.7
Energy (kJ/g DM)	22.6	23.6
Ash (% DM)	12.7	6.48
Starch (% DM)	15.3	9.56

DM: dry matter

<sup>a</sup> Attractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g

<sup>b</sup> Mineral premix (g or mg kg<sup>-1</sup> diet): calcium carbonate (40 % Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60 % Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75 % I), 0.4 mg; zinc sulphate (36 % Zn), 0.4 g; copper sulphate (25 % Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33 % Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20 % Ca, 18 %P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30 % Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA)

<sup>c</sup> Vitamin premix (IU or mg kg<sup>-1</sup> diet): DL- $\alpha$  tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1,000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA)

<sup>d</sup> average of the different batches of manufactured diets.

From Day 17 to Day 48, the M and the PB diets were gradually distributed to fish over 8 hours of the lighting period using a conveyor belt up. Pellets were given in excess in order to feed the fish to satiety. But PB diets are known to reduce feed intake and thus we have decided to separate the impact on fish of the quantitative factor “amount of feed ingested” from the qualitative factor “nature of the diet”. As consequence, from Day 49 and up to the end of the experiment, the M diet was either distributed to satiety, or was quantitatively restrained on the basis of the quantity that the PB fed fish ate at satiety. Thus, there were 3 feeding conditions (3 tanks per condition): Ms as trout fed the M diet to satiety, Mr as trout fed the M diet restrained, PBs as trout fed the PB diet to satiety.

Fish mortality and morbidity were recorded daily and growth performance was evaluated by the weighing of the fish biomass of each tank at Days 42, 49, 63, 77, 91, 112, 126, 140, and 164. At Day 112, the fish density was equalized to 130 trout per tanks, and over the period from Day 112 to Day 164, unconsumed pellets were daily recovered and quantified to measure feed intake. Knowledge of feed intake allowed to determining feed efficiency and nutrients retention and utilization.

### ***Samplings***

At Day 49, a first sampling (S1) was realized on trout fry, 30 days after their first feeding and a few days after the final development of their stomach glands (Sarieyyüpoğlu, 2000). Fish were fed as usual and the sampling was performed 8 hours after the meal. The whole individuals (9 per condition, i.e. 3 per tank) were taken from the tanks, killed by anaesthetic overdose (eugenol from Caryophylli aetheroleum) (Lebreton 2012), their head and tail were removed, and the remaining body was immediately frozen into liquid nitrogen and then kept at -80°C until analysis for intestinal genes expression.

Over Days 164 and 165, a second round of sampling (S2) was performed on trout juveniles. Trout were fed a morning meal these two days. Individuals (9 per condition, i.e. 3 per tank) were taken from the tanks at different times and killed the same way than at Day 49.

Blood samples were taken at Day 164, 8 and 16 hours after the meal, then at Day 165, 8 hours also after the meal. Blood was removed from caudal vein into heparinized syringes and was rapidly centrifuged (3000 g, 5 min); Recovered plasma was then frozen and kept at -20 °C until analysis of the plasma metabolites.

At Day 164, 8 hours after the morning meal, the GIT was sampled in order to study its digestive and absorptive capacity. The pyloric portion of the stomach, the whole intestine and the pyloric caeca were removed. The pyloric caeca was taken because pancreatic

nodules (exocrine cells) are spread in its mesenteric tissue and it is a major site of the exocrine pancreas enzymes synthesis in rainbow trout (Sahlmann et al. 2015). For molecular analysis, the pyloric stomach and intestine were opened lengthwise in order to remove the remaining digested feed. Both were then rinsed in three successive baths of physiological salt solution (NaCl 0.9 ‰) and the scrubbed mucosa was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis. For enzymatic activity analysis, the intestinal segment was sampled without removing the remaining feed, in order to measure the activity of enzymes present both on the intestinal epithelium and in the intestinal lumen (pancreatic enzymes secreted in the light of the intestine). Pyloric caeca were sampled without any emptying of its containing digesta.

Thirty and twenty trout per tanks were sampled at Day 112 and Day 164, respectively, pooled per tank and kept at -20°C until analysis for the determination of the whole body composition in nutrients and energy.

### ***Digestibility measurements***

After the end of the growth trials and fish samplings, the remaining trout of each experimental group were transferred to the INRA experimental facilities dedicated to the feed digestibility measurements (Saint Pee-sur-Nivelle, France). Trout were randomly allotted into 18 experimental units of 25 fish each. Units were cylindro-conical fibreglass tanks (each 60 L) connected to a re-circulation system with a flow rate of 4 L/min. The water was well aerated and thermostatically maintained at 17.0 ± 0.5°C. The three isogenic lines (A22h, AB1h and R23h) were fed the M or the PB diet in triplicate groups. An inert marker, chromic oxide (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), has been incorporated into the diets at the level of 1%.

The fish were allowed to adapt to the rearing conditions for 3 weeks, after which collection of faeces was performed by the method of Choubert et al. (1982). The faeces were collected on a daily basis for a period of 2 weeks and stored at -20°C. The faeces collected over 2 weeks from each tank were pooled, freeze-dried and used for further nutriment (dry matter, protein, lipids, starch, ash, phosphorus) and energy analysis. The apparent digestibility coefficients (ADC %) of dry matter and nutrients (or energy) was calculated as follows:

$$\text{ADC (\%)} = 100 - \left( 100 \times \frac{\text{Cr2O3 diet}}{\text{Cr2O3 faeces}} \times \frac{\text{nutriment faeces}}{\text{nutriment diet}} \right)$$



## ***Analytical methods***

### **Chemical analysis of ingredients, diets, faeces and whole bodies**

Whole fish bodies and faeces were crushed, homogenized and freeze-dried before composition analyses. Analyses of diets, and freeze-dried faeces and whole-body samples were made following the usual procedures: dry matter was determined after drying at 105°C for 24 hours; ash content by combustion at 550°C for 12 hours; protein (N x 6.25) by the Kjeldahl method (Kjeltec apparatus, auto 1030 analyser) after acid digestion; gross energy in an adiabatic bomb calorimeter (IKA C4000); fat after extraction with petroleum ether by Soxhlet method (semi-automatic extraction System Soxtec II); total phosphorus by spectrophotometric analysis of the phosphovanadomolybdate complex after mineralization and acid digestion (ISO/DIS 6491 method); starch by a "Megazyme" enzymatic method (AOAC method 996.11 No); chromic oxide by the method of Bolin et al. (1952).

### **Plasma metabolites analyses**

Glucose, triglyceride, and total amino acid circulating levels were measured on plasma using commercial kits: the Glucose RTU kit from bioMm bioM (Marcy larcy le, France), the PAP 150 kit, from bioM150 ki, France), and the Wako NEFA-HR(2) kit (method ACS-ACOD) from Sobioda (Montbonnot, France), respectively.

### **Enzymatic activity analysis**

Anterior intestinal segments were grinded in 7 volumes of ice-cold buffer (Tris 2mM, Mannitol 50mM, from SIGMA) at pH 7 with an Ultra Thurrax until complete homogenisation. Homogenates were then centrifuged at 4°C for 10 minutes at 1000g, supernatant was aliquoted and stored at -80°C until later activity measures of intestinal luminal (trypsin, phospholipase A2,  $\alpha$ -amylase) and cytosolic digestive (leucine alanine peptidase) enzymes. In order to break enterocyte membrane, calcium chloride was added to the remaining homogenate (CaCl<sub>2</sub> from SIGMA, 10mM final concentration) and was centrifuged at 4°C during 20 minutes at 35000g. Pellet containing brush borders were dissolved in 250 $\mu$ L of a solubilizing buffer (KCl 0.1M, DTT 1mM, HEPES 5mM, from SIGMA, pH 7.5), and were kept at -80°C until later enzymatic measure (intestinal alkaline phosphatase, maltase, aminopeptidase-N). Pyloric caeca were homogenized following the preceding procedure, but only until the first centrifugation at 4°C and 1000g for 10 minutes. Enzymatic activities were measured in duplicate. **Maltase** (EC 3.3.1.20) activity from brush borders was measured at RT following variation of absorbance of p-Nitrophenol (PNPG) at 400nm during 15 minutes. Briefly, 20 $\mu$ L of appropriate dilution of brush border extraction were blended with 220 $\mu$ L of PNPG (PNPG 25mM, DTT 1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 67mM, pH 6.8) before optical measure following Worthington procedure adapted from Dahlqvist (1984) Methods of enzymatic analysis. **Trypsin** (EC 3.4.21.4) activity was measured following variation of absorbance of p-Nitroaniline at 407nm at 30°C during 5 minutes. Briefly, 10 $\mu$ L of appropriate dilution of intestinal and caeca pyloric extracts were blended with 200 $\mu$ L of L-Benzoylarginine Nitroanilide diluted in dimethylsulfoxide (L-BAPNA 1.5mM, Tris 100mM, CaCl<sub>2</sub> 20mM, DMSO 1:134, v/v, pH 7.9), and submitted to optical measure (Holm et al. 1988).  **$\alpha$ -Amylase** (EC 3.2.1.1) activity was assayed measuring 3,5-Dinitrosalicylic acid coloration at 540nm revealing starch hydrolysis into maltose following SIGMA procedure adapted from Bernfeld (1995) Methods in enzymology. **Aminopeptidase N** (Amnp, EC 3.4.11.2) activity from brush borders was measured following the protocol from Maroux (1973), cytosolic **Leucine alanine peptidase** (Leu-Ala, EC 3.4.11) from (Kotzamanis et al. 2007), **Intestinal Alkaline Phosphatase** (IAP, EC 3.1.3.1) from the commercial kit (Enzyline ref 63609 bioMerieux), and **secreted Phospholipase A2** (sPLA<sub>2</sub>, EC 3.1.1.4) from the commercial kit (EnzChek®, ref 102017, ThermoFisher). Enzyme activities were expressed per mg of soluble protein. Protein concentrations were measured in triplicate according to Bradford (Bradford 1976), using a protein assay kit (Bio Rad, München, Germany) with bovine serum albumin as a standard.

### **Gene expression analysis by quantitative PCR**

Total RNA were extracted from the scrubbed mucosa of the pyloric stomach, the pyloric caeca, and from the whole intestine using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations (n=6 for each condition). Concentration (ng/ $\mu$ L) and purity (A260 nm/A280 nm) of the isolated RNA were measured using a NanoDrop, and the integrity of the RNA extracted was evaluated by agarose gel electrophoresis. Total RNA (1 $\mu$ g) was then used for the reverse transcription to obtain cDNA using the SuperScriptIII RNaseH-reverse transcriptase kit (Invitrogen) and random primers (Promega, Charbonni res, France) according to the manufacturers' protocols.

Relative gene expression of mRNA was then determined by quantitative real-time PCR using the Roche Lightcycler 480 system (Roche Diagnostics, Neuilly- sur-Seine, France). The assays were performed using a reaction mix of 6  $\mu$ L per sample, each of which contained 2  $\mu$ L diluted cDNA template, 0.12  $\mu$ L of each primer (400 nM), 3  $\mu$ L LightCycler 480 SYBER Green I Master mix and 0.76  $\mu$ L DNase/RNase-free water (5 Prime GmbH, Hamburg, Germany). The PCR protocol was initiated at 95°C for 10 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start Taq polymerase activation, followed by 45 cycles of a two-steps amplification programme (15s at 95°C; 40s at 60°C). Melting curves were systematically monitored (temperature gradient ranging from 65 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the production of a single product. Each PCR assay included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification) and negative controls (reverse transcriptase- and cDNA template-free samples). The qPCR assay was optimized with a linear standard curve and checked for congruity across replicates. PCR efficiency for each run was estimated based on the slope of the five-point standard curve obtained with serial dilutions of pooled sample cDNA. PCR efficiency ranging from 1.8 to 2.2 was considered to be acceptable. Gene expression data obtained from qPCR were normalized following. EF1 or Mitochondrial 18s ribosomal gene were employed as a reference gene, after ensuring that it was not differentially expressed between the tested conditions (Olsvik et al., 2005). Gene expression data obtain from qPCR were normalized using the mathematical model described by Pfaffl (2001) to obtain relative quantification of each targeted gene.

The transcripts analysed in the stomach were **pepsinogen (PEPS)** for protein luminal digestion and **gastric lipase (GLIP)** for lipid luminal digestion. The transcripts of pre-digestive enzyme analysed in the pyloric caeca were, **phospholipase A G12 (sPL)** for phospholipid hydrolysis, and **trypsinogen (Tryp)** and **chymotrypsinogen (Chymo)** for protein hydrolysis. The transcripts analysed in the intestine were the **peptide transporter 1 (Pept1)** for peptide transport, **Rab8** which is an enzyme that mediates the anterograde trafficking of PEPT1 and of SGLT1 from the cytosol to the intestinal apical membrane (Sato et al. 2007), **aminopeptidase-N (Amnp)**, for membrane bound peptide digestion (Maroux et al. 1973), **prolidase (Prlid)** for enterocyte cytosolic peptide digestion, **maltase** for membrane bound maltose hydrolysis, the basal and luminal **glucose transporters GLUT2** and **sodium-glucose transporteur SGLT1**, the membrane bound **microsomal triglyceride transfer protein (MTP)** and **apolipoprotein (APO)**, **phospholipase A2G12a (sPL)** for luminal phospholipid digestion, **cholecystinin CCKT**, and **intestinal alkaline phosphatase IAP** (legendre) (Table 2). The GLIP, Peps, Prld and sPL primers were designed using the Primer3plus browser (<http://bioinformatics.ni/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) based on the cDNA sequences obtained from the Sigenae (<http://sigenae.org/>), Genoscope trout (<http://genoscope.cns.fr/trout/>) or the Institute for Genome Research (TIGR) genome databases. When it was possible, the primers thus designed were constructed on cDNA sequences that covered two different exons, in order to avoid the amplification of residual DNA from the RNA extraction. Amplicons obtained after PCR were sent for sequencing for validation of each primer. Primers were validated when the sequences obtained matched well with their corresponding cDNA sequence on the ClustalW2 sequence alignment browser (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and when the blast of the sequence obtained on the NCBI database yielded the expected protein.

**Table 2.** Sequence of primers used for qRT-PCR.

Tissue analysed	Genes	Primer sequence (5' – 3')	Database, Accession number
Stomach	Pepsinogen (PEPS)	F: GTTTCGGTGGGAGGCATCT R: TGTTCCGAAAGACACCACA	Sigenae, CX136077.s.om.10
Stomach	Gastric lipase (GLIP)	F: TCAACATGACTCGCACACCT R: TTCATGTCCCGGATGTTGTA	Sigenae, CB492742.s.om.10
Intestine	Peptide Transporter 1 (PEPT1)a	F: CCTGTCAATCAACGCTGGT R: CACTGCCATAATGAACACG	GenBank, EU853718
Intestine	Prolidase (Prld)	F: GCCCATAAAGAGATCATGAAGC R: CGTTGTTCCAGTCCACAG	Genoscope, GSONMT00010279001
Intestine	Aminopeptidase-N (Amnp)	F: TGGAECTTCCTGGTACAGTGC R: CGTACTTGAAGTCAGATGGTGGT	Genoscope, GSONMT00058506001
Intestine	Maltaseb	F: GCAGCAGGAATACCCTACGA R: GGCAGGGTCCAGTATGAAGA	TIGR, TC3451
Intestine	Glucose transporter 2 (GLUT2)	F: GTGGAGAAGGAGGCGCAAGT R: GCCACCGACACCATGGTAAA	GenBank, AF321816
Intestine	Sodium glucose transporter 1 (SGLT1)b	F: TCTGGGGCTGAACATCTACC R: GAAGGCATAACCCATGAGGA	GenBank, AY210436
Intestine	Phospholipase A2G12a (sPL)	F: TGTGTCATGTAGTAAGGAACCTGA R: ATTTGTAACCATCGCTGCATT	Genoscope, GSONMT00024336001
Intestine	Microsomal triglyceride transfer protein (MTP)	F: CTCACTGACCACTCCAGGT R: ATGGCTCCCTTGTGTTGAC	GenBank, BX860503
Intestine	Intestinal alkaline Phosphatase (IAP)	F: TCGATGTGATTATGGGAGGA R: GGCTCAAACAGACCCAAAAT	Sigenae, CA371918.s.om.10
Intestine	Cholecystokinin (CCKT)	F: AGACATACTCACTCCTCTCCTT R: CTGGCTCTGCTGTTCACT	Sigenae, AJ012055.s.om.10
Intestine	Rab8	F: GCCATGGGCATCATGTTAGT R: CGCTAACTTTCCCTCTGTC	Sigenae, BX308086.s.om.10
Pylorique Caeca	Trypsinogen (Tryp)	F: CCATGTGTACCGTCTCCTGGA R: CACCCTGGCAAGAGTCCTT	Sigenae, CA368365.s.om.10
Pylorique Caeca	Chymotrypsinogen (Chymo)	F: GCCCTGGCAGATCTCTCTC R: GACGGTCATGATCTGCTCCT	Sigenae, BX073638.s.om.10

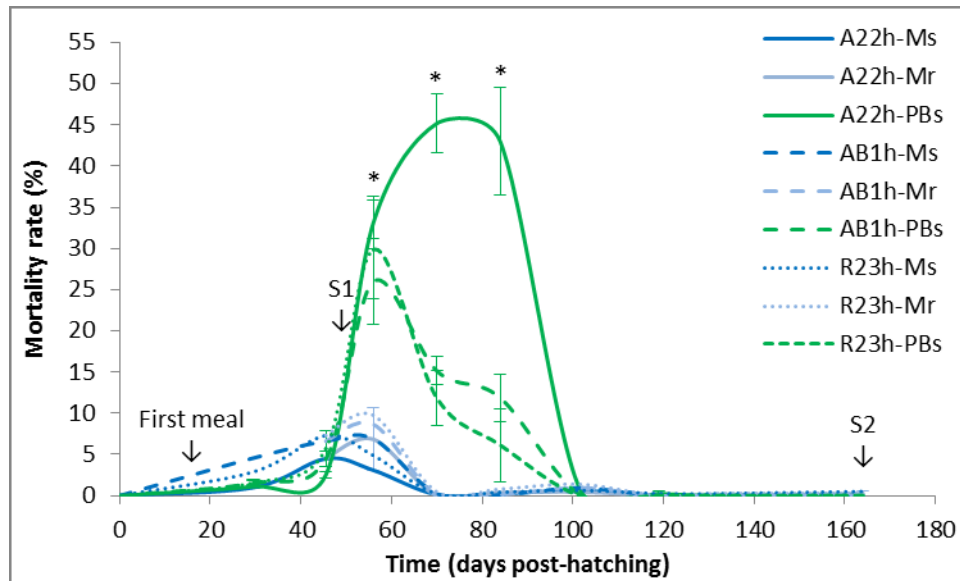
### ***Statistical analysis***

Statistical analyses on fish performance, whole body composition, nutrient balance, plasma metabolite levels, gene expression and enzymatic activities were performed using R.2.14.0. Data were submitted to one-way ANOVA to determine if there was significant difference between the different experimental treatments. Data were first tested for normality and homogeneity of variances by Shapiro–Wilk and Leven tests, respectively. When the normality and the homogeneity of variance were significant, post hoc comparisons were made using the parametric Newman–Keuls tests, while the nonparametric Mann–Whitney–Wilcoxon test ( $p < 0.05$ ) was used when at least one of the assumptions did not passed. A two-way ANOVA was also performed to test separately the effects of the line and feeding factors ( $p < 0.05$ ) and to determine whether an interaction existed between them. Pearson's correlation coefficients ( $r_s$ ,  $P < 0.05$ ) were also used to determine the relationships between certain variables.

## **Results**

### ***Mortality rate***

The mortality rate was recorded over the whole duration of the experiment (Figure 1) and a strong peak of mortality has been observed between Day 49 and Day 91 for the three isogenic lines fed the PB diet. Between Day 49 and Day 63, the mortality rate was similarly high for the three isogenic lines fed the PB diet (significant diet effect, but no significant line effect) (Table 3), but between Day 63 and Day 91, the intensity of the mortality rate was decreasing for the AB1h and R23h lines fed the PB diet, while it was still very high for the A22h line fed the PB diet. There was a significant diet effect, but also a line effect, A22h being the more sensible. When fed the M diet, the evolution of the mortality rate remained similar whatever the trout's line and the feeding ration (fed to satiety or rationed).



**Figure 1.** Evolution over time of the mortality rate of the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions. Mortality rate was calculated for each period as followed: “Number of dead fish / Number of live fish at the beginning of the period) x 100”. The stars (\*) indicate significant differences between the experimental treatments for a given date (see Table 3). S1: date of the first sampling; S2: date of the second sampling.

**Table 3.** Statistical data about the evolution of the mortality rate of the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions.

Time	Treatment effect <sup>1</sup>	Line effect <sup>2</sup>	Feeding effect <sup>2</sup>	L x F <sup>2</sup>
D17-D42 <sup>3</sup>	0.290	0.265	0.160	0.427
D42-D49 <sup>3</sup>	0.352	0.326	0.250	0.989
D49-D63 <sup>4</sup>	<0.001	0.943	P<0.001 Ms=Mr<PBs	0.602
D63-D77 <sup>4</sup>	0.006	P<0.001 R23h=AB1h<A22h	P<0.001 Mr=Ms<PBs	P<0.001
D77-D91 <sup>4</sup>	0.042	P<0.001 R23h=AB1h<A22h	P<0.001 Mr=Ms<PBs	P<0.001
D91-D112 <sup>4</sup>	0.491	0.989	0.258	0.346
D112-D126 <sup>4</sup>	0.507	0.615	0.615	0.326
D126-D140 <sup>4</sup>	0.507	0.164	0.615	0.736
D140-D164 <sup>4</sup>	0.197	0.125	0.288	0.294

<sup>1</sup> Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (no parametric)

<sup>2</sup> Two ways ANOVA

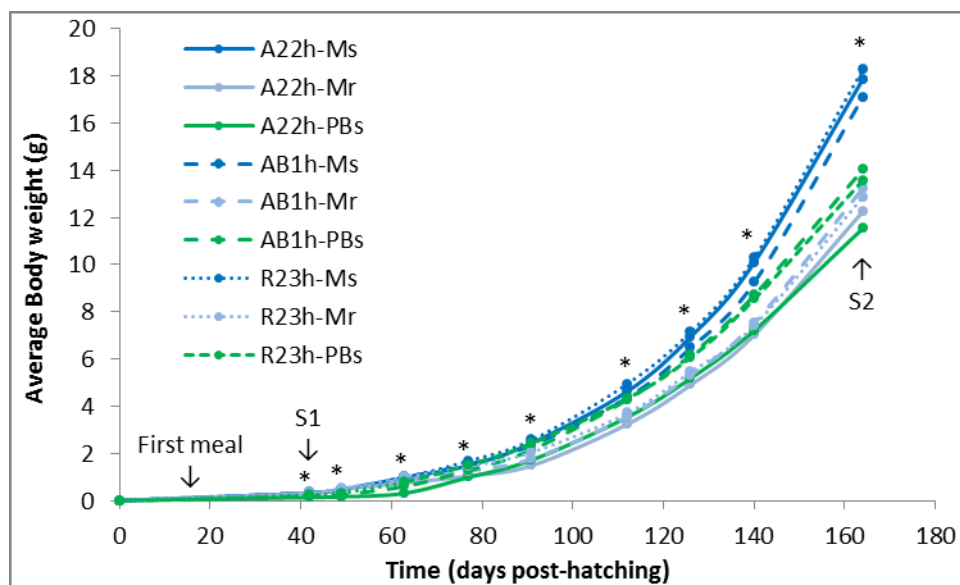
<sup>3</sup> no MR condition: 3 groups fed the PB diet and 6 groups fed the M diet, all up to satiety. N=3 or 6.

<sup>4</sup> After D49, 3 groups out of the 6 fed the M diet start to be rationed at the level of the PB diet intake. N=3.

## Fish performance

The three trout's lines diverged strongly in their response in terms of growth performance according to the feeding conditions (Figure 2), as demonstrated by the very high interaction between the feeding and line effects (Table 4). The strongest variability concerns their ability to maintain similar growth under the PB diet, but they reacted also differently under the Ms and Mr feeding. The differences were already significant at the first fish weighing (Day 42), i.e. 25 days after the first meal (Table 4), and were maintained throughout the experiment.

The A22h line was significantly more affected by the PBs feeding. The R23h line was the line which succeeded to maintain the best growth rate at the beginning of the experiment but from Day 63 the line AB1h succeeded to reach the R23h performance. There was also a line effect within Ms feeding, even if the differential is lower: at the beginning of the experiment A22h and AB1h obtained similar growth that was inferior to the R23h performance, while from Day 91, the A22h line succeeded to reach the performance of the R23h line, but not the AB1h line. The Mr feeding started at Day 49 and a strong growth slow-down was observed. Finally, by the end of the experiment, the AB1h trout succeeded to reach the body weight of the R23h trout by a better growth rate.



**Figure 2.** Evolution over time of the average body weight of the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions. The stars (\*) indicate significant differences between the experimental treatments for a given date (see Table 1). S1: date of the first sampling; S2: date of the second sampling.



**Table 4.** Statistical data about the evolution of the average body weight of the three isogenic lines of trout receiving the three different feeding types.

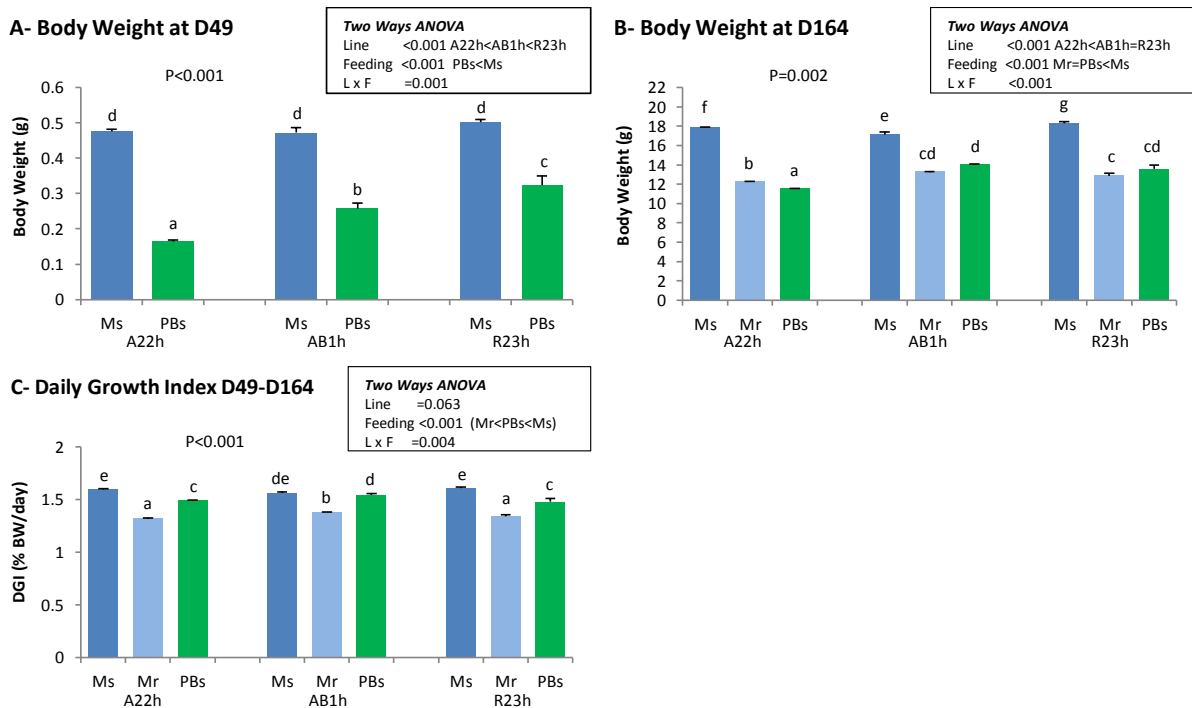
Time	Treatment effect <sup>1</sup>	Line effect <sup>2</sup>	Line effect <sup>2</sup> within M	Line effect <sup>2</sup> within MR	Line effect <sup>2</sup> within PB	Feeding effect <sup>2</sup>	L x F <sup>2</sup>
<b>D42</b> <sup>3</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h=AB1h=R23h		P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 PBs<Ms	P<0.001
<b>D49</b> <sup>3</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h≤AB1h≤R23h		P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 PBs<Ms	P=0.001
<b>D63</b> <sup>4</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h=AB1h=R23h	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 PBs<Mr<Ms	P<0.001
<b>D77</b> <sup>4</sup>	0.002	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h=AB1h<R23h	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 Mr=PBs<Ms	P<0.001
<b>D91</b> <sup>4</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 AB1h≤A22h≤R23h	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 Mr<PBs<Ms	P<0.001
<b>D112</b> <sup>4</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 AB1h≤A22h≤R23h	P<0.001 A22h≤AB1h≤R23h	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 Mr<PBs<Ms	P=0.004
<b>D126</b> <sup>4</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h<R23h	P<0.001 AB1h<A22h=R23h	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 A22h<R23h=AB1hh	P<0.001 Mr<PBs<Ms	P<0.001
<b>D140</b> <sup>4</sup>	P<0.001	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 AB1h<A22h=R23h	P<0.001 A22h≤R23h≤AB1h	P<0.001 A22h<R23h=AB1h	P<0.001 Mr<PBs<Ms	P<0.001
<b>D164</b> <sup>4</sup>	0.002	P<0.001 A22h<AB1h=R23h	P<0.001 AB1h<A22h=R23h	P<0.001 A22h<R23h=AB1h	P<0.001 A22h<R23h=AB1hh	P<0.001 Mr<PBs<Ms	P<0.001

<sup>1</sup> One way ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (no parametric)

<sup>2</sup> Two ways ANOVA

<sup>3</sup> no MR condition: 3 groups fed the PB diet and 6 groups fed the M diet, all up to satiety. N=3 or 6.

