HAL
archives-ouvertes.fr

Développement d'hydrolysats destinés à la formulation d'aliments pour l'aquaculture : normalisation structurale et optimisation fonctionnelle

Alexandre Leduc

▶ **To cite this version:**

Alexandre Leduc. Développement d'hydrolysats destinés à la formulation d'aliments pour l'aquaculture : normalisation structurale et optimisation fonctionnelle. Alimentation et Nutrition. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC290 . tel-02279564

HAL Id: tel-02279564
https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02279564

Submitted on 5 Sep 2019

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Développement d'hydrolysats destinés à la formulation d'aliments pour l'aquaculture : normalisation structurale et optimisation fonctionnelle

Présentée et soutenue par
Alexandre LEDUC

Thèse soutenue publiquement le 16/10/2018 devant le jury composé de		
M. PATRICK KESTEMONT	Professeur, Université de Namur	Rapporteur du jury
Mme SANDRINE SKIBA-CASSY	Chargé de recherche HDR, INRA de Versailles	Rapporteur du jury
M. ERWAN CORRE	Ingénieur de recherche, STATION BIOLOGIQUE de ROSCOFF	Membre du jury
M. VINCENT FOURNIER	Docteur, groupe Symrise/service R&D de DianaAqua	Membre du jury
Mme CELINE ZATYLNY - GAUDIN	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Président du jury
M. JOEL HENRY	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par JOEL HENRY, Biologie des organismes et ecosystèmes aquatiques (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques
BOREA

« *On commence à vieillir quand on finit d'apprendre* ».

Proverbe Japonais

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE) dans l'Unité Mixte de Recherche Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR BOREA, MNHN, CNRS 7208, Sorbonne Université, IRD 207, UCN, UA) à l'Université de Caen Normandie.



Cette thèse a été financée par l'Association Nationale Recherche Technologie dans le cadre de la Convention Industrielle de Formation par la REcherche (CIFRE) n° 2014/1274 avec l'entreprise Diana Aqua du groupe Symrise.



Avant-propos

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes 2 chefs : mon directeur de thèse, Joël Henry, Professeur à l'Université de Caen Normandie et Vincent Fournier, responsable R&D chez Diana Aqua, qui m'ont fait confiance et permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions. Je les remercie pour la qualité de leur encadrement scientifique et humain ainsi que de leur soutien et leurs conseils au quotidien.

J'exprime ma sincère gratitude à Céline Zatylny-Gaudin, Maître de Conférences à l'Université de Caen Normandie, pour son implication dans mon travail et sa grande disponibilité. Ses précieux conseils en immunologie et ses encouragements m'ont beaucoup apporté et m'ont permis de mener à bien ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier le Professeur Pascal Sourdaine pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Caennais de l'Unité Mixte de Recherche Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Associés.

J'exprime toute ma gratitude à Patrick Kestemont, Professeur à l'université de Namur, et Sandrine Skiba-Cassy, Chargée de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de St Pée sur Nivelle, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Erwan Corre, responsable de la plateforme ABiMS de la station biologique de Roscoff, pour l'intérêt qu'il porte à mon travail et pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je tiens également à le remercier vivement pour son traitement bioinformatique des données transcriptomiques, sa gentillesse, son excellente formation (et la qualité indéniable de ses spaghettis).

Je tiens à exprimer mes remerciements à Pascal Favrel, Professeur à l'Université de Caen Normandie et Fabrice Duponchelle, Chargé de Recherche à l'Institut pour la Recherche et le Développement, pour m'avoir accueilli au sein des équipes 2 puis 7 puis D mais finalement C de l'UMR BOREA.

Je me dois de remercier le docteur Jimmy Rangama pour son investissement dans le développement du système d'acquisition. Bon ok...dit comme ça fait pompeux...mais bon moi je le connais depuis 15 ans avec moins de cheveux blancs et moins de kilos aussi. Tu avais forcé mes pauvres petits fibroblastes à léviter dans un octupole à 4000 volts au GANIL pour étudier l'émission de microspray d'électrons

rappelle-toi mon vieil ami... Et bien moi je t'ai fait mesurer la contraction de boyaux qui pendouillent ! Juste retour des choses !

alexandre@DESKTOP-BL7718G :/mnt/c/Users/Alexandre Leduc$ grep -e Gildas remerciements.txt
Je tiens également à remercier Gildas Le Corguillé pour ses conseils et sa patience lors de ma découverte des commandes linux.
alexandre@DESKTOP-BL7718G :/mnt/c/Users/Alexandre Leduc$ exit

Je remercie les membres des plateformes de l'Université de Normandie. Benoît Bernay et Julien Pontin de la plafeforme Protéogen pour les moments passés autour d'un café et d'une table de jeu. Raphaël Delépée de la plateforme PRISM de Caen. Je remercie également, Nicolas Goardon et Angelina Legros de la plateforme SéSAME du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse de Caen.

Je remercie également Magali Hervy, Ingénieur de Recherche chez Diana Aqua, pour son implication dans les tests en bassins à Brest, son accueil et son aide précieuse. Un grand merci également à Christophe Roger de la cellule technique de BOREA pour sa bonne humeur et son atelier toujours ouvert pour aller bricoler et câbler les capteurs. Merci de nous avoir sauvé plusieurs manips en réparant en urgence les pompes du SpeedVac !!! Muchas gracias a Sandra Sritharan por su disponibilidad, participación y amabilidad cuando trabajamos juntos. ¡Larga vida a Chile !

Je veux aussi remercier l'ensemble des membres du laboratoire BOREA, professeurs, maîtres de conférences ainsi que le personnel technique et administratif pour ces 2+3,4 années passées parmi vous. Myriam Présidente !!!

J'adresse également des remerciements aux doctorants et particulièrement au bureau des filles d'une ponctualité redoutable pour aller manger le midi.

Évidemment un grand merci à la Sepia Team : Valérie (alias Valoche, Boue et venin), Baptiste (alias Bapt, Chouquette, Chouck, Kiki) et Maxime (alias Paupiette, Popi Pop's, Max, Maximilien de la Maxense, p'ti gro) pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble au « Bureau des Applications Industrielles » et en dehors du labo bien sûr ! (faut pas déconner non plus...). Ciao les bambinos !

Enfin je tenais à remercier ma femme (la mala mujer !!!), mes familles, mes amis d'ici et de plus loin pour leur inébranlable soutien.

Table des matières

I Introduction générale **17**

1 La pisciculture : Contexte socio-économique **19**

1.1 Histoire de la pisciculture 19
1.2 Une pisciculture moderne pour une production de masse 20
1.3 Enjeux liés au développement de l'aquaculture 21
1.4 Impacts de la pisciculture sur l'environnement 22
1.4.1 Rejets issus des fermes d'élevage 22
1.4.2 Utilisation de poissons sauvages pour la production de poissons d'élevage 25
1.4.3 Les co-produits issus de la pisciculture 26
1.5 Développement de la pisciculture durable 26

2 L'alimentation en pisciculture **27**

2.1 Production mondiale des aliments aquacoles 27
2.2 Principes de fabrication des aliments aquacoles 28
2.3 Composition des aliments aquacoles 31
2.3.1 Les farines et huiles de poisson 31
2.3.2 Les farines d'origine végétale 34
2.4 Performance des aliments à forte teneur en protéines d'origine végétale chez les poissons carnivores 35
2.4.1 Effets des protéines d'origine végétale sur le comportement alimentaire et les performances de croissance du poisson carnivore 35
2.4.2 Effet des protéines d'origine végétale sur les performances alimentaires du poisson carnivore 36
2.4.3 Effet des protéines d'origine végétale sur le métabolisme du poisson carnivore 39
2.4.4 Effet des protéines d'origine végétale sur la composition de la chair du poisson carnivore 40
2.4.5 Effet des protéines d'origine végétale sur la santé du poisson carnivore 40
2.5 Optimisation des régimes alimentaires riches en farines d'origine végétale 42
2.5.1 Supplémentation en acides aminés essentiels des régimes alimentaires riches en farines d'origine végétale 42