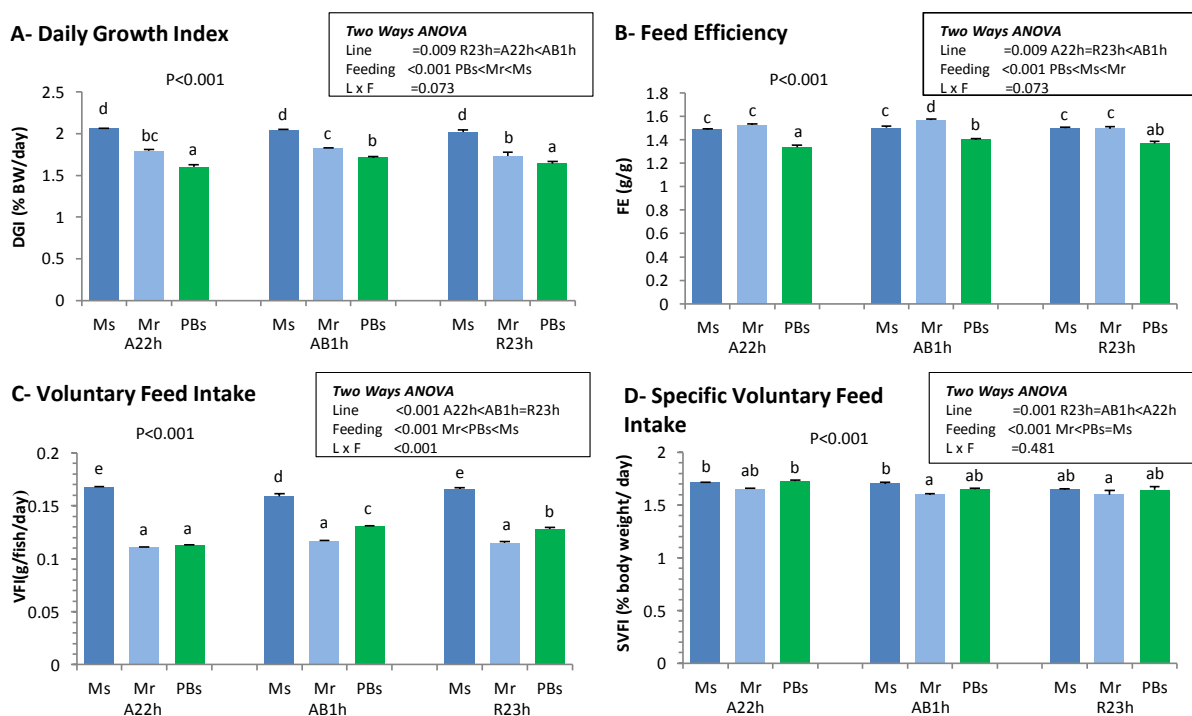
<sup>4</sup> After D49, 3 groups out of the 6 fed the M diet start to be rationed at the level of the PB diet intake. N=3.



**Figure 3.** Average body weight of the three isogenic lines of trout subjected to the different feeding conditions at (A) Day 49, date of first sampling and at (B) Day 164, date of the second sampling. Daily growth index (C) calculated over the period D49 and D164. Daily growth index =  $100 \times (BW(164)^{0.333} - BW(49)^{0.333}) / \text{duration}$ . Means (n=3) without common superscript letters are significantly different (P<0.05). Vertical bars show the standard error of the mean (SEM).

The figure 3 shows the average body weight of the trout at the two sampling dates dedicated for the study of the GIT functioning: at D49 (Figure 3A) on trout fry and at D164 (Figure 3B), at the end of the experiment, on trout juveniles. The differential between the impacts of the two diets on fish growth performance was very clear at Day 49, while at Day 164, results showed that there was also significant differences between the three isogenic lines fed the M diet to satiety (Ms), AB1h showing the lowest results while R23h the highest. In addition, at that date, the impact of the Mr and PBs feeding conditions differed according to the line: the average body weight of the A22h line subjected to the PBs condition was lower than when subjected to the Mr condition, while no significant difference was observed between the Mr and the PBs conditions in terms of body weight for the AB1h and R23h lines. The daily growth index (Figure 3C) calculated over this period show a feeding effect, the best growth rate being obtained with the Mr feeding condition and the lowest with the Mr feeding condition. The trout fed the PB diet expressed an intermediary growth rate. The Mr

trout came from the initial Ms group at Day 49, because at that date this condition was split in two feeding conditions: Ms and Mr. The rationing induced a drastic drop of the growth rate of these trout. There was no significant line effect, but an interaction between the feeding and the line effect. In fact, the impact of the feeding condition on the growth rate of the trout was different according to the trout line: when trout were fed the M diet to satiety (Ms), they expressed a similar growth rate whatever the line, but when they were fed the PB diet to satiety, the AB1h line had the higher growth rate (but still inferior to that obtained with the Ms feeding condition), compared to that of the A22h and R23h lines which expressed a similar lower growth rate. The same pattern was observed when trout were rationed with the M diet, the AB1h line expressed also the higher growth rate.



**Figure 4.** Data on the performance from day 112 to day 164 of the three isogenic lines of rainbow trout (A22h, AB1h, R23h) subjected to the three feeding conditions (Ms, Mr, PBs).

IBW: Initial Body Weight; FBW: Final Body Weight

(A) Daily growth index =  $100 \times (\text{FBW}^{0.333} - \text{IBW}^{0.333}) / \text{duration}$ .

(B) Feed Efficiency = wet weight gain (g)/dry feed intake (g)

(C) Voluntary Feed Intake = dry feed intake (g)/number of fish/duration.

(D) Specific Voluntary Feed Intake =  $100 \times \text{dry feed intake (g)} / ((\text{IBW} + \text{FBW}) / 2) \times \text{duration}$ .

For each parameter, means (n=3) without common superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Vertical bars show the standard error of the mean (SEM).

The feed intake was recorded from Day 112 to Day 164, allowing also the study of the feeding performance (Figure 4) on the trout juveniles over this period. First of all, the trout's daily growth indexes (Figure 4-A) calculated for this period confirmed that there was a line effect with the A22h and the R23h lines expressing the lowest growth performance, but also a feeding effect with the lowest performance observed with the PB diet. During this late period, the trout subjected to the Mr feeding condition had a growth rate higher than that obtained with the PB diet. However, there was no more interaction between the feeding and the line effects. The PB diet was clearly less consumed than the M diet when the feed intake is expressed as amount of feed consumed per fish (Figure 4C), and especially in the case of the A22h line (interaction between the feeding and line effects). However, over this period, when the feed intake expression take into account the fish size (relative feed intake, Figure 4D) there was no more significant difference between the intake of the M diet or PB diet. The lower growth rate observed in these trout juveniles fed the PB diet was more related to a lower feed efficiency (Figure 4B) than to a lower feed intake during that late period. In fact, the Daily growth index measured over this period was correlated to feed efficiency ( $r_s = 0.64$ ,  $P < 0.001$ ) but not to the specific voluntary feed intake ( $r_s = 0.25$ ,  $P > 0.05$ ).

The objective of the rationing of the M diet (Mr) was to obtain a similar feed intake to that of trout fed the PB diet to satiety. This objective was almost reached even if the amount of ingested feed was even a little bit lower in the case of the AB1h and R23h lines. The feed efficiency of the M diet rationed was similar to that of the M diet distributed to satiety and higher than that of the PB diet.

### ***Whole body composition***

The whole body composition of the trout was affected by the feeding conditions for all components and whatever the date of sampling (Day 112 or Day 164) (Table 5). The content in water, protein and ash was lower in the trout fed the PB diet, while the content in lipid and energy was higher in this trout compared to those fed the M diet (Mr or Ms).

A line effect was observed only for the whole body content in ash at Days 112 and 164 and energy at Day 112. The A22h line presented the highest ash content whatever the date of sampling, while the hierarchy was varying concerning R23h and AB1h lines. At Day 112, the ash content was lower in trout fed the PB diet compared to that of trout fed the M diet (Ms

or Mr), but especially for the R23h and AB1h lines. With the M diet, the A22h line were distinguished by a higher ash content under the Mr feeding condition compared to the Ms. At Day 164, a similar pattern was observed, except that there was an interaction between the line and the feeding effects: the ash content did not significantly varying when the trout were fed the M diet (Ms or Mr) whatever the line, while under the PB diet, the ash content was lower compared to those of trout fed the M diet, especially in the case of the R23h and AB1h lines. Concerning the whole body energetic content, the line effect observed at Day 112 determined the R23h as the line having the lowest value, especially when fed the PB diet.

**Table 5.** Average whole body composition (n=3) of the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions at Day 112 and Day 164.

Treatments	Humidity (%)		Proteins (% DM)		Lipids (% DM)		Ash (% DM)		Energy (%DM)	
	Day 112	Day 164	Day 112	Day 164	Day 112	Day 164	Day 112	Day 164	Day 112	Day 164
<b>A22h-Ms</b>	74.1 ±0.0 ab	72.2 ±0.2 b	53.7 ±0.3 a	53.4 ±0.5 ab	28.5 ±0.5 c	28.3 ±0.5 b	7.8 ±0.0 b	8.3 ±0.1 cd	25.1 ±0.3 a	26.0 ±0.0 b
<b>A22h-Mr</b>	75.5 ±0.4 b	73.4 ±0.2 cd	56.9 ±0.5 c	55.6 ±0.3 cd	22.2 ±1.2 a	27.5 ±0.7 ab	8.2 ±0.1 c	8.4 ±0.1 cd	24.8 ±0.1 a	26.4 ±0.3 b
<b>A22h-PB</b>	75.1 ±0.3 ab	71.3 ±0.1 a	53.5 ±0.4 a	52.1 ±0.3 a	28.7 ±0.3 c	31.7 ±0.5 c	7.5 ±0.0 b	7.0 ±0.1 b	26.7 ±0.0 b	27.6 ±0.1 b
<b>AB1h-Ms</b>	75.1 ±0.1 b	72.8 ±0.3 bc	55.2 ±0.4 bc	54.3 ±0.5 bc	28.0 ±0.5 bc	27.5 ±0.3 ab	7.6 ±0.1 b	8.3 ±0.1 cd	25.6 ±0.3 a	26.0 ±0.2 b
<b>AB1h-Mr</b>	75.6 ±0.1 b	73.8 ±0.3 d	56.2 ±0.1 b	56.0 ±0.2 d	25.3 ±0.6 b	26.0 ±0.7 a	7.6 ±0.0 b	8.5 ±0.1 d	25.1 ±0.2 a	25.5 ±0.1 a
<b>AB1h-PB</b>	73.3 ±0.9 a	71.4 ±0.2 a	52.6 ±0.1 a	52.6 ±0.0 a	29.4 ±0.3 c	32.3 ±0.1 c	6.8 ±0.1 a	6.6 ±0.1 a	26.6 ±0.3 b	27.3 ±0.1 b
<b>R23h-Ms</b>	75.8 ±0.3 b	72.9 ±0.2 bc	54.3 ±0.8 ab	54.9 ±0.6 cd	27.7 ±0.6 bc	27.7 ±0.4 ab	7.6 ±0.2 b	8.1 ±0.1 c	25.0 ±0.5 a	26.2 ±0.2 b
<b>R23h-Mr</b>	75.1 ±0.2 b	73.3 ±0.1 cd	56.0 ±0.5 bc	55.2 ±0.2 c	26.4 ±0.8 bc	26.7 ±0.3 ab	7.8 ±0.2 b	8.3 ±0.1 cd	24.4 ±0.2 a	26.7 ±0.4 b
<b>R23h-PB</b>	73.9 ±0.3 a	71.3 ±0.1 a	54.1 ±0.8 ab	52.5 ±0.1 a	27.4 ±0.8 bc	31.5 ±0.2 c	7.0 ±0.1 a	6.4 ±0.1 a	25.6 ±0.6 a	27.3 ±0.3 b
<b>ANOVA</b>										
<b>P value</b>	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.025	0.007
<b>Line effect</b>	0.530	0.08	0.963	0.129	0.166	0.242	<0.001	0.002	0.025	0.055
	-	-	-	-	-	-	<i>AB1h=R23h&lt;A22h</i>	<i>R23h&lt;AB1h =A22h</i>	<i>R23h≤A22h ≤AB1h</i>	-
<b>Feeding effect</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	<i>PBs&lt;Ms&lt;Mr</i>	<i>PBs&lt;Ms&lt;Mr</i>	<i>PBs&lt;Ms&lt;Mr</i>	<i>PBs&lt;Ms&lt;Mr</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>	<i>PBs&lt;Ms=Mr</i>	<i>PBs&lt;Ms&lt;Mr</i>	<i>Mr=Ms&lt;PBs</i>	<i>Ms=Mr&lt;PBs</i>
<b>L x F</b>	0.018	0.286	0.08	0.123	0.005	0.230	0.380	0.022	0.630	0.089

For each parameter, means without common superscript letters are significantly different (P<0.05).

### **Digestibility of the dietary components**

There was a feeding effect on the digestibility of all the diet components (Table 6). Globally, protein digestibility was significantly higher in trout fed the PB diet, while the digestibility of lipid, starch total minerals, phosphorus and energy was lower in these trouts. There was a line effect also for all feed components, excepted for total minerals, with a lower digestibility in the R23h line. The digestibility of protein, starch, and energy was similarly higher in the A22h and AB1h lines. The digestibility of lipid was higher in the AB1h line and that of phosphorus was higher in the A22h line. There were interactions between the feeding and the line effects for the digestibility of lipid, starch, phosphorus and energy. The lines differences in lipid digestion were observed only for the M diet. Concerning the starch digestibility, the differential between the lines was stronger with the PB diet. The digestibility of phosphorus was equally higher whatever the diet in the A22h line, equally lower in the R23 line, while it was high with the M diet and lower with the PB diet in the AB1 line. The digestibility of energy was similarly high in the A22h and AB1h lines fed the M diet compared to when they were fed the PB diet, while it was similarly lower in the R23h line whatever the diet.

**Table 6.** Apparent digestibility coefficients (ADC) of the dietary components of the M and the PB diets in the three isogenic lines.

Treatments	Protein	Lipid	Starch	Minerals*	Phosphorus	Energy
<b>A22h-M</b>	91.6 ±0.1 a	96.4 ±0.0 c	99.4 ±0.0 e	44.4 ±0.3 b	47.0 ±0.4 b	91.9 ±0.1 b
<b>A22h-PB</b>	97.2 ±0.1 b	93.8 ±0.0 a	96.6 ±0.0 c	33.4 ±0.2 a	46.9 ±0.4 b	89.8 ±0.4 a
<b>AB1h-M</b>	91.4 ±0.2 a	97.2 ±0.1 d	99.5 ±0.0 f	45.4 ±0.6 b	47.7 ±0.2 b	92.1±0.1 b
<b>AB1h-PB</b>	97.1 ±0.0 b	94.0 ±0.0 a	95.7 ±0.3 b	33.0 ±0.5 a	44.9 ±0.2 a	89.1 ±0.1 a
<b>R23h-M</b>	90.5 ±0.2 a	95.2 ±0.4 b	98.9 ±0.0 d	45.0 ±0.2 b	45.6 ±0.1 a	90.2 ±0.5 a
<b>R23h-PB</b>	96.8 ±0.3 b	93.5 ±0.2 a	92.8 ±0.4 a	33.2 ±0.5 a	45.1 ±0.3 a	89.1 ±0.3 a
<b>Group effect</b>	0.01	0.006	0.005	0.02	<0.001	<0.001
<b>Line effect</b>	0.002	<0.001	<0.001	0.873	<0.001	0.005
	<i>R23h&lt;AB1h=A22h</i>	<i>R23h&lt;A22h&lt;AB1h</i>	<i>R23h&lt;AB1h=A22</i>	-	<i>R23h&lt;AB1h&lt;A22h</i>	<i>R23h&lt;AB1h=A22h</i>
<b>Feeding effect</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	<i>M&lt;PB</i>	<i>PB&lt;M</i>	<i>PB&lt;M</i>	<i>PB&lt;M</i>	<i>PB&lt;M</i>	<i>PB&lt;M</i>
<b>L x F</b>	0.151	0.008	<0.001	0.600	0.002	0.044

\* evaluated from the ash content of the diet and faeces.

For each parameter, means (± SEM, n=3) without common superscript letters are significantly different (P<0.05).

### Protein and Energy balance

The balance of the dietary proteins and that of the dietary energy calculated over the period from Day 112 to Day 164, and using the ADC values (see Table 6) measured on the same trout following the growth study are shown in Table 7 and Table 8, respectively. There was a feeding effect on the retention coefficient of protein and energy but no line effect was observed. The PBs feeding condition was distinguished from the two other conditions by a lower retention of the dietary proteins but a higher retention of energy whatever the trout lines.

**Table 7.** Protein utilization balance in the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions measured between Day 112 and Day 164.

Treatments	Retention <sup>1</sup>	Intake <sup>2</sup>	Gain <sup>3</sup>	Total losses <sup>4</sup>	Digestive losses <sup>5</sup>	Metabolic losses <sup>6</sup>
<b>A22h-Ms</b>	46.1 ±1.1 b	7.44 ±0.01 bc	3.43 ±0.09 b	4.02 ±0.08 bc	0.63 ±0.00 c	3.39 ±0.08 b
<b>A22h-Mr</b>	46.6 ±0.5 bc	7.18 ±0.04 ab	3.35 ±0.05 ab	3.84 ±0.02 abc	0.60 ±0.00 b	3.23 ±0.02 ab
<b>A22h-PB</b>	41.8 ±0.7 a	7.58 ±0.04 c	3.17 ±0.06 ab	4.41 ±0.04 d	0.21 ±0.00 a	4.20 ±0.04 d
<b>AB1h-Ms</b>	45.7 ±0.7 bc	7.41 ±0.07 bc	3.38 ±0.05 b	4.03 ±0.07 bc	0.64 ±0.01 c	3.39 ±0.07 b
<b>AB1h-Mr</b>	47.5 ±0.3 c	6.94 ±0.05 a	3.30 ±0.04 ab	3.65 ±0.01 a	0.60 ±0.00 b	3.05 ±0.01 a
<b>AB1h-PB</b>	43.4 ±0.4 ab	7.25 ±0.04 abc	3.15 ±0.02 ab	4.10 ±0.05 c	0.21 ±0.00 a	3.89 ±0.05 c
<b>R23h-Ms</b>	46.4 ±0.7 bc	7.20 ±0.03 ab	3.34 ±0.07 ab	3.85 ±0.04 abc	0.68 ±0.00 e	3.17 ±0.04 ab
<b>R23h-Mr</b>	46.3 ±0.7 bc	6.95 ±0.17 a	3.22 ±0.08 ab	3.74 ±0.11 ab	0.66 ±0.02 d	3.08 ±0.10 a
<b>R23h-PB</b>	42.7 ±1.0 a	7.22 ±0.15 ab	3.08 ±0.06 a	4.14 ±0.14 c	0.23 ±0.00 a	3.91 ±0.14 c
<b>ANOVA</b>	<0.001	0.012	0.008	<0.001	0.002	<0.001
<b>Line effect</b>	0.493	0.002	0.137	0.017	<0.001	0.004
	-	<i>R23h=AB1h&lt;A22h</i>	-	<i>R23h=AB1h&lt;A22h</i>	<i>A22h=AB1h&lt;R23h</i>	<i>R23h=AB1h&lt;A22h</i>
<b>Feeding effect</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	<i>PBs&lt;Ms=Mr</i>	<i>Mr&lt;Ms=PBs</i>	<i>PBs&lt;Mr=Ms</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>	<i>PBs&lt;Mr&lt;Ms</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>
<b>L x F</b>	0.548	0.429	0.993	0.223	0.009	0.230

<sup>1</sup> Retention coefficient (%) = (Fish biomass Day 164 x Nutrient whole body content Day 164 %) – (Fish biomass Day 112 x Nutrient whole body content Day 112 %) / (Amount of feed distributed between Day 112 and Day 164 x Dietary nutrient concentration %).

<sup>2</sup> Intake (g/kg fish biomass/day) = (Amount of feed distributed between Day 112 and Day 164 x Dietary nutrient concentration %) / ((Fish biomass Day 112 + Fish biomass Day 164) / 2) / Number of days.

<sup>3</sup> Gain (g/kg fish biomass/day) = (Nutrient whole body content Day 164 % - Nutrient whole body content Day 112 %) / ((Fish biomass Day 112 + Fish biomass Day 164) / 2) / Number of days.

<sup>4</sup> Total losses (g/kg fish biomass/day) = Intake – Gain.

<sup>5</sup> Digestive losses (g/kg fish biomass/day) = (Intake x ADC nutrient %) – Gain; See Table 6 for ADC values.

<sup>6</sup> Metabolic losses (g/kg fish biomass/day) = Total losses – Digestive losses.

For each parameter, means (± SEM, n=3) without common superscript letters are significantly different (P<0.05).



The more detailed study of the protein utilization balance (Table 7) shows that the protein intake was higher with the PBs and Ms feeding conditions, and especially in the case of the A22h line (line effect). The body protein gain was lower with the PB diet whatever the line. The total losses of protein were higher with the PBs feeding condition, especially in the A22h line, and it was related to higher metabolic losses. Indeed, the digestive protein losses were lower in the PBs trout compared to the Ms and Mr trout, especially for the A22h and AB1 lines.

The protein intake of the rationed trout (Mr) was lower to that of the trout fed to satiety (Ms) ( $P < 0.001$ ) in the A22h and AB1h lines, but their retention and the body gain were similar whatever the level of the feed ration and whatever the line. In fact the digestive losses of dietary proteins were significantly lower in the rationed trout compared to those fed the M diet to satiety but only in the case of the AB1h line ( $P < 0.001$ ).

For a similar ration level, the protein intake was nevertheless higher in the case of the PB diet compared to that of the M diet (Mr) ( $P = 0.006$ ) in the A22h line, in relation with the higher protein content of the PB diet compared to the M diet (51.2% vs. 50.2%). But the retention of the protein from the PB diet was lower than that of the protein from the M diet (Mr) ( $P < 0.001$ ), excepted for the R23h line, in relation with higher digestive losses ( $P < 0.001$ ), even in the case of the R23 line, because the metabolic losses were not significantly different between the PB and the M diet when distributed at a similar ration level and whatever the line.

**Table 8.** Energy utilization balance in the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions measured between Day 112 and Day 164. Values (means  $\pm$  SEM; n=3) are expressed as kJ/kg of fish/day.

Treatments	Retention <sup>1</sup>	Intake <sup>2</sup>	Gain <sup>3</sup>	Total losses <sup>4</sup>	Digestive losses <sup>5</sup>	Metabolic losses <sup>6</sup>
<b>A22h-Ms</b>	66.3 $\pm$ 1.0 a	3.36 $\pm$ 0.01 b	1.69 $\pm$ 0.02	1.66 $\pm$ 0.02 bc	0.27 $\pm$ 0.00 b	1.39 $\pm$ 0.02 b
<b>A22h-Mr</b>	66.9 $\pm$ 1.8 a	3.24 $\pm$ 0.02 a	1.63 $\pm$ 0.05	1.61 $\pm$ 0.04 ab	0.26 $\pm$ 0.00 b	1.35 $\pm$ 0.04 b
<b>A22h-PB</b>	72.8 $\pm$ 2.3 b	3.50 $\pm$ 0.02 b	1.72 $\pm$ 0.03	1.78 $\pm$ 0.02 c	0.36 $\pm$ 0.00 d	1.42 $\pm$ 0.02 b
<b>AB1h-Ms</b>	62.8 $\pm$ 1.5 a	3.34 $\pm$ 0.03 b	1.64 $\pm$ 0.03	1.70 $\pm$ 0.03 bc	0.27 $\pm$ 0.00 b	1.44 $\pm$ 0.03 b
<b>AB1h-Mr</b>	60.5 $\pm$ 2.0 a	3.13 $\pm$ 0.02 a	1.52 $\pm$ 0.02	1.62 $\pm$ 0.01 ab	0.25 $\pm$ 0.00 a	1.37 $\pm$ 0.01 b
<b>AB1h-PB</b>	75.8 $\pm$ 0.8 b	3.35 $\pm$ 0.02 b	1.65 $\pm$ 0.01	1.69 $\pm$ 0.02 bc	0.36 $\pm$ 0.00 d	1.33 $\pm$ 0.02 b
<b>R23h-Ms</b>	63.4 $\pm$ 2.7 a	3.24 $\pm$ 0.01 a	1.61 $\pm$ 0.04	1.63 $\pm$ 0.03 ab	0.32 $\pm$ 0.00 c	1.32 $\pm$ 0.03 ab
<b>R23h-Mr</b>	61.2 $\pm$ 1.6 a	3.14 $\pm$ 0.07 a	1.61 $\pm$ 0.07	1.53 $\pm$ 0.02 a	0.31 $\pm$ 0.01 c	1.22 $\pm$ 0.02 a
<b>R23h-PB</b>	74.9 $\pm$ 1.4 b	3.33 $\pm$ 0.07 b	1.66 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.04 bc	0.36 $\pm$ 0.01 d	1.31 $\pm$ 0.04 ab
<b>ANOVA</b>	<0.001	0.007	0.065	0.001	0.002	0.001
<b>Line effect</b>	0.224	0.002	0.057	0.016	<0.001	<0.001
	-	<i>R23h=AB1h&lt;A22h</i>	-	<i>R23h&lt;AB1h=A22h</i>	<i>AB1h&lt;A22h=R23h</i>	<i>R23h&lt;AB1h=A22h</i>
		<i>h</i>		<i>h</i>	<i>h</i>	<i>h</i>
<b>Feeding effect</b>	<0.001	<0.001	0.026	<0.001	<0.001	0.021
	<i>Mr=Ms&lt;PBs</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>	<i>Mr&lt;Ms=PBs</i>	<i>Mr&lt;Ms&lt;PBs</i>	<i>Mr&lt;PBs&lt;Ms</i>
<b>L x F</b>	0.120	0.419	0.591	0.311	<0.001	0.120

<sup>1</sup> expressed as %, <sup>2, 3, 4, 5, 6</sup> expressed as kJ/kg fish biomass/day; see table 7 for calculations.

For each parameter, means ( $\pm$  SEM, n=3) without common superscript letters are significantly different (P<0.05).

In the case of the energy utilization balance (Table 8), the intake of energy was higher in the PBs trout compared to the Ms and Mr trout, especially for the A22h line. The body gain in energy was also higher with the PBs feeding condition whatever the trout line. The total losses were equally higher in the PBs and Ms trout compared to the Mr ones, especially in the AB1h and A22h lines. In fact the energy digestive losses were higher in the PBs trout, but it was not the case for the metabolic losses.

When we examine the impact of the rationing on the utilization of the energy contained in the M diet, data show that its intake was significantly lower in the rationed trout (<0.001), excepted in the R23 line. However, the retention of the dietary energy remained similar whatever the level of rationing and whatever the trout line. There was a significant difference only for the AB1h line concerning the energetic digestive losses (P<0.001), and no significant difference at all for the metabolic losses.

For a similar ration level, the intake of energy was higher ( $P < 0.001$ ) in trout fed the PB diet compared to those fed the M (Mr) diet, whatever the line, in relation with the higher energetic content of the PB diet. The retention of this energy was better in all trout lines fed the PB diet compared to those fed the M diet (Mr) ( $P < 0.001$ ), despite higher digestive losses ( $P < 0.001$ ). The metabolic losses in energy remained significantly unaffected whatever in PBs and Mr trout whatever the line.

### ***Plasma metabolites levels***

The levels of plasma metabolites (total amino acids, glucose, and triglycerides) have been measured for all feeding conditions and all isogenic lines of trout at the end of the growth experiment, 8 and 16 hours after the morning meal at Day 164, then 8 hours again after the morning meal on the following day (Day 165). There was a clear time effect on these data (Table 9), but it strongly varied according to the metabolites. The plasma level of total amino acids was high 8 hours after the meal, whatever the day of sampling, and lower 16 hours after the meal. Concerning triglycerides, their plasma concentration rose with time, the lowest values being measured 8 hours after the meal at the Day 164 and the highest 8 days after the meal the following day (D165). The evolution pattern of the glucose plasma levels over time was the opposite of that observed for the total amino acids: the lowest values were observed 8 hours after the meal, whatever the day of sampling, and the highest were measured 16 hours after the meal.

**Table 9.** Statistical data about the time effect on the plasma metabolites levels measured at Days 164 and D165 in the three isogenic lines of trout subjected to the three feeding conditions

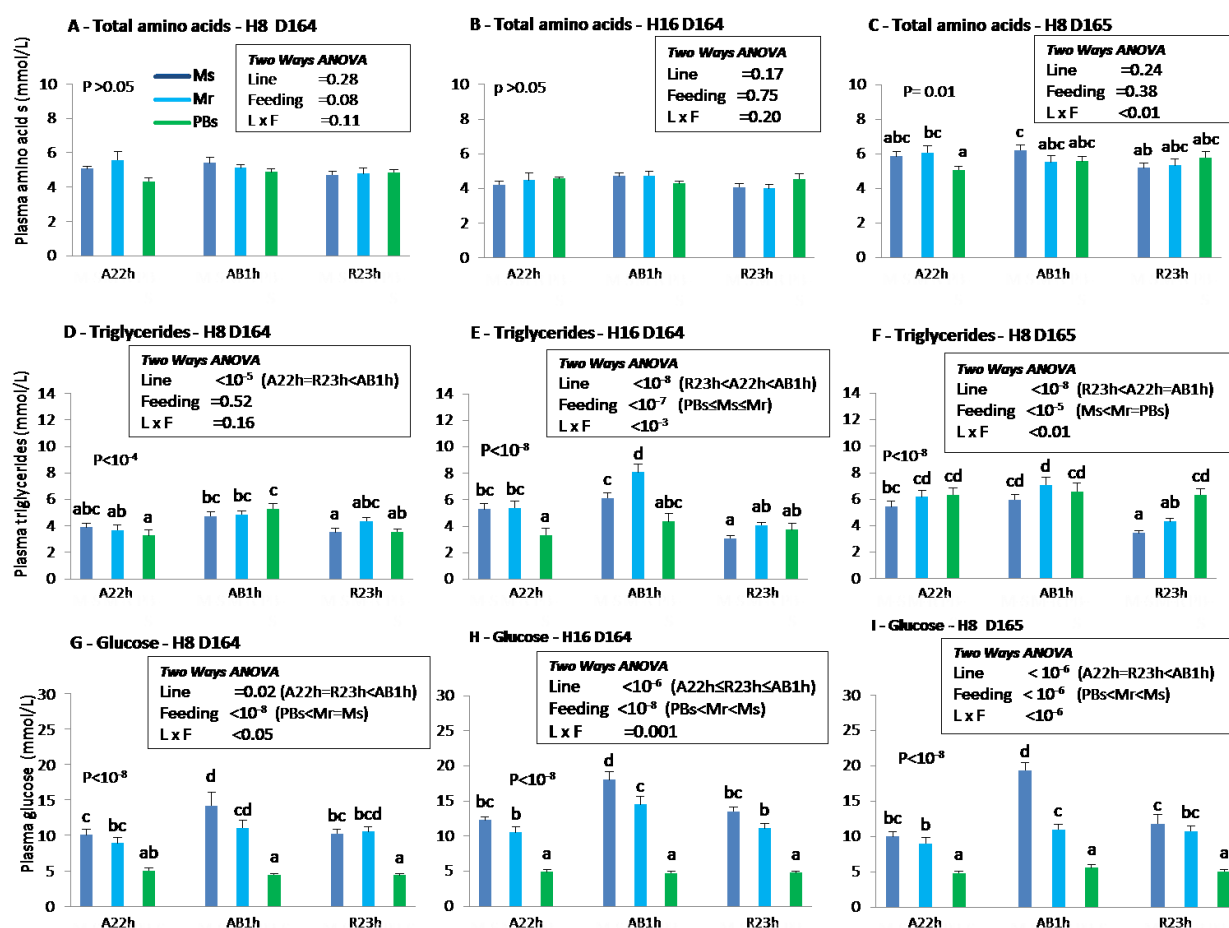
<b>Metabolites</b>	<b>Time effect</b>
<b>Total amino acids</b>	$P < 0.001$ ( <b>H16D164</b> < <b>H8D164</b> < <b>H8D165</b> )
<b>Triglycerides</b>	$P < 0.001$ ( <b>H8D164</b> < <b>H16D164</b> < <b>H8D165</b> )
<b>Glucose</b>	$P = 0.017$ ( <b>H8D164</b> < <b>H8D165</b> < <b>H16D164</b> )

One way ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (no parametric)

The feeding and line effects on the metabolites plasma levels are showed in Figure 5. For total amino acids plasma content, there was no significant difference at the two first sampling times (8 and 16 hours after the meal at Day 164), but the following day (D165), 8 hours after the meal, there was no significant feeding or line effect, but an interaction between these two factors: the impact of the feeding conditions on the circulating amino acides levels was very different according to the line. Nevertheless, we can notice that the lowest value was observed for the A22 line when fed the PB diet.

There was significant variations of the triglyceride plasma levels at the three times of sampling. A line effect was observed for each timing, and the AB1h line stood up with higer values of circulating triglycerides. A feeding effect was observed the two last sampling times. Lower values were measured 16 hours post-feeding in trout fed the PB diet and the differential between the levels observed when fish are fed the PB diet or the M (Mr and Ms) diet was greater in the A22h and AB1h lines. Eight hours after the meal at Day 165, the line effect was similar to that observed one day before. However the feeding effect varied, as the higher triglycerid values were associated to the ingestion of the PB diet.

Results are clearer for the plasma levels of glucose. Indeed, the same pattern was observed whatever the time of sampling for the Feeding and Line effect lower values being systematically found in the trout fed the PB diet and the highest with the Mr feeding condition. The values were also systematically higher in the AB1h line compared to those measured in the A22h and R23h lines. A interaction was observed between these two factors at each sampling time.



**Figure 5.** Data on the plasma levels in total amino acids (A, B, C), triglycerides (D, E, F) and glucose (G, H, I) measured at Day 164 and Day 165 in the three isogenic lines of rainbow trout (A22h, AB1h, R23h) subjected to the three feeding conditions (Ms, Mr, PBs). For each plasma metabolite at each time of sampling, means (n=9) with common superscript letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ). Vertical bars show the standard error of the mean (SEM).

### ***GIT Gene expression in fry and juveniles trout***

In the trout fry, relative gene expressions of the main digestive enzymes were either unaffected by the dietary conditions or enhanced by the ingestion of the PB diet (Table 9): when trout were fed the PB diet, the relative gene expressions of gastric pepsinogen (Peps), pancreatic trypsin (Tryp) and chymotrypsin (Chymo), but also the intestinal Rab8, sodium glucose transporter (SGLT1), phosphatase alkaline (IAP) and cholecystinin (CCKT) were higher compared to those of trout fed the M diet. It is interesting to notice that the majority of the genes stimulated by the ingestion of the PB diet were involved in the digestion and absorption of proteins or involved in the regulation of the intestinal functioning (IAP and CCKT).

When there was a significant line effect, the lowest values of gene expression in trout fry were most of the time observed equally in the A22h and R23h lines and the highest in the AB1h line. It was the case for the genes coding for Gastric lipase, pepsinogen, prolidase, phospholipase, intestinal alkaline phosphatase, peptide transporter 1, and sodium glucose transporter. Only the expression of the Rab8 gene is distinguished by an equally lower value obtained for A22h and AB1h instead of R23h.

Globally, the expression of 11 genes out of 15 demonstrated significant variations. It is interesting to notice that the expression of some genes was impacted in trout fry by both the feeding conditions and the lines (4 out of 15), while others are only impacted by the feeding (3 out of 15) or the lines (4 out of 15). There was no interaction between the feeding and the line effect whatever the gene studied.

In juvenile trout, at day 164 (Table 11), the expression of 8 genes out of 15 showed significant variations, therefore 3 genes less than in the fry. There were 6 out of 15 genes subjected to a feeding effect, and again 6 genes impacted by the fish line. Four genes were sensible to both feeding and line effects. There was no interaction between the feeding and the line effect whatever the gene studied.

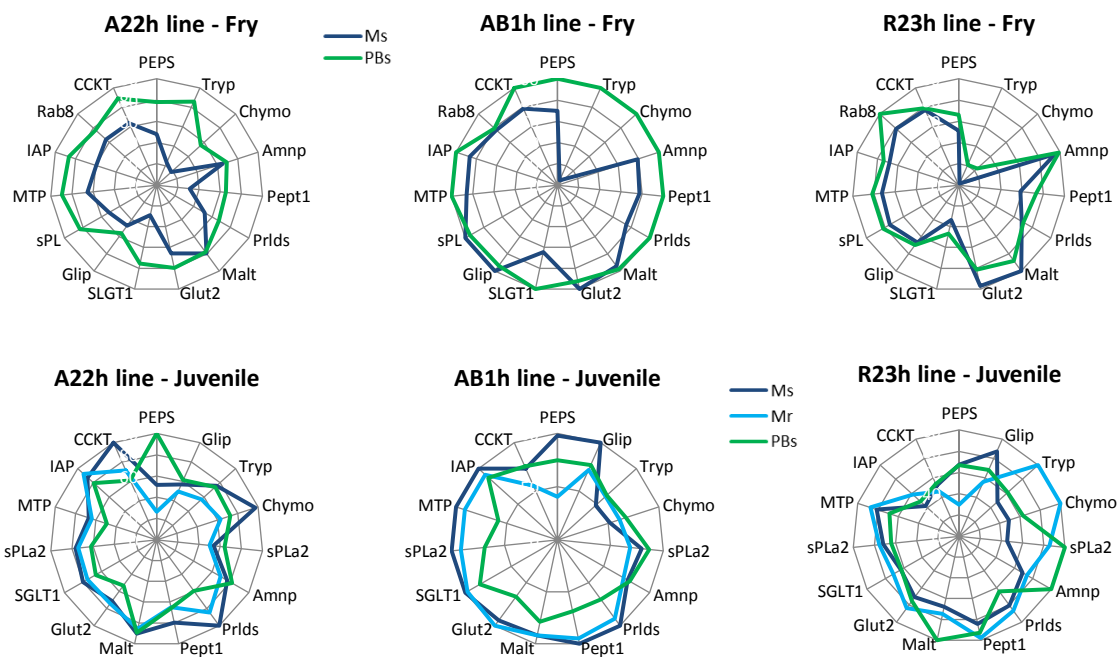
Regarding the feeding effect, 4 genes (MTP, CCKT, prolidase and intestinal phospholipase) were similarly affected: their expression was decreased when the trout were fed the PB diet. At the opposite, the expression of gastric pepsinogen and caecal phospholipase was stimulated by the PB diet intake. The study of the line effect showed that almost all the affected genes had a lower expression in the A22h line, and higher with the AB1h line. The R23h line was intermediary. In the case of the IAP gene, the higher values of gene expression were observed for the A22h and AB1h lines.

**Table 10.** Relative GIT gene expression 49 days post hatching in rainbow trout fry (three isogenic lines) fed the M or PB diet since their first meal (at Day 17).

	A22h		AB1h		R23h		ANOVA	Feeding	Line	F×L
	Ms	PBs	Ms	PBs	Ms	PBs				
<b>IAP</b>	0.77 ±0.03 a	1.13 ±0.06 bc	1.12 ±0.13 bc	1.30 ±0.11 c	0.89 ±0.06 ab	0.96 ±0.06 abc	<10 <sup>-3</sup>	0.005 (M<PB)	0.002 (A22h=R23h<AB1h)	0.22
<b>CCKT</b>	0.80 ±0.03 a	1.12 ±0.10 ab	0.99 ±0.05 ab	1.26 ±0.10 b	0.97 ±0.07 ab	1.00 ±0.11 ab	0.01	0.005 (M<PB)	0.12	0.18
<b>tryp</b>	2.15 ±0.67 b	8.04 ±2.73 c	0.46 ±0.15 a	9.33 ±5.00 d	0.16 ±0.04 a	1.95 ±1.09 b	0.03	0.008 (M<PB)	0.18	0.34
<b>Chymo</b>	1.26 ±0.36 a	3.91 ±1.09 ab	0.60 ±0.17 a	6.98 ±2.62 b	0.22 ±0.03 a	1.63 ±0.69 a	<10 <sup>-2</sup>	0.001 (M<PB)	0.07	0.12
<b>GLUT2</b>	0.81 ±0.09	0.97 ±0.09	1.22 ±0.24	1.13 ±0.09	1.19 ±0.10	1.00 ±0.11	0.24	0.72	0.10	0.39
<b>Malt</b>	0.97 ±0.18	0.95 ±0.12	1.15 ±0.27	1.20 ±0.18	1.22 ±0.15	1.08 ±0.21	0.87	0.81	0.49	0.88
<b>MTP</b>	0.84 ±0.08	1.14 ±0.11	1.10 ±0.25	1.28 ±0.12	0.92 ±0.08	1.05 ±0.11	0.29	0.08	0.26	0.79
<b>GLIP</b>	0.70 ±0.04 a	0.83 ±0.08 ab	1.48 ±0.29 c	1.38 ±0.17 bc	0.98 ±0.07 abc	1.03 ±0.08abc	0.005	0.81	0.0004 (A22h=R23h<AB1h)	0.75
<b>PEPS</b>	0.75 ±0.08 a	1.22 ±0.12 ab	1.09 ±0.21 ab	1.56 ±0.14 b	0.80 ±0.10 a	1.03 ±0.10 ab	<10 <sup>-2</sup>	0.001 (M<PB)	0.01 (R23h≤A22h≤AB1h)	0.58
<b>PEPT1</b>	0.56 ±0.13	1.16 ±0.13	1.38 ±0.40	1.79 ±0.36	1.04 ±0.18	1.31 ±0.30	0.08	0.07	0.04 (A22h≤R23h≤AB1h)	0.83
<b>Prlid</b>	0.77 ±0.11	1.00 ±0.08	1.10 ±0.23	1.48 ±0.19	1.01 ±0.09	1.04 ±0.12	0.06	0.10	0.03 (A22h≤R23h≤AB1h)	0.5
<b>Rab8</b>	0.82 ±0.04 a	0.99 ±0.03 ab	0.99 ±0.09 ab	1.02 ±0.10 ab	1.01 ±0.07 ab	1.28 ±0.05 b	<10 <sup>-2</sup>	0.01 (M<PB)	0.01 (A22h≤AB1h≤R23h)	0.26
<b>SLGT1</b>	0.60 ±0.12 a	1.56 ±0.18 bc	1.33 ±0.35 abc	2.06 ±0.21 c	0.69 ±0.11 ab	0.96 ±0.19 ab	<10 <sup>-3</sup>	0.001 (M<PB)	0.001 (A22h=R23h<AB1h)	0.27
<b>sPL</b>	0.66 ±0.05 a	1.07 ±0.12 ab	1.29 ±0.19 b	1.22 ±0.12 b	0.96 ±0.07 ab	1.06 ±0.04 ab	<10 <sup>-2</sup>	0.12	0.005 (A22h≤R23h≤AB1h)	0.10
<b>Amnp</b>	0.85 ±0.18	0.90 ±0.11	1.03 ±0.25	1.30 ±0.18	1.24 ±0.18	1.29 ±0.23	0.40	0.45	0.14	0.80

Targeted genes mRNA expression are expressed relatively to EF1 mRNA expression. For each gene, means (± SEM, n=6) without common superscript letters are significantly different (P<0.05).

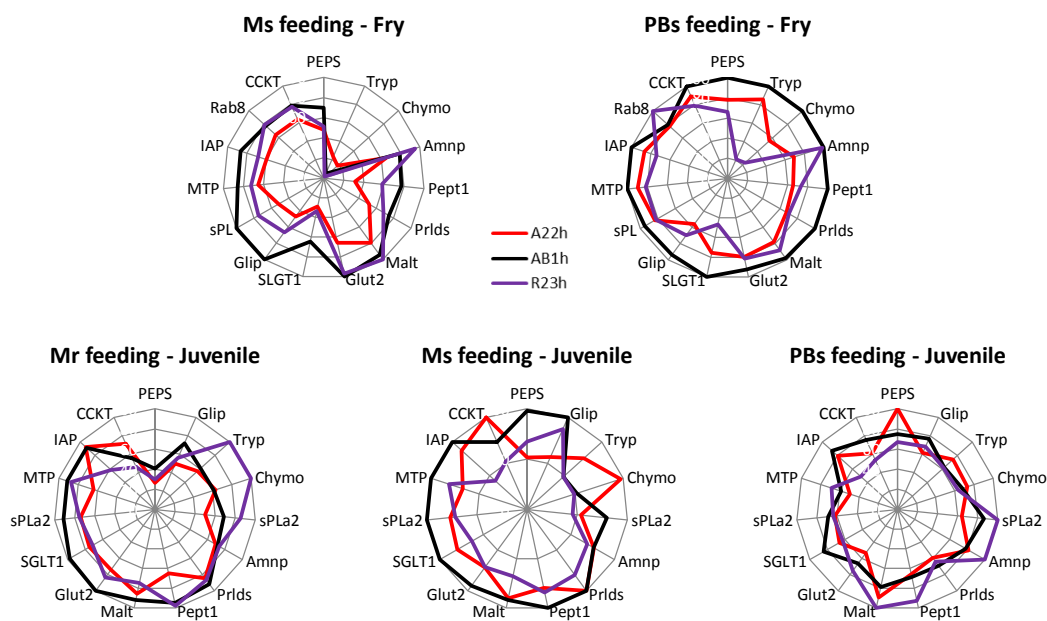
If we compare data obtained with fry and juveniles, only two genes (CCKT and gastric PEPS) were significantly affected by the feeding at both stage, and only two others (IAP and phospholipase) were affected by the line at these two stages. The Figures 6 and 7 help to visualize the differences in gene expression in the different trout's lines as a function of their feeding, at the fry stage and then juvenile stage. Globally, at the fry stage, the three lines fed the PB diets had higher GIT gene expressions levels compared to when they were fed the M diet. The line AB1h is distinguished by higher expression levels than the two other lines when fed the PB diet, but also when fed the M diet. A22h and R23h had a similar pattern of GIT gene expression when fed the M diet, even if it was less intense in the case of A22h. When fed the PB diet their adaptive strategies looked different: R23h line slightly increased the intensity of the pre-existing pattern, while A22h modified its pattern, as well as AB1h line.



**Figure 6.** Relative GIT gene expressions 49 days (fry) and 164 days (juvenile) post hatching in rainbow trout represented on radar plots as function of the trout's lines. For each gene, its expression is presented as percentage of the higher measured level of expression (means shown in Tables 10 and 11), whatever the line or the feeding condition.



About 4 months later (Day 164), the patterns of GIT gene expression were very different in all trout's line, and they were not any more intense in trout fed the PB diet. The line AB1h is still distinguished by higher expression levels than the two other lines, especially when fed the M diet to satiety. When the access to the M diet was restricted, the pattern of gene expression did not change drastically, but the levels seemed lower. The statistical analysis (Table 11) showed indeed that the feed restriction feeding applied to the M diet (Mr) did not significantly modify the expression of the studied genes compared to what observed in the Ms trout, excepted for the gastric pepsinogen where the values were significantly lower in the Mr feeding condition compared to the Ms one.



**Figure 7.** Relative GIT gene expressions 49 days (fry) and 164 days (juvenile) post hatching in rainbow trout (see Tables 10 and 11) represented on radar plots as function of the feeding conditions. For each gene, its expression is presented as percentage of the higher measured level of expression (means shown in Tables 10 and 11), whatever the line or the feeding condition.

**Table 11.** GIT gene expression 164 days post hatching in rainbow trout juvenile (three isogenic lines) subjected to the three feeding conditions (Ms, Mr and PBs)

	A22h			AB1h			R23h			ANOVA	Feeding	Line	F×L
	Ms	Mr	PBs	Ms	Mr	PBs	Ms	Mr	PBs				
<b>Intestine</b>													
AMNP	1.05 ±0.05	0.95 ±0.10	1.12 ±0.19	1.05 ±0.11	0.98 ±0.09	1.08 ±0.18	0.94 ±0.12	1.01 ±0.13	1.37 ±0.15	0.46	0.12	0.75	0.58
Malt	1.14 ±0.09	1.08 ±0.13	1.13 ±0.17	1.16 ±0.15	1.16 ±0.12	0.99 ±0.26	0.85 ±0.13	0.94 ±0.13	1.26 ±0.17	0.71	0.77	0.71	0.38
MTP	0.97 ±0.06 ab	0.92 ±0.11 ab	0.71 ±0.12 a	1.44 ±0.17 b	1.32 ±0.12 b	0.84 ±0.09 a	1.17 ±0.08 ab	1.26 ±0.11 b	0.99 ±0.12 ab	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	0.40
CCKT	1.65 ±0.22 b	1.18 ±0.09 ab	1.01 ±0.11 a	1.21 ±0.14 ab	0.92 ±0.08 a	1.25 ±0.13 ab	0.86 ±0.12 a	0.76 ±0.06 a	0.89 ±0.14 a	<10 <sup>-3</sup>	PBs<Ms=Mr 0.03	A22h<AB1h=R23h <10 <sup>-3</sup>	0.61
IAP	1.31 ±0.21 ab	1.39 ±0.12 ab	1.19 ±0.14 ab	1.50 ±0.23 b	1.37 ±0.23 ab	1.31 ±0.17 ab	0.63 ±0.09 a	0.88 ±0.14 ab	0.73 ±0.14 a	<0.01	PBs<Mr<Ms 0.64	A22h≤AB1h≤R23h <10 <sup>-4</sup>	0.84
GLUT2	1.04 ±0.05	1.09 ±0.21	0.78 ±0.12	1.38 ±0.18	1.47 ±0.21	0.97 ±0.21	1.04 ±0.11	1.23 ±0.13	1.11 ±0.12	0.09		R23h<A22h=AB1h 0.05	0.60
Prid	1.28 ±0.13 b	1.08 ±0.07 ab	0.76 ±0.06 a	1.28 ±0.12 b	1.17 ±0.08 ab	0.89 ±0.1 ab	1.03 ±0.06 ab	1.11 ±0.08 ab	0.82 ±0.07 a	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-5</sup>	0.18	0.46
PEPT1	1.04 ±0.06	0.84 ±0.09	0.86 ±0.18	1.30 ±0.17	1.24 ±0.14	0.89 ±0.16	1.10 ±0.14	1.27 ±0.17	1.21 ±0.17	0.19	PBs<Ms=Mr 0.4	0.06	0.40
SGLT1	1.10 ±0.07	1.03 ±0.11	0.91 ±0.12	1.37 ±0.15 b	1.34 ±0.15	1.16 ±0.15	0.87 ±0.06	0.98 ±0.10	0.86 ±0.15 a	0.02	0.29	<10 <sup>-3</sup>	0.90
sPL	1.04 ±0.08 abc	1.01 ±0.06 abc	0.84 ±0.04 a	1.36 ±0.12 cd	1.24 ±0.08 bc	0.93 ±0.06 ab	0.98 ±0.04 ab	1.03 ±0.07 abc	0.87 ±0.10 a	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-3</sup>	A22h=R23h<AB1h <10 <sup>-3</sup>	0.30
											PBs<Ms=Mr	A22h=R23h<AB1h	
<b>Stomach</b>													
PEPS	1.54 ±0.63	0.78 ±0.26	2.98 ±0.81	2.92 ±0.50	1.21 ±0.49	2.24 ±0.67	2.01 ±0.8	0.88 ±0.47	2.00 ±0.35	0.08	<0.01	0.58	0.48
GLIP	0.90 ±0.16	0.78 ±0.09	0.97 ±0.20	1.57 ±0.20	1.13 ±0.25	1.21 ±0.19	1.37 ±0.3	0.88 ±0.18	1.07 ±0.10	0.16	Mr<Ms=PBs 0.09	0.05	0.83
<b>Pyloric caeca</b>													
Tryp	1.38 ±0.57	1.03 ±0.22	1.35 ±0.24	0.88 ±0.16	1.11 ±0.20	1.14 ±0.18	0.88 ±0.2	1.82 ±0.4	1.12 ±0.31	0.5	0.54	0.65	0.27
Chymo	1.62 ±0.77	1.05 ±0.25	1.21 ±0.2	0.86 ±0.09	1.02 ±0.14	1.12 ±0.16	0.82 ±0.2	1.66 ±0.4	1.05 ±0.18	0.5	0.86	0.55	0.23
sPL	0.84 ±0.19 ab	0.78 ±0.09 a	1.00 ±0.05 ab	1.24 ±0.1 ab	1.07 ±0.12 ab	1.35 ±0.1 ab	0.71 ±0.5 a	1.33 ±0.4 ab	1.56 ±0.29 b	<0.01	0.02	0.03	0.09
											Ms≤ Mr≤PBs	A22h<R23h=AB1h	

Targeted genes mRNA expression are expressed relatively to 18S mRNA expression. For each gene, means (± SEM, n=6) without common superscript letters are significantly different (P<0.05).

**Table 12.** Specific GIT enzyme activities 164 days post hatching in rainbow trout juvenile (three isogenic lines) subjected to the three feeding conditions (Ms, Mr and PBs)

	A22h			AB1h			R23h			ANOVA	Feeding	Line	F×L
	Ms	Mr	PBs	Ms	Mr	PBs	Ms	Mr	PBs				
<b>Caeca pyloric</b>													
<b>Amyl</b>	0.41 ±0.07 ab	0.37 ±0.04 ab	0.37±0.07 ab	0.19 ±0.02 a	0.41 ±0.06 ab	0.29 ±0.04 ab	0.36 ±0.04 ab	0.51 ±0.07 b	0.31 ±0.05 ab	0.040	0.12	0.63	0.13
<b>Tryp</b>	3.24 ±0.83 b	1.87 ±0.55 ab	3.16 ±0.42 b	1.35 ±0.39 ab	1.95 ±0.56 ab	1.78 ±0.32 ab	1.03 ±0.25 a	2.19 ±0.55 ab	0.96 ±0.29 a	<0.01	0.68	0.0005 (AB1h=R23h<A22h)	0.03
<b>sPL</b>	0.87 ±0.16 b	0.82 ±0.12 ab	0.36 ±0.06 ab	0.48 ±0.04 ab	0.90 ±0.18 ab	0.30 ±0.04 ab	0.68 ±0.13 ab	0.81 ±0.17 ab	0.22 ±0.03 a	<0.01	0.0003 (PBs<Ms=Mr)	0.27	0.36
<b>Intestine</b>													
<b>Leu-ala</b>	0.76 ±0.07	0.93 ±0.11	0.82±0.10	0.43 ±0.04	0.89 ±0.06	0.82 ±0.30	0.74 ±0.07	0.75 ±0.09	0.50 ±0.04	0.09	0.11	0.22	0.15
<b>Amyl</b>	1.36 ±0.11 ab	1.46 ±0.13 ab	0.80 ±0.05 a	1.21 ±0.07 ab	1.08 ±0.10 ab	2.29 ±0.20 b	1.49 ±0.11 ab	1.63 ±0.11 ab	0.73 ±0.09 a	<0.01	0.85	0.31	<10 <sup>-3</sup>
<b>sPL</b>	4.46 ±0.23 b	3.06 ±0.21 b	1.46 ±0.16 b	3.33 ±0.25 b	2.89 ±0.32 b	0.00 ±0.00 a	3.03 ±0.14 b	3.30 ±0.33 b	1.34 ±0.08 b	<10 <sup>-8</sup>	<10 <sup>-7</sup> (PBs<Ms=Mr)	<10 <sup>-3</sup> (AB1h≤R23h≤A22h)	<10 <sup>-3</sup>
<b>Tryp</b>	6.53 ±0.79 a	6.84 ±1.21 a	16.6 ±2.91 b	4.51 ±0.62 a	5.27 ±0.91 a	9.45 ±1.26 a	4.44 ±0.60 a	10.65 ±2.40 ab	4.00 ±0.72 a	<10 <sup>-5</sup>	<10 <sup>-3</sup> (Ms≤Mr≤PBs)	<0.01 (R23h≤AB1h≤A22h)	<10 <sup>-4</sup>
<b>Maltase</b>	3.05 ±0.40 ab	2.95 ±0.38 ab	6.16 ±1.63 b	3.48 ±0.70 ab	6.42 ±0.47 b	1.54 ±0.24 a	2.23 ±0.31 a	5.06 ±0.49 ab	5.03 ±0.39 ab	<10 <sup>-4</sup>	<0.01 (Ms≤PBs≤Mr)	0.68	<10 <sup>-4</sup>
<b>IAP</b>	2.75 ±1.10 a	2.75 ±0.40 a	1.83 ±0.67 a	3.38 ±0.40 ab	6.15 ±0.75 b	0.50 ±0.05 a	2.40 ±0.37 a	3.91 ±0.82 ab	1.19 ±0.32 a	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-4</sup> (PBs≤Ms≤Mr)	0.20	<10 <sup>-3</sup>

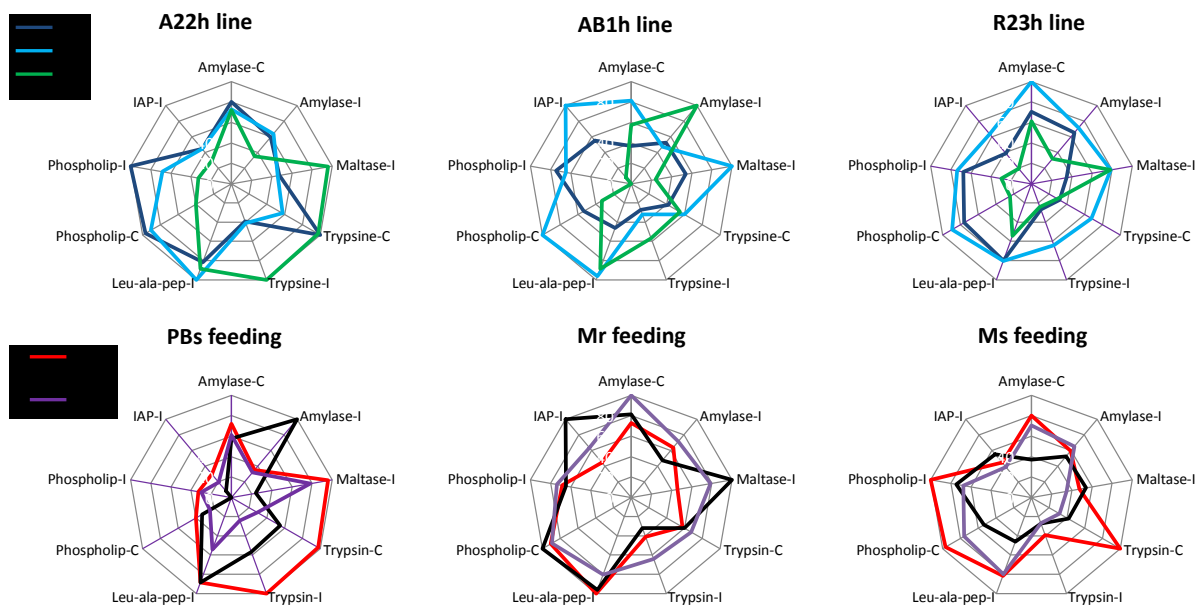
Targeted enzyme activities are expressed per g of protein. For each enzyme, means (± SEM, n=6) without common superscript letters are significantly different (P<0.05).