2.5.2 Amélioration de la digestibilité des aliments à forte teneur en farines d'origine végétale . . . 43
2.5.3 Procédés industriels pour l'amélioration des farines d'origine végétale . . . 44
2.5.4 Diversification alimentaire de l'apport en protéines d'origine végétale . . . 45
2.5.5 Les aliments aquacoles – évolution récente . . . 47
2.5.6 Les aliments aquacoles – le futur . . . 48

3 Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique 53
3.1 Les co-produits d'origine aquatique . . . 53
3.2 L'hydrolyse de protéines . . . 55
3.3 Caractérisation analytique des hydrolysats de protéines . . . 57
3.4 Valeurs ajoutées des hydrolysats de co-produits . . . 59
3.4.1 Bénéfices nutritionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique . . . 59
3.4.2 Bénéfices fonctionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique . . . 60
3.4.3 Autres domaines d'application des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique . . . 60

4 Modèle d'étude : Le bar européen *Dicentrarchus labrax* 63
4.1 Présentation générale . . . 63
4.1.1 Taxonomie (ID : 13489) . . . 63
4.1.2 Aire de répartition . . . 64
4.1.3 Éléments d'anatomie générale . . . 65
4.1.4 Développement et croissance . . . 65
4.2 Pisciculture du bar européen . . . 66
4.2.1 Production aquacole . . . 66
4.2.2 Élevage en ferme aquacole . . . 67
4.3 Nutrition du bar européen . . . 70
4.3.1 Régime alimentaire . . . 70
4.3.2 Besoins nutritionnels . . . 70
4.3.3 Système digestif . . . 72
4.3.4 Nutrition protéique . . . 75
4.3.5 Alimentation industrielle . . . 78
4.4 Santé chez le bar européen . . . 78
4.4.1 Le système immunitaire chez le bar européen . . . 79
4.4.2 Les principaux agents pathogènes chez le bar européen . . . 83
4.4.3 Stratégie de vaccination chez le bar européen. . . . 84
4.5 Développement d'aliments fonctionnels destinés à améliorer la résistance des poissons . . . 85

5 Contexte et objectifs de la thèse 87

II Matériels et méthodes 91

1 Origine des hydrolysats de protéines 93

2 Caractérisation des performances structurales des hydrolysats de protéines d'origine aquatique – approche peptidomique 95
2.1 Extraction et pré-purification des peptides . . . 95
2.2 Chromatographie liquide haute performance . . . 96
2.2.1 Chromatographie liquide d'exclusion stérique (HPLSEC) . . . 96
2.2.2 Chromatographie en phase inverse C18 (rpHPLC) . . . 96
2.3 Electrophorèse préparative (OFFGEL) . . . 97
2.4 Chromatographie liquide nano (nLC) . . . 97
2.5 Spectrométrie de masse . . . 98
2.5.1 nLC-ESI-orbiTRAP . . . 98
2.5.2 MALDI-TOF/TOF . . . 98
2.6 Détermination des indices de quantité et de diversité en peptide dans les hydrolysats . . . 99
2.7 Dégradation d'Edman . . . 100
2.8 Identification des peptides . . . 101

3 Caractérisation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines d'origine aquatique chez le bar européen – approche *in vivo* 103
3.1 Autorisations réglementaires . . . 103
3.2 Tests de conditionnement alimentaire chez bar européen . . . 103
3.2.1 Essai zootechnique réalisé à la station expérimentale IRTA (Espagne) . . . 103
3.2.2 Essai zootechnique réalisé à la station expérimentale d'IFREMER (Brest) . . . 107

4 Caractérisation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines d'origine aquatique chez le bar européen – approche *in vitro* 111
4.1 Aménagement de la station marine de Luc-sur-Mer . . . 111
4.2 Système d'enregistrement des contractions de l'intestin *in vitro* . . . 112

5 Caractérisation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines d'origine aquatique chez le bar européen – Analyses des prélèvement de tissus 115
5.1 Histologie . . . 115
5.2 Extraction des ARN totaux . . . 116
5.3 Séquençage Illumina . . . 116
5.3.1 Préparation des banques d'ADNc . . . 116
5.3.2 Analyse bioinformatique . . . 117
5.3.3 Génération du transcriptome . . . 117
5.3.4 Annotation des transcrits . . . 118
5.3.5 Analyse de l'expression différentielle . . . 119

6 Analyses statistiques des résultats 121

III Caractérisation structurale des hydrolysats de protéines : développement d'un outil d'analyse de la diversité et de l'abondance en peptides de faible masse moléculaire 123

1 Introduction 125

2 Démarche expérimentale 127
2.1 Hydrolysats de protéines 127
2.2 Caractérisation structurale des hydrolysats de protéines 127
2.3 Représentation des résultats de caractérisation structurale des hydrolysats de protéines 129

3 Résultats et discussion 131
1er article : A standardized and efficient method to characterize the structure of aquatic protein hydrolysates 131

4 Analyse comparée de deux hydrolysats de krill issus de deux process de fabrication différents 139

5 Conclusion 141

IV Caractérisation fonctionnelle des hydrolysats de protéines : détermination des activités myotropes des hydrolysats de protéines et application potentielle en l'aquaculture 143

1 Introduction 145
1.1 Importance du transit digestif chez les poissons 145
1.2 Mécanisme du transit alimentaire 146
1.3 Régulation de la prise alimentaire chez les poissons 148
1.4 Régulation de la motilité intestinale chez les poissons 149
1.5 Etude de l'activité myotrope d'hydrolysats de protéines 151

2 Démarche expérimentale 153

3 Résultats et discussion 155
3.1 Détermination des activités myotropes *in vivo* de deux hydrolysats de protéines chez le bar européen 156
3.1.1 Propriétés myotropes *in vivo* de l'hydrolysat de *Gadidae* . . . 157
3.1.2 Identification d'un peptide myotrope dans l'hydrolysat de crevette et implication potentielle dans la performance de croissance du bar européen 160
2ème article : KNPEQ, a pentapeptide isolated from shrimp by-product hydrolysate (*Litopenaeus vannamei*) demonstrates intestinal myotropic activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) 160

4 Conclusions 171

V Caractérisation fonctionnelle : Identification de marqueurs transcriptomiques pour la mesure de la performance des hydrolysats 173

1 Introduction 175
1.1 La transcriptomique . . . 176
1.2 Etudes transcriptomiques réalisées chez le poisson . . . 178
1.2.1 Études transcriptomiques réalisées sur l'intestin . . . 178
1.2.2 Études réalisées sur le foie . . . 181
1.2.3 Etudes transcriptomiques sur l'intestin et le foie . . . 182

2 Démarche expérimentale 185
2.1 Collaborations sur le projet . . . 186

3 Résultats et discussion 187
3.1 Impact des hydrolysats de protéines sur la régulation transcriptomique de la muqueuse intestinale chez le bar . . . 187
3ème article : Dietary aquaculture by-product hydrolysates : impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets . . . 187
3.2 Impact des hydrolysats de protéines sur la régulation transcriptomique du foie chez le bar . . . 209
3.2.1 Séquençage des échantillons . . . 210
3.2.2 Résultats . . . 210

4 Conclusion 229

VI Conclusions générales et perspectives 233
1.1 De nouveaux outils pour mesurer la performance des hydrolysats de protéines . . . 236
1.2 Les hydrolysats de protéine ont-ils des propriétés permettant d'envisager la limitation de l'utilisation des farines de poisson ? . . . 241