### ***GIT enzyme activities in juvenile trout***

The activity of some digestive enzymes were also affected by the feeding conditions and the fish line (Table 12). The specific activity of the caecal and intestinal phospholipase and of the intestinal alkaline phosphatase (IAP) were lower in the trout fed the PB diet compared to the M diet (Mr and Ms). At the opposite, the activity of the pancreatic trypsin measured in the lumen of the intestine was higher in the trout fed the PB diet. The activity of the intestinal maltase measured in the trout fed the PB diet was intermediary between those measured in trout fed the M diet rationed or to satiety. The trout line impacted the activity of the pancreatic trypsin measured in the caeca or in the intestine and of the phospholipase measured in the intestine: these activities were higher in the A22h line compared to what measured in the AB1 and R23 lines. They were an interaction between the feeding and the line effect for all enzymes, excepted the for the activity of the amylase and phospholipase assayed in the caeca and of the intestinal leucine alanine peptidase.

The Feed restriction applied to the M diet did not impact significantly the enzymes activities; excepted in the case of the maltase where the activity measured in the Mr condition differed from that measured for the Ms condition.

The figure 8 help to visualize the differences in enzyme activities in the different trout's lines as a function of the feeding conditions. The patterns of activity strongly differed according to the line and the feeding; differences are more than what observed with the patterns of gene expression. Globally, when the patterns of enzymes activities of the 3 lines are compared, they are more similar under the Ms feeding condition, while the strongest differences were induced by the PBs condition. It appears that the adaptive strategies to face the different feeding condition varied according to the trout's line. For instance, in the A22h line the activities of the enzymes involved in the peptide digestion were enhanced with the PB diet. It was the case also for the other lines but to a lesser extent.



**Figure 8.** Caecal (C) and intestinal (I) enzymatic activities (see Table 12) represented on radar plots as function of the trout's lines or the feeding conditions. For each gene, its expression is presented as percentage of the higher measured level of expression (means shown in Tables 10 and 11), whatever the line or the feeding condition.

For a given enzyme, when its activity is compared to its gene expression measured on the same trout population and at the same date (Day 164), there is an apparent relationship for the phospholipase in the intestine and for the trypsin in the pyloric caeca. However, concerning phospholipase, as its activity in the intestine is the results of the secretion by both the intestine and the exocrine pancreas it is not possible to conclude that the apparent relationship between the intestinal phospholipase activity and its transcription in this tissue was due to a regulation at the transcriptional level of the phospholipase in the intestine. Indeed, the gene expression of this enzyme and its specific activity were both impacted by the feeding, i.e. lower activities were obtained in trout fed the PB diet. When the line effect is considered, data shows that the phospholipase activity was reduced in the A22h line compared to the other lines, while its gene expression was enhanced in this trout line.

## Discussion

The objective of this study was to evaluate if the differences of response to a PB diet of the three isogenic lines of trout can be explained, at least in part, by differences in their digestive capacities.

### Feeding effect

The plant-based (PB) diet reduced growth as compared to the fishmeal-based diet (M) in the three isogenic lines of trout. The reduction of growth rate varied from 21 to 34% according to the fish genotype, despite the two diets were relatively iso-energetic, iso-lipidic and iso-nitrogenous and they were formulated in order to match the nutritional requirements of rainbow trout. Earlier studies have shown that total replacement of fish meal by plant proteins depressed growth of salmonids and marine species (Alami-Durante et al., 2010; Dupont-Nivet et al., 2009; Panserat et al., 2009; Santigosa et al., 2008; Vilhelmsson et al., 2004). There are only few papers reporting feeding trials with concomitant replacement of both fish meal and fish oil by plant meal and vegetable oil blends in salmonids diets (Torstensen et al., 2008; Panserat et al., 2009; Lazzarotto et al., 2015) and a reduction in growth rate was also observed. The lower growth rate obtained in the present study with the PB diet could be due to the high level of plant protein, the absence of marine protein sources, or the absence of EPA and DHA in the diets distributed from the first feeding.

Such deleterious impact on growth performance is often accompanied by early mortality (Kaushik et al., 1995; Médale et al., 1998; Mambrini et al., 1999; Refstie et al., 2000; Yamamoto et al., 2002; Barrows et al., 2007). In the present study, an episode of high mortality occurred at early stage and this drastic dietary effect is likely to be attributed to the combination of a complete fishmeal substitution together with the very early exposition (start at the mouth opening) of the fish to such a dietary stress factor. After this mortality episode, fish showed a normal survival until the end of the experiment.

Most fish species reduce feed intake when fed diet devoid of FM. Reduced feed intakes, due to palatability problems (Gomes et al., 1995; Mambrini et al., 1999; Espe et al., 2006; Dupont-Nivet et al., 2009). The feed intake have not been measured in a regular way all over the present study, only during the last 52 days of rearing, in juveniles. The voluntary feed intake was effectively reduced in the trout fed the PB diet, but it was likely rather related to the differential of fish size (PB trout were smaller than the M trout because of the growth impairment) than to a real reduction of the voluntary feed intake, because when expressed per gramme of fish (specific feed intake), it was similar whatever the feeding condition.

In our study, the reduced growth rate obtained with the PB diet was thus rather related to a decrease of feed efficiency. Beside, when the M diet was rationed (Mr), its level of consumption was similar to that of the PB diet, but its efficiency was higher, at the same level than what measured for the M diet distributed to satiety. This reduction in feed efficiency with the PB diet is in agreement with findings from other trials with rainbow trout (Adelizi et al., 1998; de Francesco et al., 2004; Barrows et al., 2007). Krogdahl et al. (2003) and Vilhelmsson et al. (2004) suggested that it might be due to disturbed digestive or modified metabolic processes, possibly in relation with the presence of anti-nutritional factors in plant ingredients. Our results showed that the digestibility of lipid, starch, mineral and energy contained in the PB diet was lower of that of the M diet, but at the opposite, the digestibility of the PB proteins was higher; this last result is contradictory with those of Santigosa et al. (2011) which concluded to a lower digestibility of the PB proteins in trout. In fact, the protein utilisation balance calculated in our study showed that the body retention efficacy of the PB protein consumed was lower compared to that of the M diet, mainly because of higher metabolic losses. At the opposite, the body retention efficacy of the consumed PB energy was higher than that of the consumed M energy, mainly because of higher digestive losses. These results are in good agreement with those of previous studies showing that a high replacement level of marine resources by plant products in trout and salmon diets led to increases nitrogen wastes due to a lower protein retention efficiency, induces changes in intermediary metabolism accompanied by an increased deposition of visceral fat (Torstensen et al 2008; Corraze and Kaushik, 2009; Médale and Kaushik, 2009; Panserat et al., 2009; Santigosa et al., 2008; 2010; Alami et al., 2010 a and b; Morais et al., 2011).

The post-prandial plasma metabolites (total amino acids, triglycerids and glucose) levels were measured in order to obtain further information on the fate of the feed components once absorbed by the trout. There was no clear feeding effect on the plasma total amino acids and triglycerides, but the glycemy of the trouts fed the PB diet was clearly the lowest than that of the trout fed the M diets to satiety the highest. This hierarchy reflects the amounts of starch ingested by trout, taken into account the lower starch content of the PB diet (9.6% DM) compared to that of the M diet (15.3%), as well as its digestibility which was lower in the PB diet.

A feeding effect was also observed on the gene expression of some proteins involved in the digestion and transport of the nutrients and on the activity of some digestive enzymes but differently according to the development stage of trout. Globally, at the fry stage, trout fed

the PB diets had higher GIT gene expressions levels compared to when they were fed the M diet. About 4 months later, the patterns of GIT gene expression were very different and they were not any more so intense in trout fed the PB diet.

If we observe these differences more in details, we can observe than in fry, the ingestion of the PB diet had no effect or enhanced the expression of genes involved in the digestion and absorption of proteins or in the regulation of the intestinal functioning (IAP and CCKT). In juvenile, the PB diet induced a decrease of the expression the “regulatory” genes (IAP, CCKT) and of prolidase and intestinal phospholipase, but an increase for the gene expression of the gastric pepsinogen and caecal phospholipase. At the same time, the PB diet ingestion induced a decrease of the activity of the caecal and intestinal phospholipase and IAP, while the activity of the pancreatic trypsin was enhanced. Our feed digestibility measurements were performed at the juvenile stages and the most remarkable observed fact was the higher digestibility of the protein from the PB diet compared to those from the M diet, maybe in relation with the enhanced trypsin activity.

In our study, the data of expression of the genes coding for the digestive enzymes are not very good predictors of their activity. Phenomenons of post-transcriptional regulation may be involve, or it could be also a problem of sampling timing (8 hours after the meal in this study). Indeed, GIT gene expressions are subjected to daily variations (Borey et al, 2016) and Yúfera et al. (2012) demonstrated in juvenile white seabream (*Diplodus sargus*) fed once a day (morning meal) an increase in pepsin activity following the meal, while daily changes in the mRNA expression of pepsinogen occurred later (during the nocturnal period) and were not particularly related to the moment of food supply, but rather modulated by the circadian rhythm. They suggested that, in that case, mRNA transcripts were overexpressed during the night-time, corresponding to a transcriptional effort occurring during the resting hours. The best would be to perform systematically a post-prandial kinetic study of the gene expression and activity of enzymes to be able to visualize their connection and to be sure not to miss any daily peak.

Cholecystokinin (CCK) is an actor of the system of gastroenteropancreatic (GEP) hormones/neurotransmitters and is released in part by anterior intestinal endocrine cells in response to the presence of feed in lumen and vagal stimulation. CCK Stimulates contraction of the gallbladder and secretion of pancreatic digestive enzymes, specially trypsin and chymotrypsin, and hormones (Einarsson et al., 1997). As we have measured a higher activity level for trypsin, It would have been logical to also observe a more important gene



expression of the CCK. But as previously hypothesized, it is maybe only a problem of delay between these two phenomenon and thus a problem of The nycthemeral sampling timing.

### ***Line effect and interaction***

As expected, there were strong different responses in terms of growth performance between the three isogenic lines of trout when they were fed the PB-diet, while the extend of these differences are smaller when fed the M diet, as illustred by the strong interaction between the feeding and the line effects.

Our results are in good agreement with those of Dupont-Nivet et al (2009) and Sadoul et al (2015, 2016) using the same trout isogenic lines. The same observation was made in our study on almost all studied traits (survival, feed intake, feed efficiency, nutrient retention, digestibility, some plama metabolite levels and gene expression and activity of GIT functioning actors (enzymes, transporters...). It is the first time that a study describes the genetic variability (between lines, strains or families) of trout on so many traits concerning feed utilisation in response to PB diets. Untill now, genetic variability has been described mainly for survival and growth, and more rarely for feed intake and feed efficiency, in fish fed diets devoided or poorer than usual in fishmeal (Smith et al., 1988; Palti et al., 2006; Quinton et al., 2007a,b; Pierce et al., 2008; Dupont-Nivet et al., 2009; Sadoul et al., 2015, 2016)

In our study, the R23h and AB1h were the lines which showed the best ability to grow under the PB diet given to satiety, while the A22h line showed the poorest ability. The associated traits in R23h and AB1h, compared to those observed in A22h, were a better survival rate and a better feed efficiency (FE). However, there was no clear evidence of a better nutrient utilisation by these two lines, the A22h line having even the best results in terms of PB diet digestibility. By the end of the study, the AB1h and R23h trout consumed more feed than the A22h trout, but this difference disappeared when the feed intake was expressed in function of their body weight (specific feed intake). Unfortunately, we have no information about the voluntary feed intake at the beginning of the experiment. Dupont-Nivet et al (2009) concluded that, in their case, the difference of growth between different isogenic lines of trout fed a PB diet had as determinants the feed intake and to a lesser extent the feed efficiency.

When the M diet was given to satiety, the R23h line showed the best growth performance all along the study, and the AB1h line showed the poorest performance. Our data did not give determinant for this difference, as there was no difference between the lines in terms of specific feed intake or feed efficiency. When the M diet was rationed, the growth

performance of the R23h line collapsed, and it was finally the AB1h trout which performed the best. That fact suggests that the better performance of the R23h when fed to satiety the M or the PB diet would be indeed related to a higher feed intake, even if it was not the case anymore at the end of the rearing, where the feed intake measurements were performed.

When a global look is given to the the pattern of GIT gene expressions, the AB1h line is distinguished from the two other lines when fed the M or the PB diet, at the fry but also at the juvenile stage, while the patterns of the R23h and A22h lines looked more similar. Thus, these data suggest that R23h and AB1h lines have different strategies to be able to maintain a sufficient growth under a PB diet.

### ***Focus on the genotype and feeding effects on the GIT gene expression and enzyme activities***

#### **Trout fry**

In trout fry from the A22h line, which showed poor ability to grow under PB diet, pepsinogen, PEPT1, SLGT1, CCK T and IAP transcriptions were enhanced in comparison with trout from the A22h line fed with the M diet. These results are not in good agreement with those of Sahlmann (2015) obtained from 46 day post hatching salmons. The total replacement of fish meal with meal from plant origin in our study, contrasts with the partial fish meal substitution of fish meal in Sahlmann's survey, and could probably explain these differences. In the present study, PEPT1 and SLGT1 regulation were only observed at the transcriptional level, which did not asses for an identic regulation of the corresponding proteins. However, possible enhancement of these transporters in A22h fry fed with the PB diet can be suspected. Effectively, RAB8 gene, which encodes for an enzyme ensuring the translocation of the PEPT1 and SLGT1 proteins from trans-Golgi network towards the brush border membrane (Kato et al. 2009), displayed the same transcriptional regulation than the PEPT1 and SLGT1 gene. PEPT1 transcriptional regulation by leptin, CCK, and gastrin has been suspected in fish (Ostaszewska 2010). In the present study, CCK T transcription varied as PEPT1 transcription in individuals from A22h line, and may thus be imply in the observed differential transcription pattern of PEPT1 transporter. Controversial observations in relation with CCK regulation by the diet have already been published in some fish species. The present results are consistent with a former study on rainbow trout where CCK synthesis was enhanced in trout fed a PB diet, which was not attributed to the protein origin but rather to the presence of soybean meal lecithin (Azarm et al. 2013). However, another research on yellowtail *Seriola quinqueradiata* reported the opposite trend, with an increased transcription of CCK gene in fish fed diet with higher fish meal inclusion (Furutani et al.

2012). As it was reported in mice that the activation of CCK transcription is indirectly due to the stimulation of the proximal intestinal taste receptors TIR1 and TIR3 presents in intestinal stem cells, it could be interesting to investigate this regulatory pathway (Daly et al. 2013).

In trout, whatever the line, trypsin and chymotrypsin transcriptions were significantly enhanced by fish meal and oil substitution.

#### Juvenile

Feeding restriction significantly reduced pepsinogen transcription in the stomach from all isogenic lines of trout, but did not have any significant impact on the subsequent plasmatic total amino acids levels. This suggests that either, a post transcriptional regulation exists and that the luminal pepsin activity is not impacted by feeding restriction, or either that this difference in pepsinogen transcription is followed by a difference in luminal pepsin activity but without any significant impact on former peptide intestinal absorption, or either that pepsinogen synthesis is merely adjusted to the luminal protein abundance. To our knowledge, there are no reports on pepsinogen regulation through feeding restriction. Concerning the post gastric digestion steps, a diet genotype interaction was present on caecal and intestinal trypsin activity, and on chymotrypsin transcription, with a significant increase of these enzymes under feeding restriction in trout from R23h line. Even if the differences were not significant at the transcriptional level, trypsin activity enhancement maybe partly due to a transcriptional regulation. Effectively, trypsinogene transcription showed the same pattern than caecal trypsin activity, and it was formerly reported that digestive enzymes regulations are both present at the transcriptional and post transcriptional level (He et al. 2016). This difference of sensibility of the trout isogenic lines to feeding restriction may probably be due to a previously reported genetic determinism in digestive enzymes regulation (Cara et al. 2007). Enhancement of chymotrypsine transcription under feeding restriction was not surprising as it has already been reported in birds, pigs, and sea bass larvae (Cara et al. 2007; He et al. 2016) (rajouter Kelly Lee, K.A., Karasov, W.H., Caviedes-Vidal, E. 2002). Feeding restriction did not impacted neither AMNP, prolidase nor PEPT1 transcription, which is controversial with a former research that reported an enhancement of PEPT1 transcription and of aminopeptidase activity during feeding restriction in chicks (Chicks et al. 2008). Concerning lipid absorption, a diet genotype interaction was present on MTP transcription, with a reduced transcription in trout from the A22h line. A diet genotype interaction was also significantly present on caecal amylase and on intestinal maltase activity. Even if not significant, a similar trend appeared on intestinal phosphatase alkaline activity, with an enhancement of the activity of these enzymes in the

trout from AB1h and R23h line under restriction. This regulation of the amylase caecal activity could be explained both by a post transcriptional and by a transcriptional regulation. Effectively even though it was not significant, the corresponding transcriptional variation displayed the same pattern. Concerning maltase and phosphatase alkaline activity, the regulation may have occurred at the post transcriptional level. Shyer enhancement of alkaline phosphatase activity under feeding restriction in comparison with variation observed on trypsin and amylase activity is consistent with a former report on yellowtail kinfish (Nan et al. 2007).

Improvement of protein digestibility through fish meal substitution with proteins from vegetable origin is consistent with some reports in rainbow trout (Larsen et al. 2012), and could be related to some digestive protease enhancement. Effectively, even if not assessed at the enzymatic level, the present study showed that fish meal and oil replacement elevated the pepsinogen transcription in all isogenic lines. Intestinal activity of trypsin in A22h and AB1h line were also significantly enhanced. These variations are highly similar to the increase of luminal pepsin and trypsin activity observed in Starry flounder, Rainbow trout, and Atlantic salmon under partial fish meal replacement with soy protein concentrate or meal (Dabrowski et al. 1989; Krogdahl et al. 2003; Li 2015). Advanced hypothesis to explain these trends is that trypsin inhibitors present in vegetable may have stimulated the increase of pepsin and trypsin activity through a compensatory mechanism. The previously reported higher solubility of vegetable protein in rainbow trout stomach could also have favoured pepsinogen transcription (Márquez et al. 2013). Moreover, the present study suggests that trypsin regulation by dietary replacement occurs at the post transcriptional level. The transcription and/or enzymatic activity of the other enzymes (chymotrypsin, prolidase, leucine-alanine peptidase, and aminopeptidase) and transporters (PEPT1) in link with peptide absorption were not impacted. These tendencies contrast with many reports dealing with the effect of fish meal replacement with plant based diet. PEPT1 transcription was effectively reduced in rainbow trout, sea bream and turbot, PEPT1 under feeding with meal and/or lipid from plant origin (Ostaszewska et al. 2010; Terova et al. 2013; Borey et al. 2016; Wei et al. 2016).

Secreted phospholipase A2 activity was significantly reduced in the intestine and pyloric caeca of trout fed with the PB diet, but these variations were not observed at the transcriptional level, which suggest the presence of a post transcriptional regulation. Chicken egg lecithin replacement with soy lecithin also reduced phospholipase A2 activity in rainbow

trout fry. This response was attributed to a fewer abundance of phosphatidylcholine and of highly unsaturated fatty acid in soybean lecithin, which subsequently lead to an accumulation of lipid droplet in the enterocytes, to a reduction of chylomicron synthesis, and to a traffic jam in lipid transport and absorption (Azarm et al. 2013). This hypothetical reduction of lipid transport could only be suspected in trout from the A22h and AB1h line as MTP transcription and plasmatic triglycerides levels were significantly reduced with fish meal and oil substitution. Soluble fibre from plant feed stuff could also be involved in the observed drop of triglycerides levels by their adsorptive properties (Lattimer and Haub 2010). Furthermore, nutritional phosphatidylcholine deficiency not only induced a drop of phospholipase A2 activity, but also of feed intake in Caspian rainbow trout (Kenari et al. 2011). Even if not assed, probable phosphatidylcholine deficiency may thus be taken into consideration to explain the drop of feed intake observed in the present study. According to Azarm survey, phospholipid from soybean lecithin diminished enterocyte maturity, which can be indirectly suspected through the drop of the intestinal phosphatase alkaline activity. In the present study, fish meal and oil substitution lead to a significant decrease of intestinal activity of the phosphatase alkaline in trout from AB1h and R23h line, which were described as good responder to the plant based diet. This pattern could thus be interpreted as a reduced integrity of the intestinal epithelium of these two lines. However, intestinal alkaline phosphatase is not only a biological indicator of intestinal maturity, it is also implicated in bacterial LPS detoxification, in attenuation of intestinal inflammation, and in absorption of lipids (Lallès 2014). The reduced IAP observed in trout from AB1h and R23h line fed with the plant based diet in comparison to the trout from the A22h line could consequently also be due to a different microbiota harbouring less LPS in comparison with the microbiota from the A22h line, or to a greater intestinal inflammatory state in trout from the A22h lines (Geddes and Philpott 2008). Concerning glycolytic capacities,  $\alpha$ -amylase, SLGT1 and GLUT2 activity and/or transcription were not significantly affected by fish meal and oil substitution. Amylase stability is consistent with reports on trout, gilthead sea bream and tilapia (Santigosa et al. 2008; Lin 2010; Santigosa et al. 2011a; Oliva-teles 2012) and was explained by the low basal level of carbohydratases in fish. SLGT1 and GLUT2 transcription stability between the different diet is consistent with a study on the impact of starch dietary levels on the glucose transport capacities in rainbow trout (Kamalam et al. 2013), but not with a similar study from Kirchner (2008).

### **Conclusion**

The present study shows the existence of genotype×Feeding conditions interactions in rainbow trout. There were strong different responses in terms of growth performance between the three isogenic lines of trout when they were fed the PB-diet, while the extent of these differences were smaller when fed the M diet. Our study clearly demonstrates that feed efficiency is one of the determinants of these differences between trout lines, even if our data about nutrient utilization (feed digestibility, nutrient retention, plasma metabolites) do not necessarily follow the same hierarchy between the trout lines. Feed intake would be also an important determinant, but our study did not allow to demonstrate it. The study of the digestive capacities of the three lines of trout by the measure of their GIT gene expression and enzyme digestibility opens a new field of studies, because there were strong differences according to the fish genotype which could explain, in part, the various feed efficiency phenotypes.

Thus, rainbow trout selected for high growth with a conventional fishmeal-based diet may not necessarily display optimal performances with plant-based diets, at least when fed an extreme diet during early growth. In addition, genotype×diet interactions were also noted for the within-clone variability in growth (CV) and for both growth determinants, i.e. daily feed intake and feed efficiency, which raise further issues for improving the use of plant-based diets by rainbow trout.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Emergence programme of INRA (2013) and by the ANR AGREENFISH Project (ANR-GUI-AAP-06). We thank F. Sandres for manufacturing the experimental diet and for rearing of the juvenile trout rearing (INRA, Donzax, France). The efforts of Marine Ballutaud, Maridiann Hyver, and Anaïssa Baptista which helped to the molecular analysis are also acknowledged.

## References

- Azarm HM, Kenari AA, Hedayati M (2013) Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquac Res* 44:634–644. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03068.x
- Adelizi PD, Rosati RR, Warner K, et al (1998) Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Nutr* 4:255–262. doi: Doi 10.1046/J.1365-2095.1998.00077.X
- Alami-Durante H, Wrutniak-Cabello C, Kaushik SJ, Médale F (2010) Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156:561–568. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.04.015
- Barrows FT, Stone DAI, Hardy RW (2007) The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 265:244–252. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.017
- Bernfeld P (1995) Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol* 1:149–158.
- Borey M, Panserat S, Surget A, Cluzeaud M, Plagnes-Juan E, Herman A, Lazzarotto V, Corraze G, Médale F, Lauga B, Burel C (2016) Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition. *Fish Physiology and Biochemistry* 42 (4): 1187-1202. doi: 10.1007/s10695-016-0208-4
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cahu CL, Infante JL (1995) Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol Biochem* 14:209-214.
- Cara JB, Moyano FJ, Zambonino-Infante JL, Fauvel C (2007) Trypsin and chymo trypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *J Fish Biol* 70:1798–1808. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01457.x
- Chicks B, Gilbert ER, Li H, et al (2008) Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *Journal of Neuroscience*. 138:262-271.
- Choubert G (1999) La digestibilité des nutriments chez les poissons: aspects de méthodologie. *Cybiurn* 23:113–125.

- Dabrowski K, Poczyczynski P, Kock G, Berger B (1989) Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New *in vivo* test for exocrine pancreatic secretion. *Aquaculture* 77:29–49.
- Dabrowski K, Zhang Y, Kwasek K, et al (2010) Effects of protein-, peptide- and free amino acid-based diets in fish nutrition. *Aquac Res* 41:668–683. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02490.x
- Dahlqvist A (1984) *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer. Weinheim
- Daly K, Al-rammahi M, Moran A, et al (2013) Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion. 1:271–282. doi: 10.1152/ajpgi.00074.2012
- Daprà F, Geurden I, Corraze G, et al (2011) Physiological and molecular responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 319:377–384. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.07.016
- De Francesco M, Parisi G, Médale F, et al (2004) Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 236:413–429. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.01.006
- Ducasse-Cabanot S, Zambonino-Infante JL, Richard N, et al (2007) Reduced lipid intake leads to changes in digestive enzymes in the intestine but has minor effects on key enzymes of hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal*. doi: 10.1017/S1751731107000596
- Dupont-Nivet M, Médale F, Leonard J, et al (2009) Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture* 295:15–21. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.031
- Einarsson S (1997a) A mult ductal system conveys digestive enzymes from the pancreas into the intestine in the Atlantic salmon. *J Fish Biol* 50:1120–1123. doi: 10.1006/jfbi.1996.0359
- Einarsson S (1997b) Seasonal variation in trypsin activity in juvenile Atlantic salmon upper and lower modal groups. *J Fish Biol* 51:1209–1218. doi: 10.1006/jfbi.1997.0527
- Espe M, Lemme A, Petri A, El-Mowafi A (2006) Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture* 255:255–262. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.030
- Furutani T, Masumoto T, Fukada H (2012) Response of cholecystokinin and digestive enzyme mRNA levels to various feed ingredients in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish Sci* 78:1075–1082. doi: 10.1007/s12562-012-0537-x



- Geddes K, Philpott DJ (2008) A new role for Intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology* 135:8–12. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.006
- Glencross B, Evans D, Rutherford N, et al (2006) The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture* 253:512–522. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.009
- Gu J, Bakke AM, Valen E, et al (2014) Bt-maize (MON810) and non-GM soybean meal in diets for Atlantic Salmon (*Salmo salar* L .) juveniles – impact on survival, growth performance, development, digestive function, and transcriptional expression of intestinal immune and stress responses. doi: 10.1371/journal.pone.0099932
- He L, Wu L, Xu Z, et al (2016) Low protein diets affect ileal amino acid digestibility and gene expression of digestive enzymes in growing and finishing pigs. *Amino Acids*. 48:21–30. doi: 10.1007/s00726-015-2059-1.
- Ihssen PE, Mckay LR, Mcmillan I, Phillips RB (1990) Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes : cytogenetic and fisheries applications. *Trans Am Fish Soc* 119:698–717. doi: 10.1577/1548- 8659(1990)119<0698
- Holm H, Krogdahl Å, Hanssen L (1988) High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vitro comparison of proteinase inhibition. *J Nutr* 118:521–525.
- Hua K, Bureau D. (2012) Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. *Aquaculture* 356–357:284–301. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.003
- Kamalam BS, Panserat S, Aguirre P, et al (2013) Selection for high muscle fat in rainbow trout induces potentially higher chylomicron synthesis and PUFA biosynthesis in the intestine. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 164:417–427. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.11.020
- Kato Y, Sugiura T, Nakadera Y, et al (2009) Investigation of the role of oligopeptide transporter PEPT1 and Sodium/Glucose cotransporter SGLT1 in intestinal absorption of their substrates using small GTP-binding protein Rab8-null mice. 37:602–607. doi:10.1124/dmd.108.023689.animal
- Kaushik S, Cravedi JP, Lalles JP, et al (1995) Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133:257–274.
- Kenari AA, Sotoudeh E, Rezaei MH (2011) Dietary soybean phosphatidylcholine affects growth performance and lipolytic enzyme activity in Caspian brown trout (*Salmo trutta Caspius*) alevin. 655–663. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02587.x

- Kirchner S, Panserat S, Lim PL, et al (2008) The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 178:429–438. doi: 10.1007/s00360-007-0235-7
- Komen H, Thorgaard GH (2007) Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture* 269:150–173. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.009
- Kotzamanis YP, Gisbert E, Gatesoupe FJ, et al (2007) Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 147:205–214. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.12.037
- Krogdahl Å, Bakke-McKellep AM, Baeverfjord G (2003) Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 9:361–371. doi:10.1046/j.1365-2095.2003.00264.x
- Lallès J-P (2014) Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev* 72:82–94. doi: 10.1111/nure.12082
- Larsen BK, Dalsgaard J, Pedersen PB (2012) Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 326–329:90–98. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.028
- Lattimer JM, Haub MD (2010) Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2:1266–1289. doi: 10.3390/nu2121266
- Lazzarotto V, Leprevost A, Quillet E (2015) Three year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources : consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PLoS One* 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0117609
- Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, et al (2012) Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PLoS One* 7:3–9. doi: 10.1371/journal.pone.0044898
- Lee K, Karasov W, Caviedes-Vidal E (2002) Digestive response to restricted feeding in migratory yellow-rumped warblers. *Ecol Evol approaches* 75:314–323.
- Li J (2015) Evaluation of soy protein concentrate as a substitute for fishmeal in diets for juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 448:578-585 doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.049
- Lin S (2010) Effects of four vegetable protein supplementation on growth, digestive enzyme activities, and liver functions of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Journal of the world aquaculture society* 41:583–593.