VII Bibliographie 243

Table des figures

1 Chiffres clés marché de la pisciculture 21
2 Répartition de la consommation d'aliments piscicoles entre les principales espèces d'elevage en 2008 28
3 Schéma technique de la formulation d'un aliment piscicole 29
4 Principe de fabrication d'un granulé. 30
5 Tonnages des principales espèces fourrages 32
6 Carte des pays producteurs de farines de poisson 33
7 Evolution du prix des farines de poisson 33
8 Développement des aliments aquacoles pour la salmoniculture en Norvège 47
9 Evolution de la quantité de farine poisson dans les aliments 48
10 Principales voies de valorisation des co-produits de poissons. 54
11 Principes généraux de la réaction d'hydrolyse enzymatique. 56
12 Aire de répartition du bar européen sauvage 64
13 Morphologie générale du bar européen 65
14 Production mondiale de bar européen d'élevage 66
15 Élevage extensif du bar 67
16 Élevage intensif du bar 68
17 Performances de croissance du bar européen en conditions optimales d'élevage 69
18 Organes internes d'un poisson perciforme 72
19 Organisation cellulaire d'une villosité intestinale 73
20 Coupe histologique d'un intestin de bar européen 74
21 Mécanismes d'absorption des acides aminés libres, di et tri peptides . 77
22 Relation des différents facteurs dans la santé des poissons 79
23 Schéma récapitulatif des systèmes de défense immunitaire chez le bar européen 80
24 Tissu lymphoïde associé au tube digestif 81
25 Résumé graphique des objectifs de la thèse. 89
26 Méthodologie d'analyse des propriétés structurales des hydrolysats. . 94
27 Bassins de la station marine de Luc-sur-mer 110
28 Système d'enregistrement des contractions de l'intestin 112
29 Données de calibration de la colonne de HPLSEC 129
30 Peptides identifiés dans l'hydrolysat de krill 140
31 Le réflexe péristaltique 147
32 Principales voies de régulation de la prise alimentaire chez les poissons 148
33 Composés agissant sur les neurones contrôlant la contraction de la musculeuse intestinale. 149
34 Cuve de perfusion et enregistreur à rouleau 153

35 Effet des hydrolysats sur l'intestin de bar 155
36 Taux spécifiques de croissance obtenus avec l'hydrolysat de *Gadidae* . 157
37 Cinétiques d'émission des fèces obtenues avec l'hydrolysat de *Gadidae* 158
38 Workflow d'une analyse réalisée en RNA-seq *de novo* 177
39 Échantillonnage IRTA 184
40 Nombre d'occurrences des annotations BlastX 212
41 Répartition des transcrits différentiellement exprimés par rapport au régime pauvre en farine de poisson 213
42 Répartition des transcrits différentiellement exprimés par rapport au régime riche en farine de poisson 214
43 Répartition des transcrits différentiellement exprimés entre le régime riche en farine de poisson et le mélange d'hydrolysats 215
44 Enrichissement en annotations GO, effet de la part de farine de poisson dans l'aliment 216
45 Enrichissement en annotations GO, effet de l'hydrolysat de crevette dans l'aliment 217
46 Enrichissement en annotations GO, effet du mélange d'hydrolysats dans l'aliment 218
47 Régulation des voies métaboliques hépatiques 219
48 Aperçu des fenêtres de Trinotate Web. 240
49 Différentes étapes standardisées de la caractérisation structurale complète d'un hydrolysat de protéine. 241

Liste des tableaux

1 Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces piscicoles. 24
2 Besoins en poissons sauvages des principales espèces d'élevage 25
3 Composition proximale de deux qualités de farine de poisson. 31
4 Principaux facteurs anti-nutritionnels des farines d'origine végétale. . 35
5 Exemples de quelques études sur l'inclusion des farines d'origine végétale sans altération des performances de croissance des poissons. . . 46
6 Comparaison de la composition de la farine de krill et des farines de poisson 49
7 Quantités de protéines dans les farines d'insectes autorisées en alimentation aquacole. 50
8 Principales applications alimentaires et pharmaceutiques des co-produits d'origine marine 54
8 Principales applications alimentaires et pharmaceutiques des co-produits d'origine marine (Suite). 55
9 Besoins nutritionnels de différents poissons d'élevage 71
10 Besoins en acides aminés indispensables 71
11 Sites de coupure des enzymes digestives protéolytiques. 76
12 Composition d'aliments destinés à la pisciculture du bar européen . . 78
13 Cellules de l'immunité innée chez les poissons. 81
14 Molécules humorales non spécifiques ainsi que leur composition et leur mode d'action chez les poisssons 82
15 Cytokines des poissons téléostéens ainsi que leurs fonctions et/ou structure 83
16 Principales pathologies du bar européen 83
16 Principales pathologies du bar européen (Suite). 84
17 Performances fonctionnelles des additifs alimentaires 85
17 Performance fonctionnelle des additifs alimentaires 86
18 Composition des régimes alimentaires (essai IRTA). 105
19 Composition des régimes alimentaires (essai IFREMER de Brest). . . 108
20 Résultats de l'identification des peptides 140
21 Seuils d'activité myotrope des hydrolysats testés 156
22 Études transcriptomiques sur la nutrition 179
23 Nombre de transcrits différentiellement exprimés dans le foie 211
24 Les 20 voies métaboliques hépatiques les plus modulées par les différents régimes alimentaires. 221
25 Liste des 10 principales voies de signalisation modulées par les différents régimes alimentaires. 222
26 Biomarqueurs associés au développement de l'intestin 232

Abréviations

AA(I) : Acide aminé (indispensable)
AB : Bleu Alcian
ACN : Acétonitrile
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF : Acide formique
ARN(m) : Acide ribonucléique (messager)
AcOH : Acide acétique
CCK : Cholécystokinine
CGRP : Peptide lié au gène de la calcitonine
CHCA : Acide α-cyano-4-hydroxy cinnamique
DE : Différentiellement exprimé
DH : Degré d'hydrolyse
DHA : Acide docosahexaénoïque
DPA : Acide docosapentaénoïque
EPA : Acide eicosapentaénoïque
ESI : Ionisation par électro-spray
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FAN : Facteur anti-nutrititionnel
FC : Facteur de variation
FDR : « False discovery rate »
FH : Hydrolysat de poisson
FM/FP : Farine de poisson
FPKM : « Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped »
FV : Farine d'origine végétale
GALT : Tissu Lymphoïde associé au tube digestif
GILT : « Interferon-γ inducible lysosomal thiol reductase »
GO : « Gene Ontology »
GRL : Ghréline
(rp)HPLC : Chromatographie liquide haute performance (en phase inverse)
HPLSEC : Chromatographie liquide haute performance d'exclusion stérique
HV : Huile d'origine végétale
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER
IRTA : « Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries »
KEGG : « Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes »
MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice.
MH : Mélange d'hydrolysats
MS/SM : Spectrométrie de masse
nLC : Chromatographie liquide nano
NPY : Neuropeptide Y

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PACAP : « Pituitary adenylate cyclase-activating peptide »
PAS : Acide périodique de Schiff
PAT : Protéine animale transformée
(q)PCR : Réaction de polymérisation en chaine (quantitative)
SH : Hydrolysat de crevette
SGR : Taux de croissance spécifique
SL : Longueur standard
SR : Taux de survie
TH : Hydrolysat de tilapia
TOF : Analyseur temps de vol
UA : Unité d'absorbance
UFC : Unité formant colonie
TFA : Acide trifluoroacétique
TGF : « Transforming growth factor »
TK : Tachykinine
USH : Unité Spectrophotométrique d'Hydrolysat
VIP : « Vasoactive intestinal peptide »

Première partie

Introduction générale

1 La pisciculture : Contexte socio-économique

L'aquaculture regroupe de nombreux champs d'applications. Dans la définition de l'Institut National de la Statistique et des Études Économiques, l'aquaculture « *est l'ensemble des activités de culture de plantes et d'élevage d'animaux en eau continentale ou marine en vue d'en améliorer la production, impliquant la possession individuelle ou juridique du stock en élevage. Elle regroupe la pisciculture (élevage de poissons), la conchyliculture (élevage de coquillages marins : huîtres, moules, praires, coques, etc.), l'algoculture (culture d'algues) et la carcinoculture (élevage de crustacés, essentiellement crevettes et écrevisses)* ».

Il est donc utile de préciser que, dans ce manuscrit, seule la pisciculture d'espèces de poissons d'élevage destinés à la consommation humaine sera abordée. Ainsi, les travaux présentés dans les paragraphes suivants traiteront de la caractérisation d'hydrolysats de protéines et de leurs performances chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), poisson marin carnivore.

1.1 Histoire de la pisciculture

Les premiers témoignages de la culture de poisson remontent à plusieurs millénaires en Chine et en Afrique orientale (Egypte, Mésopotamie)
[Beveridge et Little, 2007]. La pisciculture a très probablement commencé par la stabulation et le grossissement de poissons sauvages capturés. Ce type d'élevage perdure toujours avec notamment l'élevage du thon rouge qui est pêché en mer puis engraissé dans des cages en mer. La pisciculture s'est développée conjointement en Asie et en Afrique vers 400-500 avant J.C. Au moyen-âge, la culture extensive a

débuté en Europe dans les mares en réponse à la surpêche des cours d'eau et aux problèmes environnementaux qui pouvaient survenir [Hoffmann, 2005].

L'industrialisation de la pisciculture a réellement débutée au XX^{ème} siècle. Depuis les années 50, elle connaît une croissance exponentielle et les tonnages produits ont été multipliés par 173 entre 1950 et 2015. La pisciculture fournira dans l'avenir la majeure partie de la production mondiale de poissons consommée [FAO, 2016b].

1.2 Une pisciculture moderne pour une production de masse

Depuis les années 50, à l'image de l'agriculture, la pisciculture a subi une transformation en profondeur. En effet, elle est passée d'une culture extensive familiale à une culture intensive plus industrielle. La mécanisation du travail ainsi que l'industrialisation des aliments sont les clés de ce développement spectaculaire. La Chine reste de loin le premier pays à pratiquer la pisciculture, tandis que le phénomène s'étend aux autres continents. Le Chili et l'Indonésie ont également enregistré une croissance remarquable, tout comme la Norvège et le Vietnam, respectivement en 2ème et 3ème position mondiale dans l'exportation de poissons. Sur le continent africain, au Nigéria, la production aquacole est vingt fois plus importante aujourd'hui que lors des deux dernières décennies et l'ensemble de l'Afrique subsaharienne semble suivre cette expansion. Aujourd'hui, les exploitations aquacoles emploient près de 20 millions de personnes dans le monde. Ces exploitations produisent jusqu'à 30 kg de biomasse/m^2 pour des cultures intensives telles que celles du tilapia ou du panga. La production mondiale de poissons destinée à la consommation humaine est passée de 15,3 à 129,9 millions de tonnes en moins de 70 ans. En 2016, les valeurs échangées concernant la production de poisson représentaient 140,0 milliards de dollars. Un récapitulatif des chiffres clés du marché de l'aquaculture du poisson est présenté **Figure 1**.

Depuis le milieu des années 80, la production en poissons issus de la pêche se stabilise autour de 90 millions de tonnes par an tandis que la pisciculture poursuit sa croissance [FAO, 2014]. En 2014, la production de l'aquaculture a atteint 74 millions de tonnes et les projections donnent qu'à l'orée des années 2030, la pisciculture

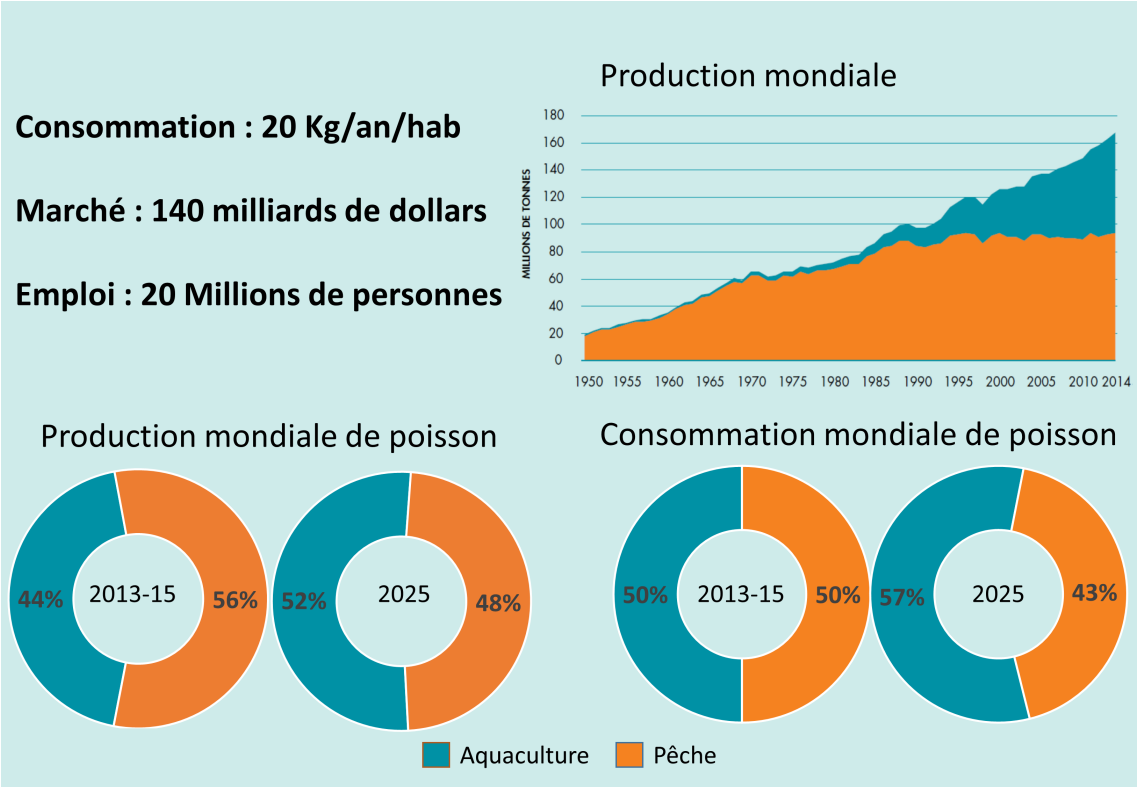


FIGURE 1 – Chiffres clés marché de la pisciculture (Données FAO 2016).

pourrait fournir entre 16 et 47 millions tonnes de tonnes de poisson supplémentaires [Hall *et al.*, 2013]. En 2014, 87,5% du poisson produit était destiné à la consommation humaine. En 2016, la consommation mondiale de poisson a dépassé 20 kg/an et par habitant. Cette consommation a doublé depuis les années 60 notamment par l'expansion de l'aquaculture.

1.3 Enjeux liés au développement de l'aquaculture

Ces cinquante dernières années, la production de poissons (pêches et poissons d'élevage) a suivi une croissance plus rapide que celle de la démographie mondiale. En 2050, les volumes de poissons à fournir seront considérables car la population mondiale devrait atteindre 9 milliards de personnes.