- Mambrini M, Roem AJ, Cravèdi JP, et al (1999) Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J Anim Sci 77:2990–2999. doi: /1999.77112990x
- Maroux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog intestinal brush border. Biochim Biophys Acta 321:282–295.
- Márquez L, Øverland M, Martínez-Ilorens S, et al (2013) Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 384–387:46–55. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.12.008
- Medale F, Boujard T, Vallée F, et al (1998) Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. Aquat Living Resour 11:239–246.
- Medale F, Guillaume J (1999) Nutrition énergétique. In : Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R, Eds. Nutrition des poissons et des crustacés. Paris INRA 87–111.
- Morais S, Pratoomyot J, Taggart JB, et al (2011) Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. BMC Genomics 12:255. doi: 10.1186/1471-2164-12-255.
- Nan B, Qin JG, Carragher JF, et al (2007) deleterious effects of food restrictions in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* during early development. 271:326–335. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.016
- Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. ILAR J 50:343–360. doi: 10.1093/ilar.50.4.343
- Nordrum S, Bakke-McKellep AM, Krogdahl A, Buddington RK (2000) Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 125:317–335.
- NRC (2011) National Research Council. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, DC
- Oliva-teles ACPEHPA (2012) Temperature and dietary starch level affected protein but not starch digestibility in gilthead sea bream juveniles. Fish Physiology and Biochemistry. 38:595-601. doi: 10.1007/s10695-011-9537-5
- Olsvik P a, Lie KK, Jordal A-EO, et al (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. BMC Mol Biol 6:21. doi: 10.1186/1471-2199-6-21

- Ostaszewska T, Dabrowski K, Kamaszewski M, et al (2010) The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 157:158–169. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.06.162
- Palti Y, Silverstein JT, Wieman H, et al (2006) Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 255:548–556. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.029
- Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-juan E, et al (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294:123–131. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.05.013
- Pfaffl MW, Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pierce LR, Palti Y, Silverstein JT, et al (2008) Family growth response to fish meal and plantbased diets shows genotype × diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 278:37–42. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.017
- Quinton CD, Kause A, Ruohonen K, Koskela J (2007) Genetic relationships of body composition and feed utilization traits in European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) and implications for selective breeding in fishmeal- and soybean meal-based diet environments. *J Anim Sci* 85:3198–3208. doi: 10.2527/jas.2006-792
- Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, et al (2007) Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 22:510–519. doi: 10.1016/j.fsi.2006.07.002
- Quillet E, Krieg F, Dechamp N, et al (2014) Quantitative trait loci for magnitude of the plasma cortisol response to confinement in rainbow trout. *Anim Genet* 45:223–234. doi: 10.1111/age.12126
- Refstie S, Korsoen OJ, Storebakken T, et al (2000) Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190:49–63. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00382-3
- Reyes M, Velazquez E, Hernandez L, Araiza M (2015) Effect of the substitution of fish oil with a mixture of plant-based oils in diets of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss walbaum*) fingerlings on growth, phosphorus and nitrogen excretion. *Isr J Aquac* 67:1–9.
- Rungruangsak-Torrissen K, Moss R, Andressen L, et al (2006) Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) expression T/C ratio. *Fish Physiol* 7–23. doi: 10.1007/s10695-005-0630-5

- Sadoul B, Foucard A, Valotaire C, et al (2016) Adaptive capacities from survival to stress responses of two isogenic lines of rainbow trout fed a plant-based diet. *Nat Publ Gr* 1–11. doi: 10.1038/srep35957
- Sadoul B, Leguen I, Colson V, et al (2015) A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress. *Physiol Behav* 140:139–147. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.12.006
- Sahlmann C, Gu J, Kortner TM, et al (2015) Ontogeny of the digestive system of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and effects of soybean meal from start-feeding. *PLoS One* 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0124179
- Santigosa E, Garc I, Maria J, et al (2011a) Plant oils' inclusion in high fish meal-substituted diets: effect on digestion and nutrient absorption in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac Res* 42:962–974. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02679.x
- Santigosa E, García-Meilán I, Valentin JM, et al (2011b) Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 317:146–154. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.04.026
- Santigosa E, Sánchez J, Médale F, et al (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282:68–74. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.007
- Sarıyüyoğlu M (2000) Histological study in the digestive tract on larval development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Turkish J Zool* 24:199–205.
- Sato T, Mushiake S, Kato Y, et al (2007) The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* 448:366–9. doi: 10.1038/nature05929
- Smith, R.R., Kincaid, H.L., Regenstein, J.M., Rumsey, G.L., 1988. Growth, carcass composition, and taste of rainbow trout of different strains fed diets containing primarily plant or animal protein. *Aquaculture* 70, 309–321.
- Terova G, Robaina L, Izquierdo M, et al (2013) PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *Springerplus* 2:17. doi:10.1186/2193-1801-2-17
- Torstensen BE, Espe M, Sanden M, et al (2008) Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285:193–200. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.025
- Vallée Marcotte B, Cormier H, Guénard F (2016) Novel genetic loci associated with the plasma triglyceride response to an Omega-3 Fatty acid supplementation. *J Nutr Nutr* 9:1–11.

- Vilhelmsson OT, Martin S a M, Médale F, et al (2004) Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Br J Nutr 92:71–80. doi: 10.1079/BJN20041176
- Wei Y, Liang M, Mu Y, et al (2016) The effect of ultrafiltered fish protein hydrolysate level on growth performance, protein digestibility and mRNA expression of PepT1 in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*). 1006–1017. doi: 10.1111/anu.12319
- Yamamoto T, Shima T, Furuita H, Suzuki N (2002) Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 214:289–305.
- Yúfera M, Moyano FJ, Astola A, et al (2012) Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. PLoS One 7:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0033687



## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**





## 9 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Face au défi actuel qui contraint les aquaculteurs à alimenter les poissons carnivores avec des régimes contenant de moins en moins de farines et d'huiles de poisson, la composition des aliments utilisés pour nourrir les truites arc-en-ciel inclut une proportion de plus en plus élevée d'huiles et de farines d'origine végétale. Les taux de substitution utilisés en élevage de truites n'ont cessé d'augmenter depuis les années 1995 et atteignent maintenant au moins 90 % pour les farines de poisson (Burel and Medale 2014), et 75 % pour les huiles de poisson (Turchini et al. 2013). Ces ingrédients alternatifs ayant été retenus jusqu'à présent, pour des considérations économiques et sanitaires.

Une incorporation importante de farines ou d'huiles d'origine végétale peut être délivrée aux poissons, sans trop affecter leurs performances de croissance, lorsqu'elles ne sont pas simultanées. Au contraire, des substitutions doubles, réalisées à des taux importants, entraînent une forte mortalité et diminuent de façon importante les performances zootechniques des poissons. Réaliser des études nutritionnelles sur des poissons nourris avec des aliments, dont à la fois l'huile et la farine sont totalement d'origine végétale, permet d'observer certains effets biologiques pouvant être masqués lors de substitutions partielles et/ou non conjointes. Il a donc été choisi d'étudier la réponse des truites soumises à des aliments totalement et simultanément substitués par de l'huile et de la farine d'origine végétale. De plus, les résultats de précédentes études nutritionnelles ont montré l'existence d'une forte variabilité d'origine génétique dans la réponse des truites aux aliments alternatifs. Aussi il a été décidé d'avoir recours à des lignées isogéniques de truites qui divergent sur leurs performances de croissance, lorsqu'elles sont alimentées avec un aliment à base d'huile et de farine totalement d'origine végétale. Nous avons en effet cherché à expliquer leurs différentes performances de croissance par certains indicateurs biologiques en lien avec la digestion et l'absorption. Le déterminisme de l'aliment et du génome de l'hôte sur le système digestif sont à prendre en considération car des baisses de digestibilité protéiques et lipidiques ont déjà été rapportées chez des truites nourries avec des végétaux. Elles ont été expliquées par une perturbation de leur capacité digestive.

Lors de cette thèse, les différentes capacités digestives des truites ont été évaluées par PCR quantitative, au travers de l'expression des gènes codant pour les principales enzymes de la digestion et pour les principaux transporteurs de nutriments. Puisque certaines régulations

traductionnelles et post-traductionnelles interviennent souvent au niveau des enzymes de la digestion, les capacités de digestion ont été évaluées par la mesure de l'activité enzymatique de certaines enzymes impliquées dans la digestion.

De plus, une possible contribution du microbiote intestinal, dans la réponse des truites aux végétaux, a également été examinée à partir de la description des communautés microbiennes associées à la muqueuse de l'intestin distal par une approche métagénomique. L'objectif étant de regarder si les différences de génotypes de l'hôte et si les différents régimes alimentaires conduisent à des communautés microbiennes intestinales différentes au niveau de la muqueuse. Des différences de communautés pouvant en effet être impliquées dans la bonne ou la mauvaise réponse des truites aux végétaux, étant donné la contribution du microbiote intestinal dans l'homéostasie des cellules de l'intestin. Deux stades ont été étudiés lors de cette thèse : le stade alevin et le stade juvénile. L'importance d'étudier ces deux stades ne se justifie pas uniquement par leurs différents besoins nutritionnels. Il est important d'étudier le stade alevin dans la mesure où, dès le premier repas sous une alimentation végétale, le décrochage de la croissance débute et de fortes mortalités sont observées lors d'un régime végétal total. De plus, c'est à ce moment que la maturation de l'appareil digestif s'effectue, ce qui rend important la compréhension de la réponse au changement de régime, dès ce stade.

Le stade juvénile a été retenu, car il correspond à un stade de durée plus longue pour les truites avant leur abattage. Pour des raisons pratiques, l'étude du déterminisme génétique et alimentaire, sur les capacités digestives des alevins, s'est uniquement déroulé au niveau transcriptomique. Par contre, le matériel à disposition chez les juvéniles a rendu possible l'investigation des capacités digestives par une approche transcriptomique et également par la mesure de l'activité enzymatique, ainsi que la caractérisation des communautés microbiennes associées à la muqueuse digestive par la métagénomique.

Les travaux menés dans cette thèse ont donc permis d'identifier des enzymes de la digestion ainsi que des protéines réalisant le transport des nutriments, lors de l'absorption intestinale, dont la transcription et/ou l'expression protéique est sensible au changement de régime. La transcription et/ou l'activité de ces enzymes et de ces transporteurs pouvant alors servir d'indicateurs pour la sélection d'individus bons répondants à l'alimentation végétale, ainsi que pour le choix de nouvelles formulations alimentaires. Les travaux menés dans cette thèse ont également permis de déterminer comment les communautés bactériennes répondent au changement de régime, en fonction du génotype de leur hôte. Certaines

classes de bactéries étant davantage sélectionnées par l'aliment, tandis que d'autres sont davantage sélectionnées par le génotype de l'hôte.

Les résultats obtenus ont permis de constater que les capacités digestives de la truite sont différemment impactées par le changement de régime alimentaire, suivant le stade considéré et le génotype de l'hôte. Certaines voies métaboliques impliquées dans la digestion et l'absorption des nutriments semblent plus sensibles à la substitution végétale, et il pourrait être intéressant de les analyser davantage.

## **9.1 Quels acteurs de la digestion et de l'absorption intestinale sont les plus impactés par le changement de régime alimentaire ?**

### **9.1.1 Au stade alevin**

Les effets de l'alimentation et du génotype de l'hôte se sont traduits, au niveau du tractus digestif, par quelques différences d'expression de gènes entre les individus soumis à l'alimentation marine et ceux soumis à l'alimentation végétale. Les truites de la lignée R23h étant celles qui ont démontrées les meilleures capacités de croissance sous une alimentation végétale lors du stade alevin, à contrario des truites de la lignée A22h moins aptes à maintenir une croissance similaire.

#### **9.1.1.1 Réponse physiologique de l'estomac au changement d'alimentation**

Au niveau de l'estomac, le pepsinogène est davantage exprimé chez les truites des lignées A22h et AB1h, nourries avec un aliment végétal. Cette tendance est également observée chez les truites de lignée R23h, mais de façon moins prononcée. Aucune différence significative dans la transcription de la gastrique n'apparaît.

La mise en place et le développement de l'estomac ayant lieu lors du stade alevin vers le 25<sup>ème</sup> jour après l'éclosion chez les salmonidés élevés à 10°C (Dabrowski 1984b).

Une différence de maturité digestive pourrait être l'une des premières hypothèses avancées pour expliquer la différence de transcription observée. Cependant, au sein des deux lignées A22h et AB1h, les truites nourries avec l'aliment végétal et qui présentent une transcription plus élevée du pepsinogène, étaient de poids plus faible que celles nourries avec l'aliment marin. Leur développement n'était donc, a priori, pas plus avancé que celui des truites nourries avec l'aliment marin. De plus, bien que l'étude de Dabrowski décrive les différentes étapes morphologiques présentes lors de l'ontogenèse digestive chez les salmonidés (Dabrowski 1984a), à priori, il n'existe pas de publication sur l'évolution du

rapport viscéro-somatique chez l'alevin qui pourrait aider à interpréter ces résultats. Chez la larve de bar, qui est aussi un poisson carnivore, il a été décrit une plus forte activité enzymatique de la pepsine chez les individus de plus faible poids (Infante and Cahu 1994). Il est donc encore difficile de proposer au stade d'avancement de nos recherches, l'activité enzymatique ou la transcription de la pepsine seule comme indicateur de maturité digestive.

#### **9.1.1.2 Réponse physiologique du pancréas exocrine au changement d'alimentation**

Le pancréas exocrine contribue à la digestion via la synthèse du trypsinogène, de la phospholipase et d'autres enzymes digestives. Il a été constaté une transcription plus importante du chymotrypsinogène, chez les poissons nourris avec l'aliment végétal et dont le poids était plus faible que celui de leurs congénères nourris avec l'aliment marin. La différence de poids des individus et donc de développement de leur tractus intestinal, peut avoir contribué aux différences de transcription. A titre de comparaison, il a été observé, lors de l'ontogénèse digestive chez la truite, un pic de l'activité de la chymotrypsine, entre le 15 et 18<sup>ième</sup> jour après éclosion, cependant cette augmentation transitoire a été attribuée à une réponse au premier repas des alevins (Golchinfar et al. 2011). Des variations cycliques de l'activité de la chymotrypsine, lors de l'ontogénèse digestive, ont aussi été remarquées chez le Cichlidé Maya (*Cichlasoma urophthalmus*), poisson d'eau douce carnivore ou omnivore. Cependant, celles-ci ont été associées au premier repas des poissons, ainsi qu'à un changement de leur alimentation 15 jours après leur éclosion (Lopez-Ramirez et al. 2011). Chez le bar (*Dicentrarchus Labrax*), une augmentation jusqu'au 12<sup>ième</sup> jour après éclosion, suivi d'un plateau, puis d'une diminution jusqu'au 23<sup>ième</sup> jour après éclosion, pour atteindre un niveau d'activité plus stable a été rapporté sur les variations d'activités enzymatiques de la trypsinase, et de l' $\alpha$ -amylase (Zambonino et al. 1994 ; Cahu and Infante 1995). La plus forte transcription de trypsinase et de chymotrypsine observée chez des individus nourris avec une alimentation végétale est donc délicate à interpréter, en l'absence de données complémentaires. Les résultats de ces précédentes études laissent à penser que les différences de transcription observées en enzymes digestives, entre les individus nourris avec l'aliment marin et végétal, s'expliquent par leurs différences de poids. Il est également possible qu'une transcription plus élevée des enzymes pancréatiques soit impliquée dans un mécanisme de compensation, en réponse à un déficit d'absorption en acides-aminés, mais que celui-ci ne soit pas suffisant pour permettre aux alevins nourris avec un aliment végétal de rattraper leur retard de croissance. Une telle réponse biologique a pareillement été constatée, chez la truite au stade juvénile, lors de substitution partielle de la farine de

poisson avec de la farine de soja. En effet, les truites nourries avec un aliment végétal présentaient une plus forte activité enzymatique de la trypsine dans le segment distal de leur intestin (Romarheim et al. 2008).

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette augmentation. Soit une plus forte activité de la trypsine est le résultat d'une augmentation de sa transcription par le pancréas, soit elle s'explique par une diminution de sa recapture par l'intestin distal siège d'une inflammation (Romarheim et al. 2006). Cette tendance, à l'augmentation de l'activité de la trypsine dans le segment distal de l'intestin, chez les truites nourries avec de la farine de soja, a été aussi signalée par Romarheim (2006) et attribuée à une baisse de la recapture de la trypsine par inflammation intestinale, ou à une synthèse d'une trypsine-like protéine suite à l'inflammation de l'intestin distal. Une augmentation transitoire de l'activité de la trypsine a également été remarquée au niveau des segments intestinaux proximaux, qui constituent le premier lieu de passage de la trypsine, suite à sa sécrétion par le pancréas. Cette variation temporelle s'est traduite par une activité significativement augmentée de la trypsine au niveau du segment de l'intestin proximal chez les individus nourris avec l'aliment végétal aux alentours du 5<sup>ème</sup> jour suivant le changement de régime, puis par une baisse de son activité chez les individus nourris avec de la farine de soja aux alentours du 40<sup>ème</sup> jour suivant la substitution. Cependant ces variations n'ont pas été interprétées. Une hypertrophie du pancréas, chez le poulet, a déjà été attribué à une réponse de l'organisme aux inhibiteurs de protéase, présents dans la farine de soja (Rocha et al. 2014). Cette hypothétique hypertrophie des tissus pancréatique exocrine peut donc être avancée pour expliquer la plus forte transcription de chymotrypsine observée chez les individus nourris avec l'aliment végétal et de plus petits poids. Cette hypothèse pourrait être vérifiée, en suivant la transcription des enzymes pancréatiques chez l'alevin, à plusieurs pas de temps, entre leur premier repas et jusqu'à 40 jours après leur premier repas. En effet, étant donné que le pancréas exocrine de la truite se caractérise comme un tissu diffus autour des caecae pylorique, il semble difficile de discerner son hypertrophie macroscopiquement (Polakof et al. 2012). L'observation, chez les individus nourris avec un aliment végétal, d'une transcription d'enzymes pancréatiques significativement plus importante, suivie d'une transcription significativement plus faible, pouvant évoquer une hypertrophie du tissu pancréatique en réponse aux inhibiteurs de protéases, suivie de son épuisement. Sous réserve de vérifier cette hypothèse, et d'en déterminer la fenêtre d'observation, une plus forte transcription d'enzymes pancréatiques, chez l'alevin, pourrait être considérée comme un indicateur de formulation alimentaire non adaptée aux poissons. Il pourrait être vérifié

que les inhibiteurs de protéases provoquent cette réponse, en observant l'effet de leur ajout à un aliment riche en farines de poisson et sans farine de soja. Si cet indicateur est pris en considération, l'objectif serait alors de trouver des aliments, n'induisant pas d'augmentation significative de la transcription des gènes codant pour des enzymes pancréatiques, chez les alevins nourris avec l'aliment à tester, par rapport aux alevins nourris avec un aliment marin. La durée de cette réponse étant à prendre en compte pour interpréter au mieux les résultats.

### **9.1.1.3 Réponse physiologique de l'intestin au changement d'alimentation**

Au niveau de l'intestin, l'expression de SGLT1, CCK-t et de l'IAP est significativement augmentée chez les truites de la lignée A22h répondant moins bien à l'alimentation végétale. Puisqu'il a été rapporté que la cholécystokinine, la leptine et la gastrine sont impliquées dans la régulation du transporteur SGLT1 (Ostaszewska et al. 2010b), la régulation du transporteur SGLT1 par la CCK-t est à présumer. Les variations de transcription en CCK-t, ont déjà été attribuées à la faible teneur du phospholipide phosphatidylcholine dans les aliments formulés avec des huiles d'origine végétale et avec de la lécithine de soja (Azarm et al. 2013). L'activation de la transcription de la CCK-t a également été attribuée à la stimulation de TIR1 et TIR3, qui sont des récepteurs sensoriels intestinaux des acides aminés phénylalanine, leucine, et glutamine, présents au niveau des cellules souches (Daly et al. 2013). Etant donné l'implication de la CCK-t dans la sécrétion pancréatique, il serait intéressant de suivre les niveaux de transcription de la gastrine, et de la leptine, afin de regarder si ces hormones montrent les mêmes variations que la CCK-t. Il pourrait aussi être utile de suivre les niveaux de transcription de TIR1 et de TIR3 chez des alevins, afin de vérifier s'ils sont corrélés à ceux de la CCK-t. De plus, afin de déterminer si les variations d'expression de la cholécystokinine peuvent être attribuées à des différences de teneur en phosphatidylcholine, phénylalanine, leucine ou glutamine, il serait judicieux de suivre le niveau de sa transcription chez des alevins alimentés avec des régimes formulés avec différentes teneurs en phosphatidylcholine et en ces acides aminés.

La transcription du transporteur apical de glucose SGLT1 est augmentée sous l'effet de l'alimentation végétale, uniquement chez les lignées A22h et AB1h, alors que la transcription du transporteur de glucose basal GLUT2 n'est diminuée, par ce régime, que chez les truites de la lignée R23h. La teneur en amidon étant plus réduite dans l'aliment végétal que dans l'aliment marin, il est alors possible de penser qu'il existe une différence significative du transport de glucose entre ces deux groupes de lignées : soit les truites de la

lignée R23h, qui montrent une meilleure croissance sous une alimentation végétale, ne sont pas en déficit de glucose circulant, et n'augmentent pas la transcription de transporteurs de sucre, soit par hypothèse proche, les truites des lignées A22h et AB1h, qui sont en déficit de glucose circulant sous une alimentation végétale, augmentent la transcription de leurs transporteurs, comme stratégie compensatoire pour en favoriser l'absorption. Au vu de ces résultats, une augmentation de la transcription des transporteurs SGLT1, sous une alimentation végétale, peut être considérée comme indiquant une plus faible capacité à valoriser les aliments végétaux, tandis qu'une diminution de la transcription du transporteur GLUT2 peut être considérée comme signalant une meilleure capacité à valoriser les végétaux.

Pour déterminer si une augmentation de la transcription en SGLT1 est effectivement signe d'une déficience en glucose circulant, il pourrait être intéressant d'examiner au niveau hépatique comment certains gènes, (dont le gène du fructose-1,6-bisphosphate) (Marandel et al. 2016; Rolland et al. 2016), impliqués dans la régulation de la glycémie, sont régulés par rapport à l'expression de SGLT1. De même, la transcription du transporteur PEPT1, impliqué dans l'absorption des dipeptides, est augmentée sous une alimentation végétale, chez les truites de la lignée A22h. Une étude des variations de transcriptions hépatiques de certains gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, pourrait permettre de vérifier si une augmentation de la transcription en PEPT1 compense un déficit en acides aminés circulants. C'est-à-dire que si une augmentation de la transcription d'enzymes assurant la production d'acides aminés est observée dans le foie, chez les poissons nourris avec un aliment végétal, en comparaison de poissons nourris avec un aliment marin, et qu'en plus cela se traduit par une augmentation de la transcription du transporteur PEPT1 dans l'intestin, alors il est possible de suspecter que les poissons nourris en alimentation végétale déclenchent une réponse physiologique au déficit d'absorption en acides aminés. Si au contraire, une augmentation de la transcription du transporteur PEPT1 au niveau de l'intestin est observée chez les poissons nourris avec un aliment végétal sans augmentation significative d'enzymes hépatiques productrices d'acides aminés, alors il est possible de suspecter que la capacité de transport en acides aminés de l'intestin des poissons nourris avec un aliment végétal est augmentée. Les enzymes hépatiques alanine aminotransférase et glutamate déshydrogénase font partie de la liste des enzymes pouvant servir d'indicateur de déficit en acides aminés circulant (Rolland et al. 2016).



#### **9.1.1.4 Difficultés rencontrées pour déterminer l'impact du changement d'alimentation sur l'ontogenèse du tractus digestif**

La différence de poids des alevins, entre les différents régimes alimentaires, a rendu difficile l'analyse des résultats de cette étude. Il serait préférable, pour de prochaines études sur les alevins, d'échantillonner plusieurs lots, à différents pas de temps après l'éclosion, afin de comparer des résultats de transcription, sur des poissons dont le poids soit significativement similaire. Un premier mode opératoire semble être le plus simple à réaliser. Il nécessite de surveiller la croissance des alevins et d'effectuer leur prélèvement en fonction du poids, pour disposer de lots d'alevins d'âge différent, mais dont le poids ne soit pas significativement différent. Une autre approche, plus fastidieuse, lors de l'étape d'interprétation des données peut également être choisie, afin d'interpréter les résultats de transcription des gènes chez des alevins de même âge. Il serait nécessaire de suivre la transcription des gènes étudiés, chez des alevins nourris avec un même aliment, jusqu'à ce qu'ils aient atteint un certain poids. L'objectif étant de déterminer, si le niveau de transcription des gènes suivis, est significativement dépendant du poids des poissons, à partir d'extractions d'ARN réalisées sur des poissons entiers. Il faudrait dissocier les gènes dont la transcription est impactée par le poids, des gènes qui ne le sont pas, et déterminer le sens de variation de l'expression de ces gènes en fonction du poids des poissons. En résumé, si la transcription des gènes étudiés n'est pas impactée par le poids, la comparaison de transcription, en fonction de l'aliment, peut se faire chez des alevins de même âge, mais dont le poids est significativement différent, sans inclure le poids comme co-variable au sein des modèles statistiques d'analyse de données. Pour les gènes dont l'expression varie avec le poids de l'alevin, il serait nécessaire, pour chacun d'entre eux, d'estimer le niveau de leur augmentation ou de leur diminution de transcription, par rapport au niveau de leur expression observée chez des alevins dont un poids aurait été choisi comme référence. Le poids au premier repas peut être choisi comme référence, en prenant la précaution de distribuer le premier repas à des larves de même poids, lors des différentes études, et de vérifier que son ingestion soit effective lors de la première distribution. Un autre stade peut également être choisi comme référence, étant donné que le premier repas provoque une stimulation de l'alevin. Ce mode opératoire implique de réaliser les différentes études sur des alevins dont le poids, au premier repas, ne soit pas significativement différent. Il ne permet cependant pas de s'affranchir de l'effet de dominance, du stress, ou du délai d'ingestion du premier repas, entre les différents alevins. Cette description pourrait cependant permettre d'attribuer une pondération à l'expression des gènes observée chez

les poissons nourris avec un aliment végétal, en fonction de leur poids, lors du traitement des données. Cette approche laisse en retrait l'effet de l'âge dans l'interprétation des résultats, mais il semble difficile de proposer un modèle expérimental qui permette de l'étudier, en parallèle du poids, sans faire varier la température ou une autre variable environnementale.

#### **9.1.1.5 Données complémentaires pouvant aider à la compréhension du retard de maturation digestive chez les alevins nourris avec l'aliment végétal**

Il a été rapporté que le microbiote intestinal est impliqué dans la maturation du système digestif chez le poisson, cependant il manque encore des études qui permettent d'établir un lien entre les changements se déroulant au sein du tractus digestif lors de l'ontogénie, et les modifications du microbiote intestinal (Li et al. 2017). Plus particulièrement, il pourrait être intéressant de décrire en parallèle le changement de morphologie du système digestif, la mise en place du gradient de teneur en oxygène entre les différents segments intestinaux, la mise en place des variations de pH suite au développement de l'estomac et aux sécrétions pancréatiques, la modification de composition et des propriétés physiques du mucus, l'évolution des capacités digestives, et les modifications des communautés microbiennes (bactéries et levures) intestinales.

#### **9.1.2 Au stade juvénile**

Les résultats de digestibilité en protéines, lipides, et amidon constituent les premiers indicateurs macroscopiques qui permettent d'évaluer les performances de digestion et d'absorption des truites, lorsqu'elles sont soumises à différents régimes alimentaires (Belal 2005). Leurs valeurs observées lors de l'étude de nutriginomique, montrent que la digestion et l'absorption des lipides et de l'amidon sont plus impactées que celles des protéines par la substitution alimentaire. Une détérioration de certains acteurs de la digestion et/ou de l'absorption des lipides et de l'amidon, entraînerait un amoindrissement des performances de digestion, et donc indirectement, de celles de la croissance. Cette contribution des performances de digestion et d'absorption des lipides, est d'autant plus probable, que le niveau en triglycérides plasmatiques est diminué chez les poissons recevant une alimentation végétale (PB) et appartenant à la lignée « mauvaise répondante à l'alimentation PB en matière de croissance ». Par contre, le niveau en triglycérides plasmatiques est augmenté par une alimentation végétale (PB) chez les poissons d'une des lignées « bonne répondante à l'alimentation PB en matière de croissance ». Cependant, les

résultats de niveaux en acides aminés totaux observés, nuancent ces premiers a priori, sur l'absence de baisse significative des performances de digestion et/ou d'absorption des protéines et des acides aminés.