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a très clairement indiqué que la pisciculture contribue et doit continuer de contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous [FAO, 2016b]. La faim et la malnutrition sont les fléaux mondiaux les plus dévastateurs, et elles sont indissociables de la pauvreté. Quelque 795 millions de personnes souffrent de sous-alimentation

à l'échelle mondiale [FAO - FIDA - WFP, 2015]. De nombreux pays se sont déjà engagés à lutter contre la malnutrition et à transformer les systèmes alimentaires afin de garantir pour tous un régime alimentaire équilibré tout en s'assurant d'une meilleure gestion des ressources dans le monde [Thilsted *et al.*, 2013].

Le poisson suscite un grand intérêt dans la lutte contre la malnutrition car il apporte une source importante de protéines animales et il est également riche en lipides d'intérêt. Parmi ces derniers, on retrouve notamment certains acides gras oméga 3, dont un apport alimentaire permet de limiter les problèmes cardio-vasculaires chez l'homme adulte et reste indispensable au développement neurologique chez les nourrissons et les jeunes enfants. Ces effets bénéfiques ont notamment été observés lorsque la mère a consommé du poisson avant et pendant sa grossesse [FAO, 2010]. Le poisson apporte également, surtout lorsqu'il est consommé entier (petits poissons), des minéraux essentiels (iode, sélénium, zinc, fer, calcium, phosphore et potassium) et des vitamines (A, D et B) [Roos *et al.*, 2007]. La pisciculture bénéficie également d'un avantage important par rapport aux élevages terrestres. En effet, les taux de conversion alimentaire des espèces piscicoles sont plus faibles que des animaux terrestres. Si dans la nature, une truite a un taux de conversion de l'ordre de 7 (pour produire 1 kg de truite sauvage, 7 kg d'aliment naturel (proies) sont nécessaires), en pisciculture, il sera proche de 1 avec des aliments secs formulés. Plus généralement, selon les espèces de poissons, ce taux oscille entre 0,7 et 3 en fonction des zones géographiqes et des systèmes d'élevage. Il est de 10 pour le boeuf et de 25 si l'on considère seulement la viande bovine consommée [Smil, 2002, Tacon et Metian, 2008].

1.4 Impacts de la pisciculture sur l'environnement

Le développement de la pisciculture, aussi indispensable qu'il soit, se doit de limiter au maximum son impact sur l'homme, sur les espèces animales et sur l'environnement pour garantir un caractère durable à cette activité.

1.4.1 Rejets issus des fermes d'élevage

L'exploitation des poissons d'élevage est considérée comme une activité professionnelle polluante qui impacte l'environnement localement mais également jusqu'à

un kilomètre du site d'exploitation [Wu, 1995]. Comme pour toute industrie d'élevage animal, elle génère des déchets organiques résultant de la production de fèces des poissons, de la décomposition des aliments non ingérés mais également de l'excrétion des poissons (urine, respiration). Dans les fermes de saumons, les taux de dispersion dans l'environnement (eau et sédiment) sont de 80–84% pour le carbone, 76–80% pour l'azote et 84% pour le phosphate [Wu, 1995]. D'après l'Agence Norvégienne de Contrôle de la Pollution, un élevage de 3 120 tonnes de saumon par an génère autant de pollution en azote et phosphate qu'une ville de 50 000 habitants. Les exploitations génèrent également des pollutions aux métaux (cuivre, zinc, fer, manganèse) issus de la nourriture mais également des produits de nettoyage et de la peinture utilisée.

Utilisation de produits vétérinaires

L'apport organique des fermes d'élevage peut engendrer une prolifération accrue de microorganismes (bactéries et champignons) qui se nourrissent des rejets des poissons et de la nourriture non consommée. L'élevage intensif des poissons, par la forte concentration d'animaux et la multiplication des microorganismes, peut augmenter les risques d'apparition de foyers épidémiques (bactéries, virus, parasites).

Pour lutter contre l'installation ou la propagation des maladies dans les élevages, les professionnels ont recourt aux antibiotiques (63 151 tonnes en 2010 tous élevages confondus) [FAO, 2016a]. La FAO considère que la situation se dégrade et représente l'un des risques les plus graves pour la santé humaine à échelle mondiale [FAO, 2016a]. En effet, si la réglementation est très stricte concernant l'utilisation des antibiotiques en Europe, la majorité des pays producteurs de poissons sont soumis à des réglementations plus souples. Ces médicaments sont alors utilisés en prophylaxie. Pour illustrer ce problème, les quantités d'antibiotiques utilisées pour l'élevage du saumon varient d'environ 0,02–0,39 g/tonne de biomasse produite en Ecosse et Norvège à environ 600 g/tonne au Chili [Watts *et al.*, 2017].

Ce comportement est une préoccupation majeure des services sanitaires locaux. En effet, l'utilisation intensive d'antibiotiques aboutit à l'émergence de souches résistantes. Aussi, depuis 1990, les premières souches résistantes ont été détectées *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella*

ictaluri, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Pasteurella piscicida* et *Yersinia ruckeri* [DePaola *et al.*, 1995].

Ces pathogènes se retrouvent dans les poissons destinés à la consommation mais également dans le sédiment situé à proximité des élevages augmentant le risque de propagation des épidémies. [Harper, 2002]. Certaines bactéries se transmettent également aux consommateurs (zoonose) et le coût de traitement des patients contaminés, en particulier par des bactéries résistantes, se chiffre en centaines de millions d'euros dans le monde par an [Serrano, 2005].

A l'échelle de la ferme d'élevage, l'apparition de certaines infections ou pathologies doit être déclarée auprès des services vétérinaires (**Tableau 1**). L'exploitation doit alors être entièrement décontaminée et les poissons sacrifiés s'ils ne peuvent pas subir de traitement vétérinaire profilaxique. Les pertes financières liées à ces pathologies sont alors très impactantes pour les éleveurs.

Tableau 1 – Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces piscicoles.

Dénomination	**Danger sanitaire visé**	**Espèces visées**
Anémie infectieuse des Salmonidés	Infection par le génotype délété dans la RHP du virus du genre Isavirus (ISAV)	Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), truite fario (*Salmo trutta*)
Herpèsvirose de la carpe	« Virus de l'herpès virose de la carpe (*Herpesviridae, Herpesvirus*) »	Carpes (*Cyprinus carpio*)
Nécrose hématopoïétique infectieuse	Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (*Rhabdoviridae*, *Novirhabdovirus*)	Saumons : Atlantique (*S. salar*), keta (*O. keta*), argenté (*O. kisutch*), japonais (*O. masou*), sockeye (*O. nerka*), chinook (*O. tshawytscha*), truite biwamasou (*O. rhodurus*) et truite arc-en-ciel (*O. mykiss*)
Nécrose hématopoïétique épizootique	Virus de la nécrose hématopoïétique épizootique (*Iridoviridae, Ranavirus*)	Truites arc-en-ciel (*O. mykiss*) et perche commune (*Perca fluviatilis*)
Septicémie hémorragique virale	Virus de la septicémie hémorragique virale (*Rhabdoviridae*, *Novirhabdovirus*)	Saumons du Pacifique, truites arc-en-ciel et fario, brochets, corégones, ombres communs, turbots, morues de l'Atlantique et du Pacifique, harengs, aiglefins et sprats. Motelle (*Onosmotellus*) Cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*)
Syndrome ulcéreux épizootique	*Aphanomyces invadans*	Poissons exotiques des genres *Catla*, *Channa*, *Labeo*, *Mastacembelus*, *Mugil*, *Puntius* et *Trichogaster*

Un autre facteur d'agravation est le faible nombre de molécules antbiotiques disposant d'une autorisation de mise sur le marché (Oxytétracycline, Florfénicol,

Sarafloxacine, Erythromycine et Sulphonamides) [Serrano, 2005]. La situation nécessite que les professionels s'emparent du sujet pour limiter les risques sanitaires [Kennedy *et al.*, 2016].

1.4.2 Utilisation de poissons sauvages pour la production de poissons d'élevage

Le développement important de la pisciculture moderne se traduit par une forte pression de pêche exercée sur les espèces de poissons dites « fourrages » (sardines, anchois...) qui seront, dans leur très grande majorité, transformés en farines et huiles de poisson, entrant dans la composition des aliments aquacoles. En 2014, cette pêche représentait 20,9 millions de tonnes soit 22,4% des captures totales [FAO, 2016b].

La pression de pêche sur les espèces fourrages s'explique par le fait que les aliments aquacoles destinés aux poissons d'élevage contenant des huiles et des farines de poisson sont utilisés dans 41,6% de la production aquacole mondiale (chiffre de 2008) [FAO, 2012]. Plus précisément, seulement 8 espèces (ou groupes d'espèces) consomment, à elles seules, 62,2% des aliments aquacoles produits. Elles présentent de grandes disparités en termes de besoins en équivalent poissons sauvages (**Tableau 2**).

Tableau 2 – Besoins en poissons sauvages (en tonnes) des principales espèces d'élevage [Jackson, 2009].

Espèces produites	Tonnes produites	Besoins en poissons sauvages	ratio
Saumon[a]	1 465 000	7 220 000	4,9
Anguille[b]	266 000	927 000	3,5
Truites[c]	632 000	2 180 000	3,4
Poissons marins[d]	1 536 000	3 316 000	2,2
Crevettes marines[e]	3 164 000	4 399 000	1,4
Poisson-Chat[f]	1 809 000	856 000	0,5
Tilapia[g]	2 326 000	854 000	0,4
Poisson-Lait[h]	585 000	94 000	0,2
Carpes[i]	10 225 000	1 881 000	0,2

a. *S. salar, O. kisutch, O. tshawytsha*
b. *A. japoncia, A. anguilla, A. australis*
c. *O. mykiss, S. fontinalis, S. trutta*
d. *S. quiqueradiata, L. japonicus, S. aurata, P. auratus, D. labrax, Bothidae...*
e. *P. vannamei, P. merguiensis, P. monodon, P. japonicus, P. chinensis, P. indicus...*
f. *Pangasius spp, I. punctatus, S. asotus, C. gariepinus x C. macrocephalus...*
g. *O. niloticus, O. mossambicus, O. aureus, O. andersonii, O. spilusus...*
h. *C. chanos*
i. *C. idellus, C. carpio, C. carassius, P. pekinensis, M. piceus ; espèces filtreuses*

1.4.3 Les co-produits issus de la pisciculture

La pisciculture, génère également beaucoup de co-produits qui sont issus de la transformation des poissons. A titre d'exemple, les opérations de transformation des poissons génèrent environ 45% du poids des poissons en co-produits. La quantité de ces derniers ainsi produite représente à l'échelle mondiale 2,8 millions de tonnes par an [Rai *et al.*, 2012]. Ces co-produits peuvent impacter l'environnement s'ils ne sont pas correctement valorisés [Islam *et al.*, 2004].

1.5 Développement de la pisciculture durable

Le développement de la pisciculture, mais également de l'aquaculture, passera par la mise en place de mesures visant à promouvoir la durabilité de cette activité. Ce défi est stimulant car il repose sur de nombreux paramètres.

Dans un premier temps, l'aquaculture doit devenir plus « propre ». Cela repose à la fois, sur la diminution de l'impact des exploitations sur l'environnement par une meilleure gestion des effluents, mais également par une diminution de l'utilisation des produits pharmaceutiques. Dans ce but, de nombreux travaux sont aujourd'hui menés sur la mise au point d'infrastructures d'élevage innovantes, mais également sur la recherche d'aliments fonctionnels plus performants, susceptibles d'améliorer la résistance des animaux aux variations des facteurs biotiques et abiotiques.

Un autre axe d'amélioration passe par la diminution de la pression de pêche sur les espèces fourrage utilisées dans l'alimentation des poissons. La diminution des stocks de poissons, couplée à l'augmentation des prix des farines et huiles de poisson liée à la forte demande du marché, aboutit actuellement à une recherche active de matières premières alternatives par les fabricants d'aliments aquacoles.

2 L'alimentation en pisciculture

2.1 Production mondiale des aliments aquacoles

Les premiers aliments aquacoles élaborés à partir de diverses matières premières et couvrant les besoins nutritionels des animaux étaient des granulés « humides », et ont été développés aux Etats-Unis, en Oregon dans les années 50 à destination des élevages de truites. Les granulés secs de type pressé sont ensuite apparus dans ce même pays à la fin de la même décennie puis au début des années 60 en Europe. Les premiers aliments destinés à la salmoniculture (granulés semi-humides ou secs de type pressé) ont été commercialisés dans les années 80. Par la suite, les granulés extrudés sont apparus dans les années 90. Avec la diversification des espèces élevées en pisciculture, les aliments destinés aux poissons marins, ont été développés, à partir des aliments pour salmonidés. Puis au fur et à mesure de la détermination des besoins nutritionnels des poissons marins, ils se sont diversifiés pour devenir une gamme d'aliments spécifiques [Guillaume *et al.*, 1999].

Le marché des aliments aquacoles est en constante progression. Liée au développement de la pisciculture, la production globale d'aliments aquacoles est passée de 7,6 millions tonnes en 1995 à 29,2 millions tonnes en 2008 (dont 78,2% destinées à la pisciculture), ce qui correspond à un taux de croissance de 11% par an. La demande mondiale d'aliments aquacoles devrait atteindre 51,0 millions de tonnes en 2015 et 71,0 millions des tonnes en 2020 [FAO, 2012].

La **Figure 2** présente les principaux poissons consommateurs d'aliments piscicoles dont les carpes non filtreuses consommant environ le tiers de la production mondiale.

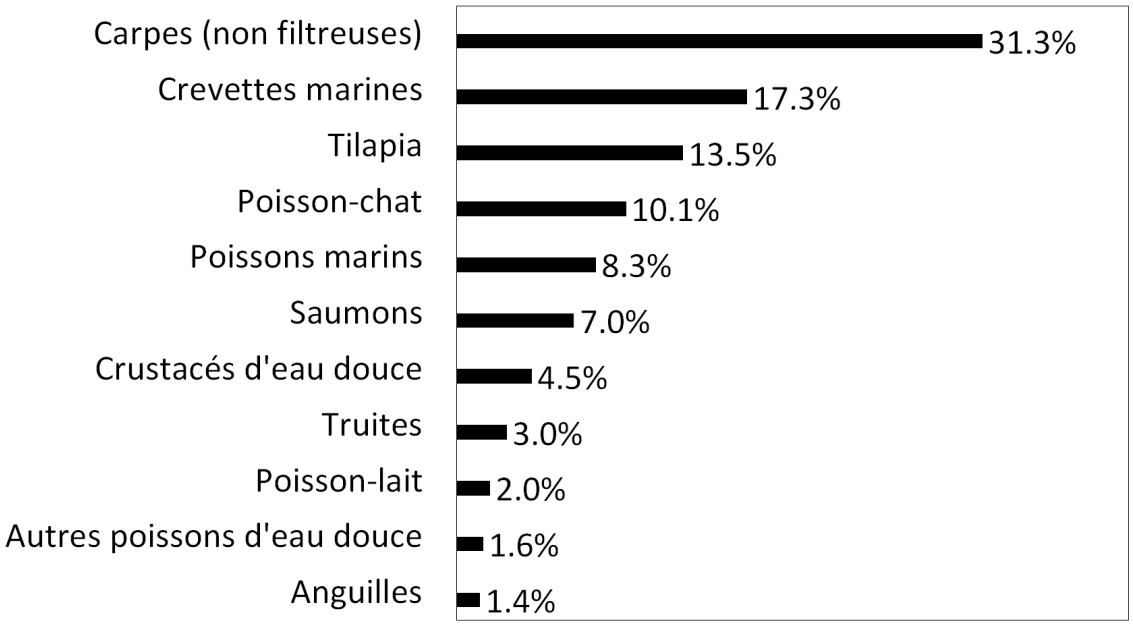


FIGURE 2 – Répartition de la consommation d'aliments piscicoles entre les principales espèces d'elevage en 2008 [FAO, 2012].