Etant donné qu'il n'y a que chez les poissons d'une des deux lignées tolérantes à l'alimentation PB que les niveaux plasmatiques en acides aminés totaux ne sont pas diminués par l'alimentation végétale (PB), il peut aussi être supposé qu'une détérioration de certains acteurs de la digestion et/ou de l'absorption des protéines et acides aminés soit impliquée dans l'amoindrissement des performances d'absorption intestinale, et donc indirectement, dans celles de la croissance.

- **Potentiels acteurs de la digestion et de l'absorption des lipides, impactés par l'alimentation végétale et contribuant aux baisses de performance de croissance observées**

Les résultats de digestibilité et de niveaux plasmatiques laissent à penser, que les lipides sont les principaux nutriments, dont la digestion et l'absorption sont impactées par l'alimentation végétale. Quelques acteurs, contribuant à leur digestion et/ou leur absorption, ont été suivis au niveau de l'expression de leur gène et/ou de leur activité enzymatique : la lipase gastrique, la phospholipase A2, et le transporteur « microsomal transfer protein » MTP.

La substitution végétale, et non la baisse d'ingestion provoque chez les trois lignées une baisse de l'activité enzymatique de la phospholipase A2 dans l'intestin, ainsi qu'au niveau des caeca pyloriques. Cette baisse d'activité de la phospholipase A2 n'étant visiblement pas due à une baisse de la transcription en phospholipase A2, puisqu'aucune variation significative de l'expression du gène codant pour cette enzyme n'a été observée. D'après une précédente étude menée chez la truite, cette réponse pourrait être due à une plus faible teneur en phosphatidylcholine, dans la lécithine de soja utilisée comme source de phospholipides. Bien que non vérifiée, si cette hypothèse est vraie, d'après la même étude cette plus faible teneur en phosphatidylcholine laisse présager, en plus de la baisse d'activité de la phospholipase A2, que la fluidité des membranes cellulaires intestinales est impactée, ce qui peut affecter le transport des lipides. Il y a peut-être également une diminution de la formation de chylomicrons nécessaires à l'absorption intestinale des lipides, et une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes, qui témoignent d'une perturbation de l'absorption des lipides.

Les résultats de transcription d'un des transporteurs de lipides : la MTP « microsomal transfer protein », tendent à confirmer cette hypothèse, mais sont difficilement interprétables, étant donné que l'effet de la restriction alimentaire intervient, et que la substitution végétale seule n'engendre pas de baisse de transcription. La vérification de l'hypothèse, d'une perturbation du transport des lipides due à une plus faible teneur en phosphatidylcholine, pourrait se faire par le dosage de la teneur en phosphatidylcholine dans les différents aliments, et par un suivi du transport lipidique au niveau de l'intestin, par histologie, en étudiant la densité en gouttelettes lipidiques présentes dans les entérocytes des truites nourries avec différents aliments. Sous réserve de vérifier cette hypothèse, l'activité de la phospholipase A2 semble être un bon indicateur rapportant les performances de digestion et d'absorption des lipides. Sa régulation post-transcriptionnelle reste à confirmer avant d'étudier plus en détail les mécanismes impliqués dans cette régulation.

Etant donné la baisse de transcription du gène MTP chez les lignées de truites A22h et AB1h soumises à une alimentation végétale, un déficit du transport des lipides peut être suspecté. Bien que l'importance de la teneur en phospholipides dans l'aliment ait été soulignée au stade alevin, mais pas au stade juvénile, le recours à l'histologie, pour visualiser d'éventuelles gouttelettes lipidiques au sein des entérocytes (Daprà et al. 2011), et l'étude de la transcription intestinale de l'enzyme lysophosphatidylcholine acyltransférase impliquée dans le transport des phospholipides, pourrait permettre d'étudier davantage les perturbations du transport des lipides (Bouchoux et al. 2011). De plus le recours à une palette d'aliments offrant une gamme de lipides neutres et de phospholipides, permettrait de proposer un pourcentage d'EPA et de DHA à atteindre, lors des formulations alimentaires, afin de garantir les meilleurs résultats en terme de croissance, de survie, de développement et de maturation digestive (Gisbert et al. 2005).

Les capacités digestives ont été étudiées à partir de segments d'intestin entier sur les lignées isogéniques. Cependant pour des études ultérieures, il serait peut-être préférable d'étudier soit le segment proximal ou alors, les segments antérieurs et distaux considérés séparément. En effet, la zone d'absorption est davantage localisée au niveau de l'intestin proximal, tandis que les segments distaux sont le lieu d'absorption de molécules endogènes par pinocytose (Ferraris and Ahearn 1984). De plus, en cas d'insuffisance d'absorption au niveau antérieur, une prise de relais de l'absorption s'établit au niveau des segments distaux. Ainsi, une augmentation des capacités digestives sur les segments plus distaux peut témoigner d'une insuffisance d'absorption au niveau des segments plus proximaux, et donc

à priori d'une formulation inadaptée des aliments aux besoins de la truite arc-en-ciel (Santigosa et al. 2011b).

Les études menées au sein de cette thèse montrent donc, que chez la truite en stade juvénile, le génotype de l'hôte et le régime alimentaire affectent significativement l'expression de certaines enzymes digestives ou de certaines protéines transporteurs, impliquées dans l'absorption intestinale. De plus, la maturité et la physiologie de l'épithélium intestinal, ainsi que d'autres organes de l'appareil digestif, tel que le foie (Vajro et al. 2013; Scheithauer et al. 2016) et le pancréas (Hill et al. 2016), dépend du profil des communautés bactériennes présentes au niveau des portions proximales et distales de l'intestin. Sa caractérisation a été réalisée au niveau de la muqueuse digestive chez les lignées isogéniques de truites, en fonction de l'aliment qu'elles ont reçu. Il a été constaté que la nature de l'aliment impacte davantage le profil des communautés bactériennes, que ne le fait le génotype de l'hôte, et que certains phylums bactériens sont plus sensibles au type d'alimentation reçu, alors que d'autres sont plus sensibles au génotype de l'hôte. Etant donné l'implication du microbiote dans l'homéostasie intestinale, il serait intéressant de rechercher quelques facteurs capables d'orienter son profil, ainsi que d'étudier sa fonctionnalité.

## **9.2 Quels sont les indicateurs d'écologie bactérienne potentiellement impliqués dans la bonne ou mauvaise aptitude des truites à répondre au changement de régime alimentaire.**

Le microbiote associé à la muqueuse de l'intestin distal de la truite a été caractérisé chez les lignées de truites soumises aux différents régimes. Les principaux phyla rencontrés étant ceux des Protéobactéries (abondance moyenne de 67.27 %), des Firmicutes (abondance moyenne de 9.79 %), des Actinobactéries (7.46 %), des Tenericutes (7.37 %), et des Fusobactéries (5.49 %). Les Protéobactéries rencontrées étant principalement composées de Gammaprotéobactéries (28.6 %), d'Alphaprotéobactéries (22.17 %), et de Bétaprotéobactéries (15.82 %). Il a été possible de décrire une core communauté associée à la muqueuse intestinale des truites, indépendamment de leur régime alimentaire ou de leur génotype. Cette core communauté est composée de 17 OTU, dont principalement des bactéries appartenant au genre *Moraxella* (de la classe des Gammaprotéobactéries), *Massilia* (de la classe des Bétaprotéobactéries), et de *Brevundimonas* et *Paraccocus* (de la classe des Alphaprotéobactéries). La caractérisation des différentes communautés

bactériennes associées aux différents génotypes et aux différents régimes a permis de regarder, si certains indicateurs de diversité témoignaient de l'aptitude des truites à bien répondre au changement de régime. Les principaux retenus étant l'indice d'Evenness, l'abondance en certains taxons ou regroupement de taxons particuliers, et la mesure de  $\beta$ -diversité.

### **9.2.1 Apport des lignées isogéniques pour déterminer l'impact de l'alimentation et du génotype sur les principaux indices de diversité**

Déterminer les effets respectifs du génotype et de l'alimentation sur les indices de diversité nécessite de disposer de poissons dont les variations de composition des communautés bactériennes entre les individus soient le plus faible possible. Cette homogénéité de composition bactérienne du microbiote intestinal des poissons, comme celle des mammifères, fait souvent défaut (Gatesoupe et al. 2016). Elle n'a été observée que sur une des six conditions étudiées, à savoir sur le microbiote intestinal de la lignée A22h, nourrie avec l'aliment végétal.

Pourtant, la nécessité de disposer de modèles biologiques, dont le microbiote intestinal entre les individus soit le moins variable, est fortement recommandée pour faciliter l'analyse des données (Stephens et al. 2015). Une alternative pour permettre un traitement statistique de ces données avec beaucoup de dispersion est d'augmenter le nombre d'échantillons observés par condition. Bien que le modèle expérimental était constitué de lignées isogéniques, cette faible variabilité a été très peu observée. Une variation du microbiote intestinal, entre différents individus de même lignée isogénique de souris, a également été rapportée (Li et al. 2015a). Ces observations laissent à penser que la similitude de patrimoine génétique entre individus n'est pas un caractère suffisant pour disposer d'individus ayant des communautés bactériennes intestinales qui soient relativement similaires. Cependant, les résultats de l'étude menée dans cette thèse laissent apparaître qu'une homogénéité de la composition bactérienne est présente dans certaines conditions (lignée A22h nourrie avec l'aliment végétal). L'existence de certaines lignées isogéniques porteuses de microbiote intestinal dont le profil inter-individu est plus faible que celui observé chez d'autres lignées isogéniques a également été relaté chez la souris. Les hypothèses proposées pour expliquer cette différence d'homogénéité bactérienne entre les lignées, étant un gradient de facteurs génétiques propres à l'hôte, mais aucun gène candidat n'a été proposé (Campbell et al. 2012). Bien que cela ne soit pas un caractère suffisant, la similitude de patrimoine génétique entre individus permet parfois d'observer des

communautés bactériennes avec une forte similarité inter-individus. Il pourrait donc être utile de décrire le microbiote intestinal d'un nombre plus important de lignées isogéniques de truites, afin de pouvoir repérer des lignées dont le microbiote intestinal intra-lignées serait fortement similaire, et dont le microbiote intestinal inter-lignées serait au contraire dissemblable.

### **9.2.2 L'indice d'Eveness témoigne-t-il de l'aptitude des truites à tolérer une alimentation végétale ?**

L'indice d'Eveness est un indice qui mesure le poids de la dominance de certains taxons particuliers sur les autres taxons présents, au sein de la communauté bactérienne. L'indice d'Eveness est d'autant plus élevé que les différents taxons composant la communauté sont d'abondance proche. Le changement de régime alimentaire a significativement diminué l'indice d'Eveness, au sein des communautés bactériennes intestinales des trois lignées de truites. Cette chute de l'indice d'Eveness peut témoigner d'une perturbation de la communauté bactérienne chez les trois lignées de truite (Stirling and Wilsey 2001). Certains taxons bactériens ont dominé la communauté bactérienne des truites nourries avec une alimentation végétale, ce qui peut signifier qu'un effectif moindre de bactéries était métaboliquement actif au sein des truites nourries avec l'alimentation végétale, bien que cela reste à vérifier. Bien que l'indice d'Eveness n'ait pas été maintenu chez les truites caractérisées comme tolérante à l'alimentation végétale, il reste important de surveiller l'aptitude de certains poissons à conserver une communauté bactérienne dont l'indice d'Eveness ne chute pas significativement. Les individus ou les formulations alimentaires végétales n'induisant pas de chute de cet indice étant recherchés.

### **9.2.3 L'abondance de certains taxons particuliers peut-elle être évocatrice de leur implication dans l'aptitude des truites à bien répondre à une alimentation végétale ?**

L'abondance en certains taxons bactériens a été significativement impactée par le régime alimentaire et/ou le génotype de l'hôte. L'abondance en Gammaprotéobactéries étant plus importante chez les poissons nourris avec l'aliment marin, et celle en Fusobactéries chez les poissons nourris avec l'aliment végétal. Une interaction entre le génotype et le régime alimentaire ayant un effet sur l'abondance en Actinobactéries, en Alphaprotéobactéries, en Bétaprotéobactéries, Deltaprotéobactéries, et en Tenericutes. Bien que cela n'ait pas été vérifié, ni étudié davantage, une différence significative de

l'abondance de ces phyla bactériens pourrait influencer la bonne ou la mauvaise réponse des truites à l'alimentation végétale. Une augmentation significative de l'abondance en Actinobactéries, Alphaprotéobactéries, Bétaprotéobactéries, lors du passage à une alimentation végétale, a été observée dans cette étude, chez la lignée la moins tolérante à l'alimentation végétale. Au contraire, une diminution significative de l'abondance en Tenericutes lors du passage à une alimentation végétale, a été observée chez la lignée la moins tolérante à l'alimentation végétale.

L'impact significatif de l'alimentation végétale sur l'abondance en Fusobactéries, peut aussi être exploré lors de la recherche d'éléments du microbiote favorisant une bonne réponse à l'alimentation végétale. En effet, une Fusobactérie du genre *Cetobacterium* dont la séquence est très similaire avec l'espèce bactérienne *C. somerae* a été identifiée au sein de la core communauté des truites nourries avec l'alimentation végétale. *C. somerae* est une bactérie capable de synthétiser de la vitamine B12, et dont l'absence au sein du microbiote intestinal des poissons non supplémentés en vitamine B12 a été attribuée à un symptôme de déficience chez ces poissons (Sugita and Miyajima 1991; Tsuchiya et al. 2008).

La recherche de taxons bactériens, impliqués dans la bonne ou la mauvaise réponse des truites aux changements de régime alimentaire, a été faite au vu des résultats rapportés lors de précédentes études. L'incidence de l'alimentation végétale a été examinée chez les poissons carnivores (Sullam et al. 2012a). Tout d'abord, la substitution de la farine de poisson par des farines d'origine végétale affecte l'abondance de certains taxons bactériens chez le poisson. L'inclusion de farine de soja a augmenté le ratio *Firmicutes:Proteobacteria* chez la truite (Desai et al. 2012), ainsi que l'abondance en *Weissella confusia* et *Phingomonas* chez le saumon (Reveco et al., 2014). L'apport de concentré de protéines de pois modifie l'abondance en *Lactobacillacea* chez le saumon, tandis qu'un mélange de farine de soja, de pois, de tournesol, a une influence sur l'abondance en *Photobacterium*, *Pseudomonas*, et en *Firmicutes* chez la daurade (Estruch et al. 2015). Cependant, aucune de ces variations n'ont été retrouvées dans l'étude menée au cours de cette thèse. Par contre, l'effet de la substitution de l'huile de poisson par des huiles d'origine végétale est un peu plus reproductible. L'huile de lin dans l'aliment a impacté positivement l'abondance en *Enterococcus* chez le saumon, tandis que le remplacement de l'huile de poisson par un mélange d'huile de colza, de tournesol, et de lin n'a pas permis de cultiver de bactéries de l'espèce *Shewanella putrefaciens* sur des milieux de cultures bactériennes inoculées par du tractus digestif de truite arc-en-ciel, alors que de telles colonies ont été observées sur des cultures bactériennes issues de truites alimentés avec de l'huile poisson (Ringø et al. 2016).



Si les résultats obtenus dans cette thèse n'ont pas permis d'observer d'effets significatifs de la nourriture sur l'abondance en *Enterococcus*, les mêmes variations ont été observées sur l'abondance en *Shewanella*. Il peut donc être utile de surveiller l'abondance en *Shewanella* dans le microbiote des poissons. En effet, il a précédemment été observé que sa supplémentation, chez le poisson zèbre rendu axénique, avait été corrélée avec une stimulation des cellules  $\beta$  du pancréas endocrine, qui sont impliquées dans l'homéostasie du glucose, via la sécrétion de glucagon, dont l'effet principal est l'augmentation de la glycémie lors d'hypoglycémie (Hill et al. 2016). Bien que la supplémentation de la farine de poisson, soit plutôt connue pour provoquer des hyperglycémies prolongées chez la truite, et non des hypoglycémies, il a été suggéré de prendre en compte simultanément les teneurs plasmatiques en insuline et en glucagon lors des études du métabolisme énergétique chez la truite (Moon 2001).

#### **9.2.4 La mesure de $\beta$ -diversité peut-elle permettre d'identifier des individus plus aptes à tolérer une alimentation végétale ?**

Le changement de régime induit un changement de communauté bactérienne, comme le traduit les fortes valeurs de  $\beta$ -diversité totale observées entre les individus nourris avec l'aliment marin et ceux nourris avec l'aliment végétal. En effet, ces valeurs de  $\beta$ -diversité ont été estimées en moyenne à 73 % chez les individus de la lignée A22h, à 68 % chez les individus de la lignée AB1, et à 75 % chez les individus de la lignée R23h. La significativité de la dissimilarité de communauté entre les différents régimes a été observée chez les lignées A22 et AB1, et une tendance a également été observée chez la lignée R23. Ces valeurs de  $\beta$ -diversité se décomposent en parts à peu près égales, entre la richesse et le turn-over (remplacement d'un OTU par un autre), bien que seules les valeurs de turn-over soient significativement différentes entre les régimes. Malgré qu'il n'ait pas été observé que les individus répondant le mieux à l'alimentation végétale, soient ceux dont le microbiote intestinal est le moins dissimilaire lors de changement alimentaire, il semble intéressant de considérer cet indice de  $\beta$ -diversité, ainsi que ceux qui déterminent la part respective de sa composante par remplacement<sup>3</sup> (et par richesse<sup>4</sup>, lors des descriptions du microbiote intestinal des individus identifiés comme tolérant ou au contraire comme réfractaire à l'alimentation végétale.

---

<sup>3</sup> Remplacement : traduction française de l'indice de  $\beta$  diversité par 'β-turnover' (Cardoso et al. 2015).

<sup>4</sup> Richesse : traduction française de l'indice de  $\beta$  diversité par richness (en anglais).

Finalement, le régime alimentaire et le génotype des truites n'influent pas la composition des mêmes classes de bactéries : la sélection opérée par l'aliment a davantage lieu sur le turnover présent au sein des Firmicutes, tandis que la sélection opérée par le génotype de l'hôte a davantage lieu sur le turnover présent au sein des  $\beta$ -protéobactéries. Il peut donc être supposé que certains caractères phénotypiques de l'hôte soient impliqués dans la sélection de certaines  $\beta$ -protéobactéries. Il serait judicieux de mener des recherches permettant de les identifier. Les rapports de la littérature précisent cependant que les mucines et l'immunité de l'hôte sont impliquées dans cette sélection. Il serait donc intéressant d'évaluer leur contribution sur la sélection en  $\beta$ -protéobactéries.

### **9.3 Quels caractères phénotypiques de la truite peuvent expliquer les dissimilarités observées entre les différentes communautés bactériennes.**

Il a été observé que le microbiote associé à la muqueuse intestinale des truites nourries avec un aliment végétal est dissimilaire, en moyenne, à hauteur de 70 % de celui des truites nourries avec un aliment marin. De plus le génotype de l'hôte influence significativement la  $\beta$ -diversité en  $\beta$ -protéobactéries, ainsi que l'abondance en Tenericutes. Il est, par conséquent, probable que certains traits phénotypiques de l'hôte aient contribué à cette réponse du microbiote intestinal.

#### **9.3.1 Le profil du mucus intestinal peut-il expliquer le profil des communautés bactériennes intestinales rencontrées sur la muqueuse de l'intestin des poissons ?**

Les mucines sont des protéines glycosylées transmembranaires ou sécrétées, qui sont synthétisées par les cellules à mucus de l'épithélium intestinal. Elles s'assemblent sous forme de mucus et protègent l'épithélium d'une hydrolyse par les enzymes de la digestion d'origine pancréatique. Ces mucines contiennent de nombreuses chaînes O-glycanniques ou N-glycanniques qui constituent de potentiels sites de liaison pour les micro-organismes. Une hypothèse a été émise selon laquelle les motifs glycosylés des mucines détermineraient le profil de colonisation bactérienne (Robbe et al. 2003; Gaudier and Hoebler 2006). En effet, Les bactéries sont capables de synthétiser des enzymes, qui hydrolysent les résidus glycosylés de ces mucines qui leur servent ainsi de substrats fermentescibles. De plus, les différents types de mucines génèrent différents états de viscosité du mucus, ce qui peut

favoriser l'implantation de certaines bactéries au détriment d'autres (Rokhsfat et al. 2016). La contribution des différents types de mucines dans la composition bactérienne du microbiote a été rapportée (Tong et al. 2014; Tailford et al. 2015). Les co-occurrences entre les différentes bactéries et la transcription des gènes codant pour les mucines et pour les enzymes assurant leur glycosilation, pourraient donc être étudiées. Cette approche pouvant être plus particulièrement appliquée aux bactéries dont l'abondance ou la  $\beta$ -diversité sont influencées par le génotype de l'hôte. Ceci a été le cas pour les bactéries appartenant à la classe des Bétaprotéobactéries, des Actinobactéries, des Alphaprotéobactéries, et des Tenericutes, dans l'étude menée au sein de cette thèse. L'objectif étant d'abord de faire un premier rapprochement entre la caractéristique du mucus intestinal et entre le profil des communautés bactériennes observées chez chaque truite.

Si les mucines exercent probablement une sélection sur les communautés bactériennes en leur servant de substrat fermentescible, d'autres facteurs liés à l'hôte sont également capables d'exercer une pression de sélection sur certaines bactéries du microbiote.

### **9.3.2 Des acteurs de l'immunité peuvent-ils expliquer le profil des communautés bactériennes intestinales rencontrées sur la muqueuse de l'intestin des poissons ?**

L'immunité de l'hôte participe à la sélection de son microbiote. Des corrélations, entre la présence de certains gènes de l'immunité sur le génome de l'hôte et certains taxons bactériens, ont en effet été mises en évidence par l'analyse QTL 'Quantitative Trait Loci'. Certains récepteurs TLR 'Toll-like receptors' de motifs bactériens et certaines cytokines 'transforming growth factor  $\beta$ ' (TGF $\beta$ ) sont, par exemple, associés à certains taxons du microbiote de poulet (Mignon-Grasteau et al. 2015). Chez la barbotte de rivière (*Ictalurus punctatus*), des QTL associés aux Flavobactéries contiennent des gènes codant pour l'interleukine 17 (Peatman et al. 2013). Il serait donc intéressant de regarder chez la truite arc-en-ciel, si des QTL sont significativement associés à certains taxons bactériens, et plus particulièrement aux Bétaprotéobactéries, Actinobactéries, et Alphaprotéobactéries qui ont été observées comme étant plus sensibles au génotype de leur hôte, au cours de l'étude menée dans cette thèse. Il faut aussi, tenir compte de l'orientation du profil bactérien par sélection négative lors de ces investigations : de nombreux acteurs de l'immunité, lorsqu'ils sont présents conduisent en effet au rejet des bactéries qu'ils prennent pour cible. L'implication de l'immunité dans la sélection des profils bactériens du microbiote de la

muqueuse digestive est d'autant plus probable, que les lignées isogéniques ont été décrites comme divergentes sur leur résistance à des agents infectieux (Quillet et al. 2007).

La réponse inflammatoire de l'intestin des truites, au changement d'alimentation, mérite d'être étudiée, car les régimes végétaux ont déjà été cités pour les inflammations intestinales (Refstie et al. 2000), et pour la détérioration de l'intégrité de l'épithélium (Glencross et al. 2006), qu'ils peuvent provoquer. Bien que la réduction de la teneur en facteurs antinutritionnels dans les aliments pour truites ait permis de diminuer la réponse inflammatoire de l'intestin, il serait utile de continuer à surveiller son absence ou sa présence.

L'investigation de la réaction inflammatoire, d'origine bactérienne, dans la réponse des truites à l'alimentation végétale, pourrait se faire à partir de cultures cellulaires intestinales. Le recours à la culture permettrait, en effet, de s'affranchir des composés végétaux tels que les fibres ou certains facteurs antinutritionnels capables d'induire une inflammation intestinale (Barnes et al. 2014). Il est possible d'étudier certains mécanismes biologiques présents au niveau de l'intestin des truites, via la culture cellulaire RTgutGC. Il s'agit d'une lignée de culture cellulaire, de structure épithéliale, développée à partir d'intestin de truite. L'outil RTgutGC permet d'étudier les processus de nutrition et de santé gastro-intestinaux chez la truite à l'échelle moléculaire, afin d'émettre des hypothèses vérifiables ultérieurement *in vivo* (Kawano et al. 2011). Les cultures cellulaires intestinales ont permis de détecter des composés bénéfiques (Girón-Calle et al. 2004), ou au contraire délétères dans la nourriture (King et al. 2006), de déterminer la biodisponibilité de certains composés (Jin 2006), d'étudier la capacité d'adhésion de certains probiotiques sur les cellules épithéliales (Larsen et al. 2007), ainsi que la sensibilité au LPS bactérien (Kawano et al. 2011).

La méthode de séquençage par 'high-throughput-screening' permettrait également d'identifier les bactéries éventuellement impliquées dans la modulation de la réponse inflammatoire. Ce séquençage par 'high-throughput-screening' donne accès au génome complet des communautés bactériennes étudiées, et permet d'identifier des molécules bactériennes capables d'influer sur l'immunité, le métabolisme, ou la différenciation cellulaire intestinale de l'hôte. Cette méthode de séquençage a, par exemple, permis d'identifier 30 clones de bactéries potentiellement intéressantes chez l'être humain (De Wouters et al. 2014).

## **9.4 Quels impacts fonctionnels peut avoir le changement de communauté bactérienne, provoqué par le changement d'alimentation, pour son hôte.**

Le changement de régime alimentaire modifie les communautés bactériennes de la muqueuse intestinale, et il est utile de déterminer les changements de fonctionnalité induits par cette modification des profils bactériens.

### **9.4.1 Détermination de la contribution des acides gras libres à courte chaîne (SCFA) dans la réponse des truites au changement d'alimentation**

Le microbiote intestinal a une implication dans la synthèse d'acides gras libres à courte chaîne (SCFA). Cependant, la contribution des SCFA dans le métabolisme énergétique de la truite n'a pas encore été définie. Il a été constaté que, chez l'humain et chez la souris, l'acétate et le propionate passent dans le sang, rejoignent le foie, et sont impliqués dans la synthèse du cholestérol (Krajmalnik-Brown, Rosa; Ilhan, Zehra-Esra; Kang, Dae-Wook; DiBaise 2013). Des perturbations du cholestérol plasmatique, ont été remarquées chez les truites, lors de l'apport de végétaux dans leur régime alimentaire (Richard et al. 2006a), il semble donc nécessaire de déterminer si des niveaux de synthèse, différents en propionate et en acétate, sont impliqués dans cette réponse perturbant le bon état physiologique de la truite. Le butyrate représente la source d'énergie principale pour les cellules de l'intestin distal, et en association avec le propionate, le butyrate induit la production d'hormones intestinales et réduit la prise alimentaire (Vernocchi et al. 2016). La présence de végétaux dans les aliments pour truites est connue pour induire une diminution de prise alimentaire (Medale et al. 1998; Yamamoto et al. 2002), il semble judicieux de vérifier si le propionate et le butyrate sont impliqués dans cette réponse comportementale des truites. Les SCFA sont impliqués dans l'homéostasie intestinale (Inoue et al. 2014; Kimura et al. 2014), dans la sensibilité à l'insuline, dans la stéatose hépatique (Al-lahham et al. 2010), et dans le péristaltisme intestinal (Dass et al. 2007; Hurst et al. 2015) chez les mammifères, et il serait intéressant de vérifier si ces implications sont également présentes chez la truite. Afin d'estimer la contribution des SCFA dans les réponses biologiques de la truite au changement d'alimentation, Il pourrait être utile de suivre la transcription de certains de ses récepteurs intestinaux en SCFA (GPR43 et GPR41, ainsi que ANGPTL4) (Inoue et al. 2014; Kimura et al.

2014), en parallèle du suivi des taux en SCFA dans les contenus intestinaux et dans le plasma, en fonction de son régime alimentaire.

La caractérisation du microbiote intestinal, menée par métagénomique, pourrait être complétée par des approches de métagénomique et de métabolomique. Ceci permettrait d'identifier et de quantifier des métabolites bactériens intéressants et de rechercher certains mécanismes biochimiques dans lesquels ils sont impliqués. Ces études peuvent se faire par le biais de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire. De telles approches ont, par exemple, permis de constater que les Clostridia IV, Clostridia XIVa (*Eubacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus* et *Lactobacillus*) appartenant au phylum des Firmicutes et des Actinobacteria sont les principales bactéries impliquées dans le métabolisme des acides gras à courte chaîne (SCFA) (Vernocchi et al. 2016). Un recours à ces différentes approches de métagénomique, et de métabolomique permettrait d'approfondir les connaissances déjà acquises sur la synergie entre le microbiote intestinal et son hôte.