2.2 Principes de fabrication des aliments aquacoles

La fabrication des aliments aquacoles est un processus complexe. Il ne s'agit plus de simplement mélanger des matières premières afin de produire un aliment aussi peu coûteux que possible ou parfaitement adapté aux besoins nutritifs d'une espèce de poisson en particulier. En effet, la formulation implique désormais une optimisation des coûts des matières premières et de nombreux paramètres, parmi lesquels les contraintes techniques liées au process de fabrication, les performances zootechniques ciblées mais également l'impact environnemental de l'utilisation de l'aliment dans les fermes d'élevage (**Figure 3**).

Les aliments aquacoles doivent en premier lieu permettre de garantir un apport équilibré en macro-nutriments aux poissons : les protéines (farines de poisson (FP), d'origine animale ou végétale), les lipides (huiles de poisson, d'origine animale, ou végétale), les glucides ; ainsi qu'en micro-nutriments : mélanges de vitamines et de minéraux. Outre ces ingrédients principaux, les aliments aquacoles contiennent éga-

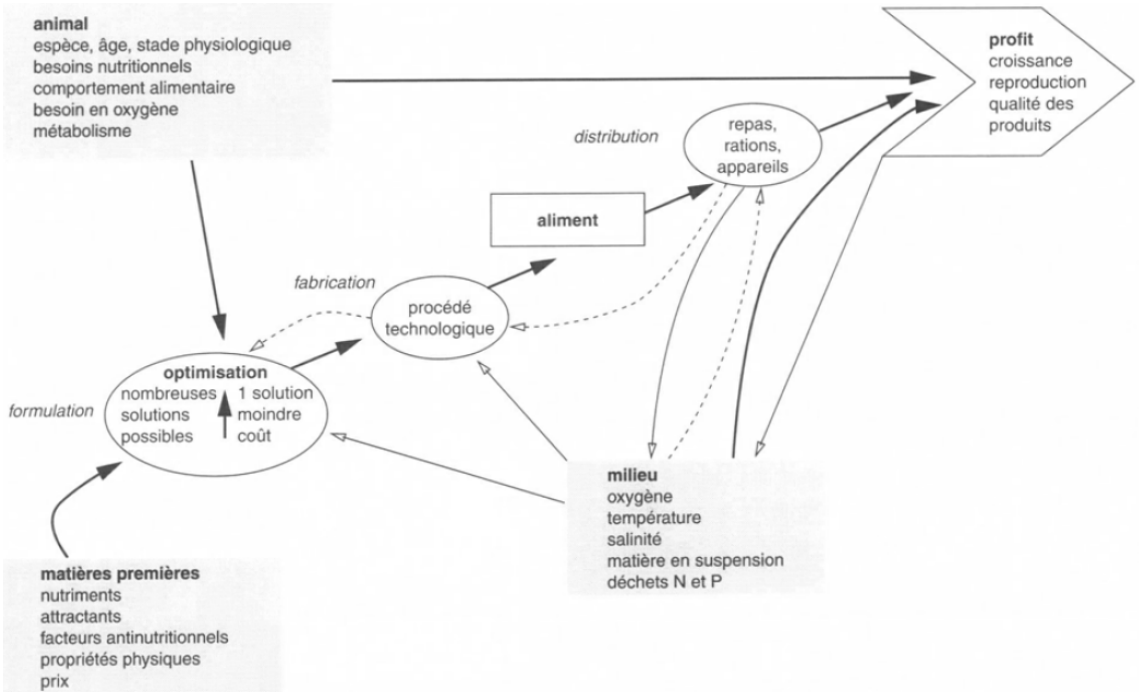


FIGURE 3 – Schéma technique de la formulation d'un aliment piscicole [Guillaume *et al.*, 1999].

lement des additifs visant à équilibrer le profil nutritionnel de l'aliment aux besoins nutritionnels du poisson (acides aminés libres), à améliorer l'appétence de l'aliment (nucléosides, bétaïne...) et à assurer sa stabilité dans le temps (antioxydants et conservateurs).

La composition nutritionnelle, la taille et la texture de l'aliment doivent être adaptées aux besoins nutritionnels, au stade physiologique, ainsi qu'au comportement alimentaire de l'espèce ciblée. Ainsi, la texture détermine le comportement du granulé dans l'eau et doit être choisie en fonction du comportement alimentaire du poisson. Le granulé pourra ainsi être flottant, coulant ou semi-flottant. La texture de l'aliment est ainsi le deuxième critère par ordre d'importance pour la formulation des aliments.

Il existe principalement deux types d'aliments : les aliments pressés et les aliments extrudés. Ces derniers sont obtenus par des procédés de fabrication différents : le pressage et la cuisson-extrusion (**Figure 4**).

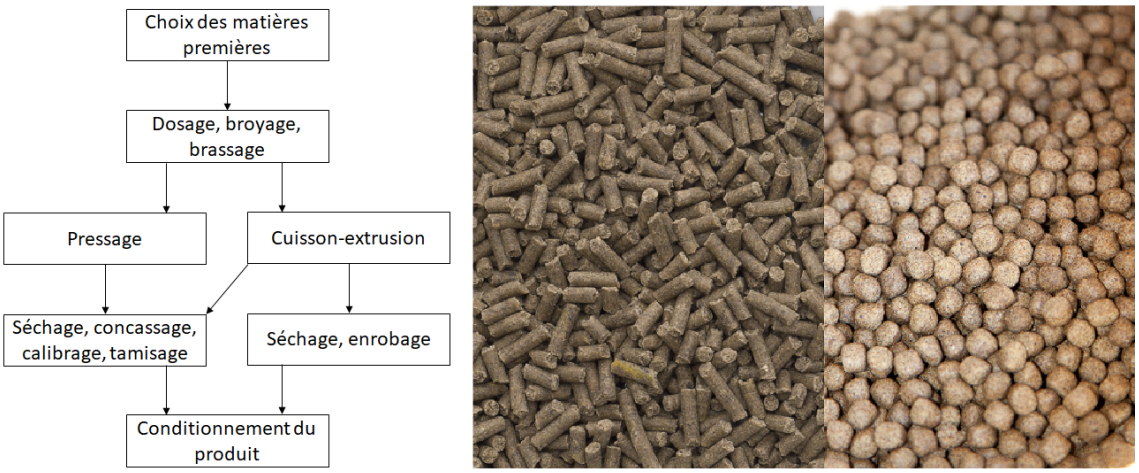


FIGURE 4 – Principe de fabrication d'un granulé. L'aliment de gauche est pressé et celui de droite extrudé. Photos : Diana Aqua.

Les premières étapes (broyage et mélange des matières premières) sont communes aux deux procédés puis les étapes suivantes diffèrent. Le pressage consiste à faire passer le mélange à travers les perforations d'une filière grâce à un assemblage de galets (rouleaux) dans une presse. L'aliment ressort sous forme de granulés de longueur et de diamètre déterminés grâce à la présence de couteaux fixes.

Pour le procédé de cuisson-extrusion, le mélange est déposé dans un extrudeur chauffé (90 à 120°C) et mis sous pression (30 à 120 bars) pendant un temps court (moins de 30 secondes) puis forcé au travers d'une filière et coupé par un couteau « granulateur ». Le retour à la pression atmosphérique en sortie de filière provoque l'expansion des granulés.