#### **9.4.2 Certaines bactéries du microbiote intestinal sont-elles impliquées dans l'homéostasie du cholestérol ?**

La synthèse des acides biliaires primaires (acide cholique (CA), et acide chénodésoxycholique (CDCA)) a lieu au niveau du foie, par l'oxydation du cholestérol. Des modifications de la concentration de ces acides biliaires hépatiques ont été corrélées à une abondance de certaines bactéries intestinales (Xie et al.; Ridlon et al. 2006; Xie et al. 2016). Il serait donc intéressant de vérifier si l'abondance des différentes bactéries varie lors de la modification du régime alimentaire des truites. Contrôler ces hypothèses émises, sur l'effet de certaines bactéries du microbiote intestinal, concernant la synthèse d'acides biliaires hépatiques, serait judicieux, puisqu'il a été rapporté que les régimes végétaux se traduisaient chez la truite, par une baisse du niveau de cholestérol plasmatique, et par une augmentation de la transcription d'enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol (24-dehydrocholesterol reductase precursor (EC 1.3.1.-), C-4 methyl-sterol oxydase (EC 1.14.13.72), 3-béta-hydroxysteroid-delta(8),delta(7)-isomérase (EC 5.3.3.5) (Panserat et al. 2009).

### **9.4.3 Quels sont les bactéries de la communauté bactérienne présentes dans l'intestin qui sont métaboliquement actives ?**

Toutes les bactéries présentes au sein d'une communauté ne sont pas forcément actives, le métabolisme d'un certain groupe de bactéries peut être à l'état latent. Il peut être utile de dissocier, dans une communauté bactérienne, les bactéries impliquées dans des processus de synthèse de celles, qui sont présentes, mais en repos métabolique, et de déterminer si le changement de régime alimentaire tend à atténuer, ou au contraire à stimuler l'activité métabolique des différentes bactéries du microbiote intestinal. Le changement de régime alimentaire a, en effet, conduit à une baisse significative de l'indice d'Evenness, mais n'a pas eu d'impact significatif sur la richesse spécifique, ce qui peut laisser supposer que certaines bactéries de la muqueuse intestinale se mettent dans un état de repos métabolique, suite au changement de régime alimentaire. Cette caractérisation des communautés, actives et au repos, peut se faire par séquençage NGS, en adoptant une approche similaire à celle suivie lors de l'étude réalisée pendant cette thèse. La caractérisation des communautés microbiennes, métaboliquement actives, peut se faire par le séquençage d'un fragment d'ARN 16S, issu d'extraction de leur contenu intestinal en ARN. Tandis que la caractérisation des communautés bactériennes présentes, indépendamment de leur activité métabolique, peut se faire à partir du séquençage d'un fragment d'ARN 16S, issus de l'extraction d'ADN à partir leur contenu intestinal (Anahtar et al. 2016). Cette dissociation pourrait aider à comprendre les facteurs potentiellement impliqués dans l'activation métabolique de certaines bactéries porteuses de gènes d'intérêts. Bien que l'approche soit techniquement plus contraignante à mettre en place, Il est aussi possible de différencier les bactéries en fonction de leur taux de multiplication. Ainsi le séquençage de l'ADN 16S des bactéries intestinales d'individus alimentés en partie avec du glucose, comprenant un carbone 13, permet en effet d'identifier les bactéries en cours de multiplication (Shao et al. 2013). Cette caractérisation des différentes communautés bactériennes, en fonction de leur niveau d'activité, pourrait être menée à la fois sur des sections d'intestin proximal et distal, ainsi que sur les compartiments de la lumière digestive et de la muqueuse intestinale, dans le but de mieux cartographier les différentes communautés bactériennes intestinales de la truite.

## **BIBLIOGRAPHIE**





## BIBLIOGRAPHIE

- Adel M, Lazado CC, Safari R, et al (2016) Aqualase<sup>®</sup>, a yeast-based in-feed probiotic, modulates intestinal microbiota, immunity and growth of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Res* 1–12. doi: 10.1111/are.13019
- Al-Hisnawi A, Ringø E, Davies SJ, et al (2015) First report on the autochthonous gut microbiota of brown trout (*Salmo trutta Linnaeus*). *Aquac Res* 46:2962–2971. doi: 10.1111/are.12451
- Al-lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, et al (2010) Biological effects of propionic acid in humans, metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochem Biophys Acta* 1801:1175–1183. doi: 10.1016/j.bbali.2010.07.007
- Allison E (2011) *Aquaculture, fisheries, poverty and food security*. The world fish center, Penang.
- Alu MH, Al-rabadi GJ, Alli I, et al (2012) Protein co-precipitates : a review of their preparation and functional properties. *Food Bioprod Process* 91:327–335. doi: 10.1016/j.fbp.2012.11.011
- Aly SM, Albutti A (2014) Antimicrobials use in aquaculture and their public health impact. *Journal of Aquaculture Research & Development* 5-4:1000247. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000247>
- Anahtar MN, Bowman BA, Kwon DS (2016) Efficient nucleic acid extraction and 16S rRNA gene sequencing for bacterial community characterization 1 . Extraction of total nucleic acid from cervicovaginal Swabs. 15:1–11. doi: 10.3791/53939
- Avella MA, Olivotto I, Silvi S, et al (2010) Effect of dietary probiotics on clownfish : a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 359–371. doi: 10.1152/ajpregu.00300.2009.
- Azarm HM, Kenari AA, Hedayati M (2013) Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquac Res* 44:634–644. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03068.x
- Bakke I, Coward E, Andersen T, Vadstein O (2015) Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environ Microbiol* 17:3914–3924. doi: 10.1111/1462-2920.12888
- Banerjee G, Dan SK, Nandi A, et al (2015) Autochthonous gut bacteria in two indian air-breathing fish, climbing perch (*Anabas testudineus*) and Walking Catfish (*Clarias batrachus*): mode of association, identification and enzyme producing ability. *Polish J Microbiol* 64:361–368.
- Barker GA, Ellory JC (1990) The identification of neutral amino acid transport systems. *Exp Physiol* 75:3–26.
- Barnes ME, Brown ML, Bruce T, et al (2014) Rainbow trout rearing performance, intestinal morphology, and immune response after long-term feeding of high levels of fermented soybean meal. *N Am J Aquac* 76:333–345. doi: 10.1080/15222055.2014.920748
- Baruah K, Sahu NP, Pal AK, Debnath D (2004) Dietary phytase: an ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. *NAGA, WorldFish Cent Q* 27:15–19.
- Belal IEH (2005) A review of some fish nutrition methodologies. *Bioresour Technol* 96:395–402. doi: 10.1016/j.biortech.2003.11.030
- Belghit I, Skiba-Cassy S, Geurden I, et al (2014) Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 112:493–503. doi: 10.1017/S0007114514001226
- Bergot F, Breque J (1983) Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture* 34:3-4:203-212. doi.org/10.1016/0044-8486(83)90203-X
- Blachier F, Boutry C, Cécile B, Tomé D (2009) Metabolism and functions of L -glutamate in the

- epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr* 90:814–821. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462S.814S
- Bledsoe JW, Peterson BC, Swanson KS, Small BC (2016) Ontogenetic characterization of the Intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals insights on temporal shifts and the Influence of environmental microbes. *PLoS One* 11:e0166379. doi: 10.1371/journal.pone.0166379
- Bos MA, Dunnewind B (2003) Foams and surface rheological properties of b-casein, gliadin and glycinin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 31:95–105. doi: 10.1016/S0927-7765(03)00046-8
- Bostock J, Lane A, Hough C (2016) An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. *Aquac Int* 24:699–733. doi: 10.1007/s10499-016-9992-1
- Bouchoux J, Beilstein F, Pauquai T, et al (2011) The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2 / TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics *Biology of the Cell*. 103:499–517. doi: 10.1042/BC20110024
- Bucking C, Wood AECM (2007) Gastrointestinal transport of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> during the digestion of a single meal in the freshwater rainbow trout. *J Comp Physiol B* 177:349–360. doi: 10.1007/s00360-006-0134-3
- Burel C, Boujard T, Kaushik SJ, et al (2001) Effects of rapeseed meal-glucosinolates on thyroid metabolism and feed utilization in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 124:343–358. doi: 10.1006/gcen.2001.7723
- Burel C, Medale F (2014) Protein sources in animal feed. Les sources de proteine dans l'alimentation du bétail. Oilseeds & fats crops and lipids. 21-4. DOI: 10.1051/ocl/2014013
- Burns AR, Zac Stephens W, Stagaman K, et al (2015) Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *ISME J* 10:1–10. doi: 10.1038/ismej.2015.142
- Burrin DG, Stoll B (2009) Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr* 90:850–856. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462Y
- Caesar R, Nygren H, Orešić M, Bäckhed F (2016) Interaction between dietary lipids and gut microbiota regulates hepatic cholesterol metabolism. *J Lipid Res*. doi: 10.1194/jlr.M065847
- Cahu CL, Infante JLZ (1995a) Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol Biochem* 14:209–214. doi: 10.1007/BF00004311
- Cahu CL, Infante JLZ (1995b) Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol Biochem* 14:431–437. doi: 10.1007/BF00004343
- Campbell JH, Foster CM, Vishnivetskaya T, et al (2012) Host genetic and environmental effects on mouse intestinal microbiota. *ISME J* 6:2033–2044. doi: 10.1038/ismej.2012.54
- Canaan S, Roussel A, Verger R, Cambillau C (1999) Gastric lipase : crystal structure and activity. *Biochim Biophys Acta* 1441:197–204.
- Carda-Diéguez M, Mira A, Fouz B (2014) Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiol Ecol* 87:451–459. doi: 10.1111/1574-6941.12236
- Cardoso P, Rigal F, Carvalho JC (2015) BAT - Biodiversity assessment tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods Ecol Evol* 6:232–236. doi: 10.1111/2041-210X.12310
- Castro R, Jouneau L, Pham HP, et al (2013) Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS Pathog* 9:1643–1644. doi: 10.1371/journal.ppat.1003098
- Chan CC, Wang SS (1993) Kinetics of the extraction of phenylalanine and glutamic acid by ion-exchange carriers. *J Memb Sci* 76:219–232. doi: 10.1016/0376-7388(93)85219-M
- Clements KD, Gleeson VP, Slaytor M (1994) Short-chain fatty acid metabolism in temperate

- marine herbivorous fish. *J Comp Physiol B* 164:372–377. doi: 10.1007/BF00302552
- CNA (2011) Quelle place pour les protéines animales transformées (PAT) dans l'alimentation des porcs, des volailles et des poissons ? Conseil National de l'Alimentation. 1-110
- Collins SA, Mans GS, Desai AR, et al (2013) Structural equation modeling of antinutrients in rainbow trout diets and their impact on feed intake and growth. *Aquaculture* 417:219–227. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.020
- Colussi S, Prearo M, Bertuzzi SA, et al (2015) Association of a specific major histocompatibility complex class II b single nucleotide polymorphism with resistance to lactococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 38:27–35. doi: 10.1111/jfd.12193
- CONSENSUS Steering Committee Towards Sustainable Aquaculture in Europe.
- Dabrowski K (1984) The feeding of fish larvae : present « state of the art » and perspectives. *Reprod Nutr Dev* 24:807–833.
- Dabrowski K, Poczyczynski P, Kock G, Berger B (1989) Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*salmo gairdneri*). New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. *Aquaculture* 77:29–49.
- Dalsgaard J, Bach Knudsen K, Verlhac V, et al (2014) Supplementing enzymes to extruded, soybean-based diet improves breakdown of non-starch polysaccharides in rainbow trout (*onchorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr*. doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00802.x
- Daly K, Al-rammahi M, Moran A, et al (2013) Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 304:1:271–282. doi: 10.1152/ajpgi.00074.2012
- Dantagnan P, Hernandez A, Borquez A, Mansilla A (2009) Inclusion of macroalgae meal (*Macrocystis pyrifera*) as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect on flesh fatty acid composition. *Aquac Res* 41:87–94. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02308.x
- Daprà F, Geurden I, Corraze G, et al (2011) Physiological and molecular responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 319:377–384. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.07.016
- Darias MJ, Murray HM, Martínez-Rodríguez G, et al (2005) Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248:245–252. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.044
- Das KM, Tripathi SD (1991) Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture* 92:21–32. doi: 10.1016/0044-8486(91)90005-R
- Dass N., John A., Bassil A., et al (2007) The relationship between the effects of short-chain fatty acids on intestinal motility in vitro and GPR43 receptor activation. *Neurogastroenterol Motil* 19:66–74. doi: 10.1111/j.1365-2982.2006.00853.x
- De Wouters T, Ledue F, Nepelska M, et al (2014) A robust and adaptable high throughput screening method to study host-microbiota interactions in the human intestine. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0105598
- Desai AR, Links MG, Collins S a., et al (2012) Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350–353:134–142. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.005
- DGAL (2016) Note d'information DGAL/SDSPA/2016-128 du 16/02/2016.
- Douglas SE, Gawlicka A, Mandla S, Gallant JW (1999) Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J Fish Biol* 55:897–915. doi: 10.1111/j.1095-8649.1999.tb00729.x
- Dupont-Nivet M, Médale F, Leonard J, et al (2009) Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal

- at early growth. *Aquaculture* 295:15–21. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.031
- Dupont-Nivet M, Robert-Granié C, Le Guillou S, et al (2012) Comparison of isogenic lines provides evidence that phenotypic plasticity is under genetic control in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Fish Biol* 81:1754–1762. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03437.x
- Einarsson S, Davies P (1997) A multiductal system conveys digestive enzymes from the pancreas into the intestine in the Atlantic salmon. *J Fish Biol* 50:1120–1123.
- Enes P, Panserat T, Kaushik SJ, Oliva-Teles A (2011) Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Rev Fish Sci* 19:201–215.
- Estruch G, Collado MC, Penaranda DS, et al (2015) Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One* 10:1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0136389
- Etyemez M, Balcazar JL (2015) Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Res Vet Sci* 100:8–11. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03.026
- Fang C, Ma M, Ji H (2015) Alterations of digestive enzyme activities, intestinal morphology and microbiota in juvenile paddlefish, *Polyodon spathula*, fed dietary probiotics. *Fish Physiol Biochem* 91–105. doi: 10.1007/s10695-014-0008-7
- FAO (2012a) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Rome. 1-261
- FAO (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 1-223
- FAO (2012b) The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome. 1-209
- FAO (2015) FAO Global aquaculture production statistics database updated to 2013 - Summary information. I4899E./1/08.15
- FEAP (2014) European aquaculture production report 2001-2013. 1-53
- Ferraris RP, Ahearn G a (1984) Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 77:397–413. doi: 10.1016/0300-9629(84)90204-4
- Fossati D, Kellerhals M, Spring J, Mascher F (2002) Sélection de variétés pour une agriculture durable : trois exemples suisses. Dossier de l'environnement de l'INRA n°30. pp 91–100
- Francis G, Makkar HP, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199:197–227. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00526-9
- Fras A, Golebiewska K, Golebiewski D, et al (2016) Variability in the chemical composition of triticale grain, flour and bread. *J Cereal Sci* 71:66–72.
- Gatesoupe F-J, Huelvan C, Le Bayon N, et al (2016) The highly variable microbiota associated to intestinal mucosa correlates with growth and hypoxia resistance of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, submitted to different nutritional histories. *BMC Microbiol* 16:266. doi: 10.1186/s12866-016-0885-2
- Gatesoupe FJ (2007) Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267:20–30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.005
- Gaudier E, Hoebler C (2006) Rôles physiologiques des mucines dans la barrière colique. *Gastroentérologie Clin Biol* 30:965–974. doi: 10.1016/S0399-8320(06)73358-9
- Geraylou Z, Souffreau C, Rurangwa E, et al (2013) Prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) with emphasis on the modulation of the gut microbiota using 454 pyrosequencing. *FEMS Immunol Med Microbiol* 86:357–371. doi: 10.1111/1574-6941.12169
- Geurden I, Aramendi M, Zambonino-Infante JL, Panserat S (2007) Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R2275–R2283. doi: 10.1152/ajpregu.00444.2006
- Geurden I, Borchert P, Balasubramanian MN, et al (2013) The positive impact of the early-

- feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS One* 8:e83162. doi: 10.1371/journal.pone.0083162
- Ghosh S, Molcan E, DeCoffe D, et al (2013) Diets rich in n-6 PUFA induce intestinal microbial dysbiosis in aged mice. *Br J Nutr* 110:515–23. doi: 10.1017/S0007114512005326
- Giannenas I, Karamaligas I, Margaroni M, et al (2015) Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 41:119–128. doi: 10.1007/s10695-014-0010-0
- Gilani GS, Xiao CW, Cockell KA (2012) Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *Br J Nutr*. doi: 10.1017/S0007114512002371
- Girón-Calle J, Vioque J, Yust M del M, et al (2004) Effect of chickpea aqueous extracts, organic extracts, and protein concentrates on cell proliferation. *J Med Food* 7:122–129.
- Gisbert E, Villeneuve L, Zambonino-Infante JL, et al (2005) Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40:609–618.
- Gjedrem T (1978) Selection for growth rate and domestication in Atlantic salmon. *Berlin*. 96:56–59.
- Glencross B, Evans D, Rutherford N, et al (2006) The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture* 253:512–522. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.009
- Golchinfar F, Zamani A, Hajimoradloo A, Madani R (2011) Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*: From hatching to primary stages after yolk sac absorption. *Iran J Fish Sci* 10:403–414.
- Gómez-Requeni P, Calduch-Giner J a, Vega-Rubín de Celis S, et al (2005) Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 94:353–361. doi: 10.1079/BJN20051521
- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Calduch-Giner JA, et al (2004) Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232:493–510. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00532-5
- Gómez GD, Balcázar JL (2008) A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:145–154. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x
- Goodman BE (2010) Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Adv Physiol Educ* 34:44–53. doi: 10.1152/advan.00094.2009.
- Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, et al (2016) Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. *Science* (80) 352:29–32. doi: 10.1126/science.aad9379
- Green JA, Hardy RW, Brannon EL (2002) The optimum dietary essential: non essential amino acid ratio for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which maximizes nitrogen retention and minimizes nitrogen excretion. *Fish Physiol Biochem* 27:109–115. doi: 10.1023/B:FISH.0000021877.49848.8f
- Grima L, Guillet E, Boujard T (2008) Genetic variability in residual feed intake in rainbow trout clones and testing of indirect selection criteria (*Open Access publication*). *Genet Sel Evol* 40:607–624. doi: 10.1051/gse
- Grosell M, O'Donnell MJ, Wood CM (2000) Hepatic versus gallbladder bile composition: in vivo transport physiology of the gallbladder in rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1674–84.
- Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, et al (2015) Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* 17:603–616. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.009
- Haffray P, Pincet C, Rault P, et al (2004) Domestication et amélioration génétique des cheptels

- piscicoles français dans le cadre du SYSAAF. INRA 17:243–252.
- Han S, Liu Y, Zhou Z, et al (2010) Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. *Aquac Res* 42:47–56. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02543.x
- Hartviksen M, Vecino JLG, Ringo E, et al (2014) Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth. *Aquac Nutr* 20:381–398. doi: 10.1111/anu.12087
- Heidarieh M, Mirvaghefi AR, Akbari M, et al (2013) Evaluations of Hilyses™, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, enzymatic activities and gastrointestinal structure. *Aquac Nutr* 19:343–348. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00973.x
- Heikkinen J, Vielma J, Kemiläinen O, et al (2006) Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261:259–268. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.012
- Hidalgo MC, Urea E, Sanz a. (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170:267–283. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00413-X
- Hill JH, Franzosa EA, Huttenhower C (2016) A conserved bacterial protein induces pancreatic beta cell expansion during zebrafish development. 1–18. doi: 10.7554/eLife.20145
- Hoseinifar SH, Mirvaghefi A, Amoozegar MA, et al (2015) In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquac Nutr* n/a-n/a. doi: 10.1111/anu.12373
- Hua K, Bureau D. (2012) Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. *Aquaculture* 356–357:284–301. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.003
- Huber I, Spanggaard B, Appel KF, et al (2004) Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol* 96:117–132. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02109.x
- Hunt AÖ, Özkan Yilmaz F, Engin K, et al (2014) The effects of fish meal replacement by yeast based nucleotides on growth, body composition and digestive enzyme activity in rainbow trout juveniles (*Onchorhynchus mykiss*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*. 66:964
- Hurst NR, Kendig D., Murthy K., Grider J. (2015) The short chain fatty acids, butyrate and propionate, have differential effects on the motility of the guinea pig colon. *Neurogastroenterol Motil* 26:1586–1596. doi: 10.1111/nmo.12425
- Ihssen PE, Mckay LR, Mcmillan I, Phillips RB (1990) Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Trans Am Fish Soc* 119:698–717. doi: 10.1577/1548-8659(1990)119<0698
- Ijssennagger N, Van der Meer R, Van Mil SW (2016) Sulfide as a mucus barrier-breaker in inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* 22:190–199.
- Infante JLZ, Cahu CL (1994) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 12:399–408. doi: 10.1007/BF00004304
- Ingerslev H, Boye M, Dalsgaard I, Madsen L (2012) Studying the gut microbiota using rainbow trout as a model: the dynamics of the microbiota changes after first feeding. *Microbial Community Diversity*. 289B.
- Ingerslev HC, von Gersdorff Jørgensen L, Lenz Strube M, et al (2014) The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 424–425:24–34. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.12.032
- Inoue D, Tsujimoto G, Kimura I (2014) Regulation of energy homeostasis by GPR41. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:5–7. doi: 10.3389/fendo.2014.00081

- Jalabert B, Fostier A (2010) La truite arc-en-ciel : de la biologie à l'élevage. Quae Ed. 1-323.
- Jonsson AC (1991) Regulatory peptides in the pancreas of 2 Species of elasmobranchs and in the brockmann bodies of 4 teleost species. *Cell Tissue Res* 266:163–172.
- Justino CIL, Duarte KR, Freitas AC, et al (2016) Trends in analytical chemistry contaminants in aquaculture : overview of analytical techniques for their determination. *Trends Anal Chem* 80:293–310. doi: 10.1016/j.trac.2015.07.014
- Kamalam BS, Panserat S, Aguirre P, et al (2013) Selection for high muscle fat in rainbow trout induces potentially higher chylomicron synthesis and PUFA biosynthesis in the intestine. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 164:417–427. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.11.020
- Kashinskaya E, Suhanova E, Solov'ev M, et al (2014) Diversity of microbial communities of the intestinal mucosa and intestinal contents of fish from Lake Chany (*Western Siberia*). *Int Water Biol* 7:172–177.
- Kause A, Tobin D, Dobby A, et al (2006) Recording strategies and selection potential of feed intake measured using the X-ray method in rainbow trout. *Genet Sel Evol* 38:389–409.
- Kaushik SJ (1990) Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fish. *Mediterr. Aquac.* 125–138.
- Kawano A, Haiduk C, Schirmer K, et al (2011) Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquac Nutr* 17:241–252.
- Keith P, Dorson M (2003) La truite arc-en-ciel : *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). In: Évolution holocène de la faune de vertébrés de France : invasions et disparitions. Paris, France, pp 130–132.
- Khan A, Ghosh K (2012) Characterization and identification of gut-associated phytase-producing bacteria in some fresh water fish cultured in ponds. *Acta Ichthyol Piscat* 42:37–45. doi: 10.3750/AIP2011.42.1.05
- Kim D-H, Brunt J, Austin B (2007) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol* 102:1654–1664. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x
- Kimura I, Inoue D, Hirano K, Tsujimoto G (2014) The SCFA receptor GPR43 and energy metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:3–5. doi: 10.3389/fendo.2014.00085
- King EG, Merkes CM, Mcneil CL, et al (2012) Genetic dissection of a model complex trait using the *Drosophila* Synthetic Population Resource. *Genome Res* 1558–1566. doi: 10.1101/gr.134031.111.Freely
- King RE, Bomser JA, Min DB (2006) Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 5:65-70.
- Kjørsvik E, Pittman K, Pavlov D (2004) From fertilisation to the end of metamorphosis—functional development, in culture of cold-water marine fish, Blackwell. Oxford, UK. 204-278.
- Knudsen D, Jutfelt F, Sundh H, et al (2008) Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Br J Nutr* 100:120–129. doi: 10.1017/S0007114507886338
- Knutton S, Shaw R, Frankel G (2002) Interaction of enteropathogenic *Escherichia Coli* with red blood cell monolayers. *Methods Enzymol* 358:350–355.
- Koca SB, Yigit NÖ, Didinen BI, et al (2015) Effects of enzyme-producing probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of trout on the growth performance, survival, and digestive enzyme activity of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Isr J Aquac - Bamidgheh* 67:1–9.
- Komen H, Thorgaard GH (2007) Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture* 269:150–173. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.009
- Korecka A, Wouters T De, Cultrone A, et al (2013) ANGPTL4 expression induced by butyrate and rosiglitazone in human intestinal epithelial cells utilizes independent pathways. *Am J*



- Physiol - Gastrointest Liver Physiol 304:1025–1037. doi: 10.1152/ajpgi.00293.2012
- Kormas KA, Meziti A, Mente E, Frentzos A (2014) Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *Microbiologyopen* 3:718–728. doi: 10.1002/mbo3.202
- Kousoulaki K, Saether B, Albrektsen S, Noble C (2015) Review on european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) nutrition and feed management : a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquac Nutr* 21:129–151. doi: 10.1111/anu.12233
- Krajmalnik-Brown, Rosa; Ilhan, Zehra-Esra; Kang, Dae-Wook; DiBaise JK (2013) Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr Clin Pr* 27:201–214. doi: 10.1177/0884533611436116.Effects
- Krogdahl Å, Penn M, Thorsen J, et al (2010) Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: An update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac Res* 41:333–344. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x
- Kuzmina V., Skvortsova E., Shalygin M., Kovalenko K. (2015) Role of peptidases of the intestinal microflora and prey in temperature adaptations of the digestive system in planktivorous and benthivorous fish. *Fish Physiol Biochem* 41:1359–1368. doi: 10.1007/s10695-015-0091-4
- Kuzmina V, Gelman A. (1997) Membrane-linked digestion in fish. *Rev Fish Sci* 5:99–129.
- Larsen BK, Dalsgaard J, Pedersen PB (2012) Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 326–329:90–98. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.028
- Larsen N, Nissen P, Willats WGT (2007) The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp . and *E . coli* O138. *114:113–119*. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2006.10.033
- Lattimer JM, Haub MD (2010) Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2:1266–1289. doi: 10.3390/nu2121266
- Layer P, Keller J (2005) Gastric lipase and pancreatic exocrine insufficiency. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:25–27.
- Lazzarotto V, Leprevost A, Quillet E (2015) Three year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources : consequences for reproduction , fatty acid composition and progeny survival. *PLoS One* 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0117609
- Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Laureau S, et al (2013a) Selective breeding and shift to plant-based diets in fish farming. *inra Prod Anim* 26:317–326.
- Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, et al (2012) Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PLoS One* 7:3–9. doi: 10.1371/journal.pone.0044898
- Le Boucher R, Vandeputte M, Dupont-Nivet M, et al (2013b) Genotype by diet interactions in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Nutritional challenge with totally plant-based diets. *J Anim Sci* 91:44–56. doi: 10.2527/jas.2012-5311.
- Leblanc JG, Milani C, Giori GS De, et al (2013) Bacteria as vitamin suppliers to their host : a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* 24:160–168. doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.005
- Lee J, Nam DS, Kong C (2016) Variability in nutrient composition of cereal grains from different origins. *Springerplus*. doi: 10.1186/s40064-016-2046-3
- Lee M, Yoo S (2014) The role of the capture fisheries and aquaculture sectors in the Korean national economy: An input – output analysis. *Mar Policy* 44:448–456. doi: 10.1016/j.marpol.2013.10.014
- Leone V, Gibbons SM, Gilbert JA, et al (2015) Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe*

- 17:681–689. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.006
- Lewis KIM, Strandwitz P (2016) Antibiotics right under our nose. *Nature* 535:501–502.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* (80) 777:1647–1651.
- Li H, Limenitakis JP, Ganal SC, Macpherson a. J (2015a) Penetrability of the inner mucus layer: who is out there? *EMBO Rep* 16:127–129. doi: 10.15252/embr.201439943
- Li J, Ni J, Li J, et al (2014) Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *J Appl Microbiol* 117:1750–1760. doi: 10.1111/jam.12663
- Li T, Long M, Gatesoupe F-J, et al (2015b) Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microb Ecol* 69:25–36. doi: 10.1007/s00248-014-0480-8
- Li X, Yu Y, Feng W, et al (2012) Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. *J Microbiol* 50:29–37. doi: 10.1007/s12275-012-1340-1
- Li X, Zhou L, Yu Y, et al (2017) Composition of Gut Microbiota in the Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) varies with host development. *Microb Ecol*. doi: 10.1007/s00248-016-0924-4
- Liang X, Bushman FD, Fitzgerald GA (2015) Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *pnas* 112:10479–10484. doi: 10.1073/pnas.1501305112
- Llewellyn MS, McGinnity P, Dionne M, et al (2015) The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *Isme J* 10:1–5. doi: 10.1038/ismej.2015.189
- Lopez-Ramirez G, Cuenca-Soria CA, Alvarez-Gonzalez CA, et al (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197–208. doi: 10.1007/s10695-010-9431-6
- Lynch AJ, Cooke SJ, Deines AM, et al (2016) The social, economic, and environmental importance of inland fish and fisheries. *Environ Rev* 121:115–121.
- Lyons PP, Turnbull JF, Dawson KA, Crumlish M (2016) Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings. *J Appl Microbiol* 122:347–363. doi: 10.1111/are.13080
- Lyons PP, Turnbull JF, Dawson KA, Crumlish M (2015) Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquac Res* 1–15. doi: 10.1111/are.12863
- Machiels D, Istasse L (2002) La réaction de maillard: importance et applications en chimie des aliments. *Ann Med Vet* 146:347–352.
- Mandal BS, Ghosh K (2013) Isolation of tannase-producing microbiota from the gastrointestinal tracts of some freshwater fish. *J Appl Ichthyol* 29:145–153. doi: 10.1111/j.1439-0426.2012.02054.x
- Mangian HF, Tappenden KA (2009) Butyrate increases GLUT2 mRNA abundance by initiating transcription in Caco2-BBe cells. *J Parenter Enter Nutr* 33:607–617.
- Marandel L, Veron V, Surget A, Plagnes-Juan E, Panserat S (2016) Glucose metabolism ontogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the light of the recently sequenced genome: new tools for intermediary metabolism programming. 734–743. doi: 10.1242/jeb.134304
- Márquez L, Øverland M, Martínez-Illórens S, et al (2013) Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 384–387:46–55. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.12.008
- McCormick J, Podoliak H (1984) Gallbladder color and relative fullness as a field technique for estimating time since last feeding in brook trout. *North American Journal of Fisheries Management*. 4-48.

- Medale F, Boujard T, Vallée F, et al (1998) Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquat Living Resour* 11:239–246.
- Medale F, Guillaume J (1999) Nutrition énergétique. In : Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R, Eds. *Nutrition des poissons et des crustacés*. Paris INRA 87–111.
- Mellinger J (1995) Les réserves lipidiques de l'oeuf des poissons. *L'année Biologique* 34(2) 63-90.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Bradley G, et al (2009) Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 32:755–766. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01052.x
- Merrifield DL, Harper GM, Dimitroglou A, et al (2010) Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquac Res* 41:1268–1272. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02397.x
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819–1829. doi: 11290733
- Miccoli A, Gioacchini G, Maradonna F, et al (2015) Beneficial bacteria affect *Danio rerio* development by the modulation of maternal factors involved in autophagic, apoptotic and dorsalizing processes. *Cell Physiol Biochem* 35:1706–1718. doi: 10.1159/000373983
- Mignon-grasteau S, Rideau N, Chantry-darmon C (2015) Impact of selection for digestive efficiency on microbiota composition in the chicken. *PLoS One* 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0135488
- Montalban-Arques A, De Schryver P, Bossier P, et al (2015) Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Front Immunol* 6:1–14. doi: 10.3389/fimmu.2015.00512
- Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 129:243–249. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00316-5
- Morales GA, Moyano FJ, Marquez L (2011) In vitro assesment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract. *Anim Feed Sci Technol* 170:209–221.
- Mountfort DO, Campbell J, Clements KD (2002) Hindgut fermentation in three species of marine herbivorous fish. *Appl Environ Microbiol* 68:1374–1380. doi: 10.1128/AEM.68.3.1374-1380.2002
- Mukhopadhyay N, Sarkar S, Bandyopadhyay S (2007) Effect of extrusion cooking on anti-nutritional factor tannin in linseed (*Linum usitatissimum*) meal. 58:8.
- Müller-Belecke A, Ohara K, Koedprang W, et al (2002) Environmental influence on quantitative traits of naturally isogenic lines of ginbuna (*Carassius langsdorfii*). *Aquaculture* 203:251–262.
- Murakami M, Tognini P, Liu Y, et al (2016) Gut microbiota directs PPAR-c-driven reprogramming of the liver circadian clock by nutritional challenge. *EMBO Rep* 1–12.
- Murashita K, Akimoto A, Iwashita Y (2013) Effects of biotechnologically processed soybean meals in a nonfishmeal diet on growth performance, bile acid status, and morphological condition of the distal intestine and liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Sci* 79:447–457. doi: 10.1007/s12562-013-0617-6
- Najdegerami EH, Bakhshi F, Tokmechi A, et al (2015) Dietary effects of poly-b-hydroxybutyrate on the growth performance, digestive enzyme activity, body composition, mineral uptake and bacterial challenge of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr*. doi: 10.1111/anu.12386
- Napier JA (2007) Transgenic plants as a source of fish oils : healthy, sustainable and GM. *J Sci Food Agric* 12:8–12. doi: 10.1002/jsfa
- Natale F (2012) Interactions between aquaculture and fisheries. *Mar Policy*. doi: 10.1016/j.marpol.2012.05.037

- Navarrete P, Magne F, Araneda C, et al (2012) PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. PLoS One 7:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0031335
- Nazari E, Keramat Amirkolaie, A Karimzadeh S (2016) Effect of different alphamune levels in artificial diet on growth parameters, digestibility and enzyme activity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 15:3.
- Ni J, Yan Q, Yu Y, Zhang T (2014) Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. FEMS Microbiol Ecol 87:704–714. doi: 10.1111/1574-6941.12256
- NRC (2011) National Research Council. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, DC
- OECD/FAO (2013) OECD-FAO Agricultural Outlook 2013–2022. OECD Publishing, Paris
- Olsen RE, Dragnes BT, Myklebust R, Ringø E (2003) Effect of soybean oil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. Fish Physiol Biochem 29:181–192. doi: 10.1023/B:FISH.0000045708.67760.43
- Olssen C (2011) Gut anatomy and morphology. In: Encyclopedia of fish physiology. pp 1268–1275
- Ostaszewska T, Kamaszewski M, Grochowski P, et al (2010) The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol 155:107–114. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.017
- Ottinger M, Clauss K, Kuenzer C (2016) Aquaculture : relevance, distribution, impacts and spatial assessments - a review. Ocean Coast Manag 119:244–266. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015
- Palti Y, Silverstein JT, Wieman H, et al (2006) Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 255:548–556. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.029
- Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-juan E, et al (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. Aquaculture 294:123–131. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.05.013
- Panserat S, Kaushik S, Médale F, et al (2013) Rainbow trout as a model for nutrition and nutrient metabolism studies. In: Trout : from physiology to conservation. pp 131–153
- Panserat S, Kolditz C, Richard N, et al (2008) Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. Br J Nutr 100:953–967. doi: 10.1017/s0007114508981411
- Papineni RVL, Umar S (2013) Spot light on intestinal microbiota. Transl Cancer Res 2:359–369. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.12
- Patnaik D, Sahu NP, Chaudhari A (2005) Effects of feeding raw soybean meal to fry of Indian major carp, *Catla catla*, on growth, survival, and protein digestibility. Isr J Aquac - Bamidgheh 57:164–174.
- Peatman E, Li C, Peterson BC, et al (2013) Basal polarization of the mucosal compartment in *Flavobacterium columnare* susceptible and resistant channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Mol Immunol 56:317–327. doi: 10.1016/j.molimm.2013.04.014
- Peirce JL, Lu L, Gu J, et al (2004) A new set of BXD recombinant inbred lines from advanced intercross populations in mice. BMC Genet 5:7. doi: 10.1186/1471-2156-5-7
- Pfaffl MW, Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pierce LR, Palti Y, Silverstein JT, et al (2008) Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype × diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 278:37–42. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.017

- Polakof S, Moon TW, Aguirre P, et al (2011) Glucose homeostasis in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet: metformin and insulin interact in a tissue-dependent manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R166–R174. doi: 10.1152/ajpregu.00619.2010
- Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW (2012) Glucose metabolism in fish: A review. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 182:1015–1045. doi: 10.1007/s00360-012-0658-7
- Pravenec M, Klir P, Kren V, et al (1989) An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *Hypertension* 7:217–221.
- Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, et al (2007) Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 22:510–519. doi: 10.1016/j.fsi.2006.07.002
- Ray AK, Ghosh K, Ringø E (2012) Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquac Nutr* 18:465–492. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x
- Refstie S, Korsoen OJ, Storebakken T, et al (2000) Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190:49–63. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00382-3
- Refstie S, Landsverk T, Bakke-McKellep AM, et al (2006) Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261:269–284. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.011
- Reveco FE, Overland M, Romarheim OH, Mydland LT (2014) Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 420–421:262–269. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.007
- Richard N, Kaushik S, Larroquet L, et al (2006) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 96:299–309. doi: 10.1079/BJN20061821
- Ridlon JM, Kang D, Hylemon PB (2006) review Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*. 47:241–259. doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200
- Ringø E, Zhou Z, Vecino JLG, et al (2016) Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquac Nutr* 22:219–282. doi: 10.1111/anu.12346
- Robbe C, Capon C, Maes E, Rousset M, Zweibaum A, Zanetta JP, Michalski JC. (2003) Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: Presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J Biol Chem* 278:46337–46348. doi: 10.1074/jbc.M302529200
- Rocha C, Durau JF, Barrilli LNE, et al (2014) The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. *J Appl Poult Res* 23:71–79. doi: 10.3382/japr.2013-00829
- Roex N, Berrington CM, Hoal EG, Helden PD Van (2015) Selective breeding : the future of TB management in african buffalo ? *Acta Trop* 149:38–44. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.05.012
- Rokhsefat S, Lin A, Comelli EM (2016) Mucin - microbiota interaction during postnatal maturation of the intestinal ecosystem : clinical implications. *Dig Dis Sci* 61:1473–1486. doi: 10.1007/s10620-016-4032-6
- Rolland M, Skov P V, Larsen BK, et al (2016) Increasing levels of dietary crystalline methionine affect plasma methionine profiles, ammonia excretion, and the expression of genes related to the hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol Part B* 198:91–99. doi: 10.1016/j.cbpb.2016.04.006
- Romarheim HO, Aslaksen MA, Storebakken T, et al (2005) Effect of extrusion on trypsin inhibitor activity and nutrient digestibility of diets based on fish meal, soybean meal and white flakes. *Arch Anim Nutr* 59:365–375.
- Romarheim HO, Skrede A, Penn M, et al (2008) Lipid digestibility, bile drainage and development of morphological intestinal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* ) fed diets

- containing defatted soybean meal. *aquaculture* 274:329–338. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.035
- Romarheim OH, Skrede A, Gao Y, et al (2006) Comparison of white flakes and toasted soybean meal partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 256:354–364.
- Ronnestad I, Yufera M, Ueberschar B, et al (2013) Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: Current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev Aquac.* doi: 10.1111/raq.12010
- Rungruangsak-Torrissen K, Rustad A, Sunde J, et al (2002) In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *J Sci Food Agric.* doi: 10.1002/jsfa.1089
- Sadoul B, Foucard A, Valotaire C, et al (2016) Adaptive capacities from survival to stress responses of two isogenic lines of rainbow trout fed a plant-based diet. *Nat Publ Gr* 1–11. doi: 10.1038/srep35957
- Sadoul B, Leguen I, Colson V, et al (2015) A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress. *Physiol Behav* 140:139–147. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.12.006
- Safari R, Adel M, Lazado CC, et al (2016) Host-derived probiotics *Enterococcus casseli flavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish Shellfish Immunol* 52:198–205. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.020
- Sahlmann C, Gu J, Kortner TM, et al (2015) Ontogeny of the digestive system of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and effects of soybean meal from start-feeding. *PLoS One* 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0124179
- Sajjadi M, Carter CG (2004) Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquac Nutr* 10:135–142. doi: 10.1111/j.1365-2095.2003.00290.x
- Santigosa E, Garc I, Maria J, et al (2011a) Plant oils' inclusion in high fish meal-substituted diets: effect on digestion and nutrient absorption in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac Res* 42:962–974. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02679.x
- Santigosa E, García-Meilán I, Valentin JM, et al (2011b) Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture* 317:146–154. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.04.026
- Santigosa E, Sánchez J, Médale F, et al (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282:68–74. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.007
- Saravanan S, Geurden I, Figueiredo-Silva a C, et al (2013) Voluntary feed intake in rainbow trout is regulated by diet-induced differences in oxygen use. *J Nutr* 143:781–7. doi: 10.3945/jn.112.173062
- Sarieyyüpoğlu M (2000) Histological study in the digestive tract on larval development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Turkish J Zool* 24:199–205.
- Scheithauer TPM, Dallinga-Thie GM, de Vos WM, et al (2016) Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Mol Metab* 5:759–770. doi: 10.1016/j.molmet.2016.06.002
- Seeto GS, Veivers PC, Clements KD, Slaytor M (1996) Carbohydrate utilisation by microbial symbionts in the marine herbivorous fishes *Odax cyanomelas* and *Crinodus lophodon*. *J Comp Physiol B* 165:571–579. doi: 10.1007/BF00387519
- Seiliez I, Panserat S, Lansard M, et al (2011) Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout

- after a single meal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R733-43. doi: 10.1152/ajpregu.00579.2010
- Serino M, Blasco-baque V, Nicolas S, Burcelin R (2014) Managing the manager : gut microbes, stem cells and metabolism. *Diabetes Metab* 40:186–190. doi: 10.1016/j.diabet.2013.12.004
- Serrano E, Storebakken T, Penn M, et al (2011) Responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary doses of lupinine, the main quinolizidine alkaloid found in yellow lupins (*Lupinus luteus*). *Aquaculture* 318:122–127. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.004
- Seth H, Gräns A, Axelsson M (2010) Cholecystokinin as a regulator of cardiac function and postprandial gastrointestinal blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R1240–R1248. doi: 10.1152/ajpregu.00781.2009
- Sevgili H, Kanyilmaz M, Yilayaz A, Diler I (2015) Short adaptation periods can interfere with apparent nutrient digestibility determinations in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 46:1018–1024. doi: 10.1111/are.12252
- Shao Y, Arias-cordero EM, Boland W (2013) Identification of metabolically active bacteria in the gut of the generalist spodoptera littoralis via DNA stable isotope probing using C-Glucose. 1–8. doi: 10.3791/50734
- Silva FCDP, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, et al (2011) Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol Ecol* 78:285–296. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01155.x
- Skalli A, Castillo M, Andree KB, et al (2013) The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria *Pantoea agglomerans* stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 416–417:272–279. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.037
- Small BC (2006) Managing hatch rate and diseases in catfish eggs. SRAC. 1804.
- Smith CCR, Snowberg LK, Caporaso GJ, et al (2015) Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. *ISME J* 9:1–12. doi: 10.1038/ismej.2015.64
- Smith L. (1989) *Fish Nutrition* (2nd Edition).
- Staessen T (2014) Anti-nutritional factors in the water extract of five protein sources.
- Standen B, Rodiles A, Peggs D, et al (2015) Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8403–17.
- Stephens ZW, Burns AR, Stagaman K, et al (2015) The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME J* 10:1–11. doi: 10.1038/ismej.2015.140
- Steven B, Ward NL, Steven ÆB, et al (2009) Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish. *Extremophiles* 13:679–685. doi: 10.1007/s00792-009-0252-4
- Stevens C, Hume I (1995) *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Stirling G, Wilsey B (2001) Empirical relationships between species richness, evenness, and proportional diversity. *The American Naturalist*. 158-3:286-299.
- Storey S (2005) Challenges with the development and approval of pharmaceuticals for fish. *AAPS J* 7:335–343.
- Suárez MD, García-gallego M, Trenzado CE, et al (2014) Influence of dietary lipids and culture density on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) flesh composition and quality parameter. *Aquac Eng* 63:16–24. doi: 10.1016/j.aquaeng.2014.09.001
- Sugita H, Miyajima C (1991) The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquac Eng* 92:267–276.
- Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y (1991) The vitamin B12-producing ability of the intestinal

- microflora of freshwater fish. *Aquaculture* 92:267–276.
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, et al (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol Ecol* 21:3363–3378. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x
- Tailford LE, Crost EH, Kavanaugh D, Juge N (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front Genet*. doi: 10.3389/fgene.2015.00081
- Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, et al (2011) Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 286:35755–35762. doi: 10.1074/jbc.M111.271007
- Tanu, Deobagkar DD, Khandeparker R, Sreepada RA (2012) A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): characterization and extracellular enzymes. *Aquac Res* 43:386–394. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02841.x
- Tatarenkov A, Ring BC, Elder JF, et al (2010) Genetic composition of laboratory stocks of the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*: a valuable resource for experimental research. *PLoS One* 5:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0012863
- Tong M, Mchardy I, Ruegger P, et al (2014) Reprogramming of gut microbiome energy metabolism by the FUT2 Crohn's disease risk polymorphism. *ISME J* 8:2193–2206. doi: 10.1038/ismej.2014.64
- Toufique K, Belton B (2014) Improving developing country food security through aquaculture development - lessons from Asia. *World Dev* 64:609–620.
- Troell M, Kautsky N, Beveridge M, et al (2013) Aquaculture. *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, Waltham MA
- Troell M, Naylor RL, Metian M, et al (2014) Does aquaculture add resilience to the global food system? *pnas* 111:13257–13263. doi: 10.1073/pnas.1404067111
- Tsuchiya C, Sakata T, Sugita H (2008) Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett Appl Microbiol* 46:43–48. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x
- Turchini G, Ng W-K, Tocher D (2010) Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds, CRC Press.
- Turchini GM, Francis DS (2009) Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and beta-oxidation) in rainbow trout fed fish oil- or linseed oil-based diets. *Br J Nutr* 102:69–81. doi: 10.1017/S0007114508137874
- Turchini GM, Hermon K, Cleveland BJ, et al (2013) Seven fish oil substitutes over a rainbow trout grow-out cycle: I) Effects on performance and fatty acid metabolism. *Aquac Nutr* 19:82–94. doi: 10.1111/anu.12046
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenkov T, et al (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484. doi: 10.1038/nature07540
- Ueberschär B (1993) Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Walther BT, Fyhn HJ (eds) *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Norway, pp 233–239
- Vajro P, Paoletta G, Fasano A (2013) Microbiota and gut liver axis: a mini review on their influences on obesity and obesity related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56:461–468. doi: 10.1097/MPG.0b013e318284abb5.MICROBIOTA
- Van Der Maarel MJEC, Sprenger W, Haanstra R, Forney LJ (1999) Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species. *FEMS Microbiol Lett* 173:189–194. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00071-3
- Vernocchi P, Chierico F Del, Putignani L (2016) Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01144
- Verrier ER, Ehanno A, Biacchesi S, et al (2013) Lack of correlation between the resistances to two



- rhabdovirus infections in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 35:9–17. doi: 10.1016/j.fsi.2013.03.369
- Verrier ER, Langevin C, Tohry C, et al (2012) Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0033935
- Villanueva J, Vanacore R, Goicoechea O, Amthauer R (1997) Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: Regional distribution and membrane association. *J Exp Zool* 279:347–355.
- Wacyk J, Powell M, Rodnick K, et al (2012) Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture* 356–357:223–234. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.013
- Weil C, Lefevre F, Bugeon J (2013) Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Fish Biol Fish* 23:157–173. doi: 10.1007/s11160-012-9288-0
- Wenefrida I, Wenefrida I, Utomo HS, et al (2009) Enhancing essential amino acids and health benefit components in grain crops for improved nutritional values. *Recent Pat DNA Gene Seq* 3:219–225.
- Windell J, Norris D (1969) Gastric digestion and evacuation in rainbow trout. *Progress Fish-Culturist* 31:20–26.
- Wold P a., Hoehne-Reitan K, Cahu CL, et al (2009) Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: Effects on gut, liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morha L.*) larvae. *Aquac Nutr* 15:73–84. doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00569.x
- Wong DM, Webb JP, Malinowski PM, Macri J (2009) Proteomic profiling of the prechylomicron transport vesicle involved in the assembly and secretion of apoB-48-containing chylomicrons in the intestinal enterocytes. *Proteomics* 9:3698–3711. doi: 10.1002/pmic.200800914
- Wu S, Gao T, Zheng Y, et al (2010) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 303:1–7. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.12.025
- Wulff T, Petersen J, Nørrelykke MR, et al (2012) Proteome analysis of pyloric caeca: a methodology for fish feed development? *J Agric Food Chem* 60:8457–8464. doi: 10.1021/jf3016943
- Xie G, Wang X, Huang F, et al (2016) Dysregulated hepatic bile acids collaboratively promote liver carcinogenesis. *1775:1764–1775*. doi: 10.1002/ijc.30219
- Xie G, Wang X, Liu P, et al (2016) Distinctly altered gut microbiota in the progression of liver disease. *Oncotarget*. 7-15:19355-19366.
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1463–1468. doi: 10.1073/pnas.96.4.1463
- Yamamoto T, Shima T, Furuita H, Suzuki N (2002) Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 214:289–305.
- Yamamoto T, Tatsuya U, Toshio A (1988) Postprandial changes in plasma free amino acid concentrations of rainbow trout fed diets containing different protein sources. *Fish Physiol Biochem* 64:474–481.
- Yan Q, Li J, Yu Y, et al (2016) Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. *Environ Microbiol* 0:1–16. doi: 10.1111/1462-2920.13365
- Yang Y, Millán L, Mecsas J (2015) Intestinal alkaline phosphatase deficiency leads to lipopolysaccharide desensitization and faster weight gain. *Infect Immun* 83:247–258. doi: 10.1128/IAI.02520-14
- Ye L, Amberg J, Chapman D, et al (2014) Fish gut microbiota analysis differentiates physiology

- and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *ISME J* 8:541–51. doi: 10.1038/ismej.2013.181
- Yoshimoto T, Matsubara F, Kawano E, Tsuru D (1983) Prolidase from bovine intestine: purification and characterization. *J Biochem* 94:1889–1896.
- Yúfera M, Moyano FJ, Astola A, et al (2012) Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS One* 7:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0033687
- Zambonino-Infante JL, Gisbert E, Sarasquete C, et al (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *Feed Dig Funct Fishes* 281–348.
- Zhang K, Hornef MW, Dupont A (2015) Microreview the intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell Microbiol* 17:1561–1569. doi: 10.1111/cmi.12501
- Zhang Y, Øverland M, Shearer KD, et al (2012a) Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *Aquaculture* 360–361:25–36. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.07.003
- Zhang Y, Øverland M, Sørensen M, et al (2012b) Optimal inclusion of lupin and pea protein concentrates in extruded diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344–349:100–113. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.03.012
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Vliet WMA, et al (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 13:129–134.



## Effets de l'alimentation végétale sur les capacités digestives de la truite arc-en-ciel et sur le microbiote associé à sa muqueuse digestive en fonction de son génotype

<u>Doctorante</u> :	<b>Marion BOREY</b>	<u>Laboratoires d'accueil</u> :	IPREM - Equipe Environnement et Microbiologie UMR CNRS 5254 IBEAS - UFR Sciences et Techniques Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau
<u>Directeur de thèse</u> :	<b>Béatrice LAUGA</b> Professeur des Universités		
<u>Codirecteur de thèse</u> :	<b>Christine BUREL</b> Ingénieur en Nutrition des poissons		UMR 1419, NuMÉA Nutrition, Métabolisme Aquaculture Laboratoire INRA, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle

La pression sur les quotas de pêche et l'augmentation de la production aquacole ont contribué à une substitution importante des farines et des huiles de poisson incorporées dans les aliments pour poissons carnivores, par des farines et des huiles végétales. La truite arc-en-ciel, qui est un poisson carnivore, est affectée par ce changement de régime. Ainsi un retard de croissance apparaît dès le plus jeune stade si certaines transformations et suppléments ne sont pas apportés aux végétaux. L'objectif de ce travail a été d'évaluer, aux stades alevins et juvéniles, l'impact d'une substitution totale des huiles et farines de poisson sur le tractus digestif de la truite arc-en-ciel, et plus particulièrement sur ses capacités digestives et sur la composition de son microbiote intestinal. Le but *in fine* étant de déterminer si certaines enzymes de la digestion, transporteurs intestinaux, ou sous-communautés bactériennes sont impactés par le changement de régime et peuvent expliquer le retard de croissance observé. Chacun de ces facteurs ont été étudiés via une approche de métagénomique par séquençage de nouvelle génération NGS pour la caractérisation du microbiote, et via de la PCR quantitative et des mesures d'activités enzymatiques pour la comparaison des capacités digestives. Des lignées isogéniques de truites, identifiées comme divergentes dans leur réponse à l'alimentation végétale (capables d'adaptation ou réfractaires) ont permis de disposer d'un matériel biologique pertinent pour répondre à cette question.

Chez la truite au stade juvénile, l'alimentation végétale conduit à une baisse de la digestibilité des lipides et des niveaux plasmatiques des triglycérides et des acides aminés totaux. Ces perturbations pourraient en partie s'expliquer par une diminution de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, qui témoigne de l'homéostasie intestinale, et de la phospholipase A2. Une baisse de la transcription du transporteur membranaire de triglycérides MTP et de la transcription de la prolidase, peptidase du cytosol des entérocytes, ont également été révélées.

Une modification du microbiote intestinal associé à la muqueuse digestive pourrait également contribuer à la baisse de l'homéostasie intestinale. Le changement de régime conduit en effet à une équitabilité plus faible chez les truites ayant reçu un aliment végétal, ce qui reflète un changement dans la représentativité de certains OTUs. Ce changement de régime s'est également traduit par des communautés dissimilaires en moyenne à 70 %, d'après l'estimation de la  $\beta$ -diversité entre les communautés de truites nourries avec l'aliment marin et celles nourries avec l'aliment végétal. La sélection opérée par l'aliment a conduit à un remplacement des OTUs rencontrés au sein des Firmicutes, c'est-à-dire que différentes espèces bactériennes de Firmicutes sont rencontrées suivant le régime considéré. La comparaison de communautés bactériennes entre les différentes lignées isogéniques a montré que la sélection opérée par le génotype de l'hôte a davantage eu lieu sur le remplacement des  $\beta$ -Protéobactéries. Enfin, les comparaisons d'abondances en certaines espèces bactériennes particulières suggèrent que les bactéries *Cetobacterium somerae*, capables de synthétiser de la vitamine B12, et *Shewanella*, dont l'implication dans la stimulation des cellules  $\beta$  du pancréas endocrine a déjà été observée chez d'autres espèces, pourraient être impliquées dans la réponse métabolique des truites aux végétaux.

Les modifications identifiées dans ce travail constituent des indicateurs biologiques qui pourront être mis à profit pour évaluer la réponse du tractus digestif des truites à de nouvelles formules alimentaires.

## THESIS SUMMARY

---

### Impact of plant-based diet nutrition on rainbow trout digestive capacity and on its associated mucosal microbiota

---

Over-fishing pressure and increasing aquaculture production led to an important substitution of fish oil and fish meal with oil and meal from plant origin in feed meant for farming fish. However this replacement has some deleterious incidence on fish. For rainbow trout, which are carnivorous fish, some growth delay often appears from the early life stages when they are fed with plant based diet. The aim of this work was to assess, at alevin and juvenile stages, the impact of a total replacement of fish meal and oil on rainbow trout gastrointestinal tract, and more particularly on the digestive capacity and the associated microbiota. The objective, in fine, being to determine if some digestive enzymes, intestinal transporters, or bacterial communities are impacted by the dietary replacement and if these biological factors can be related to the observed growth delay. Metagenomic approach using next generation sequencing was used to characterize the gut bacterial communities, while digestive capacity was assessed through quantitative PCR and enzymatic measurements in order to compare rainbow trout responses to a plant-based diet. In our investigations, rainbow trout isogenic lines that diverge in their response to this alternative diet (tolerant or rather reluctant) were adopted because they constitute a pertinent biological material for answering this question.

In alevin rainbow trout, a plant-based diet led to an increase of pepsinogen, trypsinogen, and chymotrypsinogen genes which codes for proteolytic enzymes. Two main assumptions can explain this response, and their effectiveness remains to investigate: whether this is a physiological response due to a lower weight of trout fed with the plant-based diet, or so it is due to an increase transcription of pancreatic enzymes to compensate for a reduction of protein digestibility. In the intestine, it appears that an increase transcription of IAP, SGLT1, CCK-t, and PEPT1 genes, and a decrease transcription of GLUT2 gene under a plant-based diet could reflect a disability to grow under a vegetable diet.

In juvenile rainbow trout, a plant-based diet led to a decrease of lipid digestibility, and of triglycerides and total amino acid plasmatic levels. These perturbations could be explained in part by a decrease of the phosphatase alkaline activity, which suggest perturbances of intestinal homeostasis, and by a decrease of phospholipase A2 activity. Transcriptional decrease of the triglycerides transporter MTP and of the prolidase, which is a peptidase from intestinal cell cytosol, has also been observed.

Some modification of the microbiota associated to the intestinal mucosa could also contribute to the decrease of the intestinal homeostasis. The dietary replacement effectively led to reduce evenness of the bacterial communities in trout fed with a plant-based diet, which reflected a shift in the representativeness of some OTUs. Bacterial community from trout fed with a marine diet and trout fed with a plant-based diet were on average 70 % dissimilar. Dietary substitution led to the replacement of OTUs from the Firmicutes class, different bacterial species being observed according to the considered diet. The comparison of bacterial community between the isogenic lines showed that the genotype led to the replacement of  $\beta$ -Proteobacteria. Finally, abundance comparison suggested that *Cetobacterium somerae*, which is able to synthesise vitamin B12, and *Shewanella*, which has already been reported to stimulate pancreatic  $\beta$  cells, could be implicated in the trout response to vegetable.

Modifications observed in this work constitute biological indicator that could be used to assess the response of the digestive tract to future feed formulations.



ECOLE DOCTORALE :  
211-SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

UMR 1419, NuMÉA  
Nutrition, Métabolisme Aquaculture  
Laboratoire INRA  
64310 Saint-Pée-sur-Nivelle

UMR 5254, EEM  
Equipe Environnement et Microbiologie  
Institut des sciences analytiques et de physico-  
chimie pour l'environnement et les matériaux  
IPREM - MIRA - CNRS/ Univ Pau & Pays Adour  
64000 Pau

Contact  
mail : marionborey@orange.fr