La suite du processus (séchage, refroidissement, enrobage, tamisage, conditionnement) peut être commune à la fabrication par pressage ou cuisson-extrusion. Il est à noter que l'étape d'enrobage, qui est appliquée pour les aliments extrudés, consiste essentiellement à ajouter de la matière grasse dans un équipement spécifique (enrobeur) sous vide ou à pression atmosphérique. Des acides gras essentiels, des vitamines liposolubles ou hydrosolubles en émulsion et des agents attractants peuvent également être appliqués par cette méthode. L'enrobage de matière grasse permet également de limiter la formation de fraintes lors du transport des granulés

et ralentir le délitement des granulés dans l'eau.

Le processus de fabrication influence les caractéristiques physiques des granulés. Aussi, les granulés pressés sont très denses et ont une teneur maximale en matière grasse limitée à ≃14%, ils sont ainsi du type « coulant ». A l'inverse, les granulés extrudés ont une densité variable qui peut être maîtrisée, ils sont poreux et peuvent être « flottants », « coulants » ou « semi-flottants » et la proportion de matière grasse maximale autorisée par le process de fabrication est alors plus importante (25 à 30%) [Guillaume *et al.*, 1999].

2.3 Composition des aliments aquacoles

Les études réalisées depuis les années 50 pour déterminer les besoins nutritionnels des poissons ont permis d'améliorer progressivement les performances des aliments aquacoles.

Depuis les années 70, les aliments destinés aux poissons carnivores ont subi de nombreuses évolutions afin de faire « mieux avec moins », le but étant de diminuer la dépendance aux FP et de limiter la pollution par les déchets azotés et phosphorés dans les fermes d'élevage [Médale et Kaushik, 2009].

2.3.1 Les farines et huiles de poisson

Pour l'alimentation des poissons carnivores, les producteurs d'aliments ont dans un premier temps eu recours à l'utilisation massive des FP issues de captures de poissons sauvages. Cette matière première est une excellente source de protéines et de lipides hautement digestibles (**Tableau 3**). Les FP sont également équilibrées en acides aminés indispensables (AAI) et présentent de bonnes propriétés d'appétence [Hardy, 2010].

Tableau 3 – Composition proximale de deux qualités de farine de poisson.

Matière brute	Protéine	Matière grasse	Cendre	Energie (Kcal/g)
Farine 65	64,6–66,2	5,5–9,6	15,6- 21,4	4,60–4,78
Farine 72	71,3–71,6	1,8–9,5	11,0–16,8	4,30–4,94

Néanmoins, dans un contexte de croissance importante de l'aquaculture, leur utilisation massive dans les aliments aquacoles n'est plus durable. La production d'un kg de FP nécessite de 4 à 5 kg de poissons frais. L'huile de poisson, quant à elle, représente 10% du poids de la farine produite [de Silva et Anderson, 1994].

Les poissons entrant dans la composition de la FP sont pêchés dans ce but uniquement (pêche minotière) ou sont issus de captures accessoires résultant du chalutage de poissons de consommation. Les principales espèces fourrages sont présentées **Figure 5**.

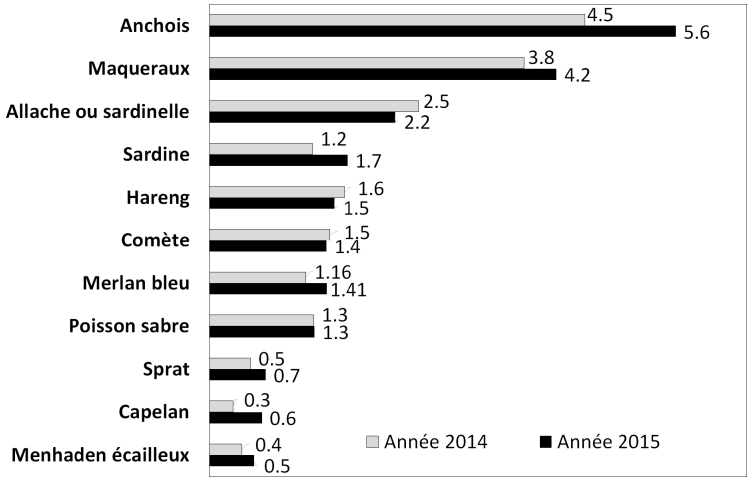


FIGURE 5 – Tonnage des principales espèces fourrages (millions de tonne). Anchois (*Engraulis ringens*, *Engraulis japonicus*), Allache ou sardinelle (*Sardinella spp*), Hareng (*Clupea harengus*), Maquereaux (*Scomber japonicus*, *Rastrelliger kanagurta*, *Scomber scombrus*, *Scomberomorus spp*), Comete (*Decapterus spp*), Merlan bleu (*Micromesistius poutassou*), Poisson sabre (*Trichiurus lepturus*), Sardine (*Sardina pilchardus*, *Sardinops melanostictus*), Sprat (*Sprattus sprattus*), Capelan (*Mallotus villosus*), Menhaden écailleux (*Brevoortia patronus*). Extrait de « *Marine capture production : major species and genera* ». Données FAOSTAT, 2015.

En 2017, 4,6 millions de tonnes de FP ont été produites. Les cinq principaux pays [1] producteurs étaient le Pérou (16%), l'Europe des 27 (11%), le Vietnam (10%), la Chine (10%) et le Chili (9%) (**Figure 6**).

Seuls certains pays comme la France, l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne, le Canada, la Namibie ou le Sénégal produisent exclusivement leur FP à partir de co-produits. Au niveau mondial, la part de la production de FP issues des co-produits augmente. Elle représentait environ 35% en 2012 [FAO, 2014] et devrait représenter 50% en 2020 [Jackson et Newton, 2016].

1. ou communauté de pays.

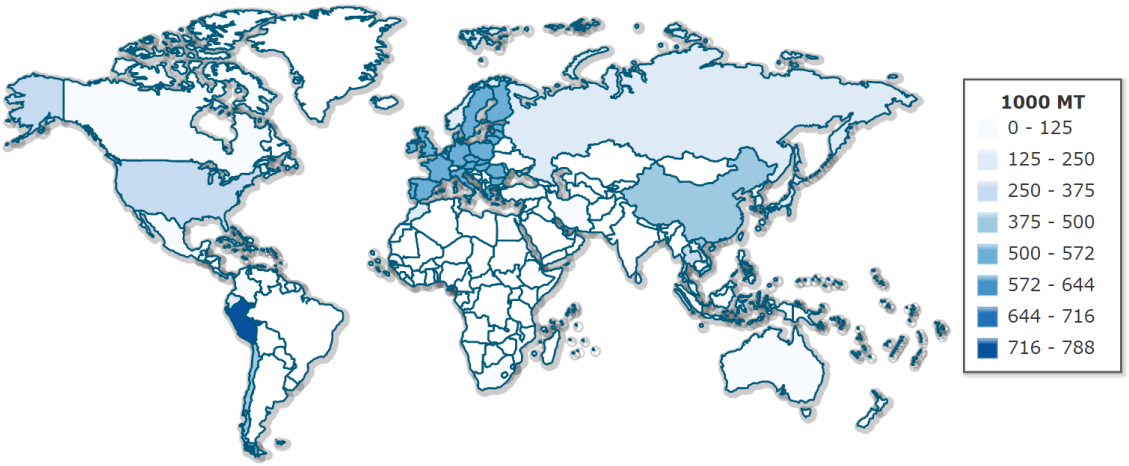


FIGURE 6 – Carte des pays producteurs de farines de poisson (Données index mundi). Estimation de la production en 2017.

La demande en FP toujours plus importante, cumulée à la raréfaction des stocks de poissons fourrages a conduit, à une très forte volatilité des prix des FP ces dernières années (**Figure 7**).

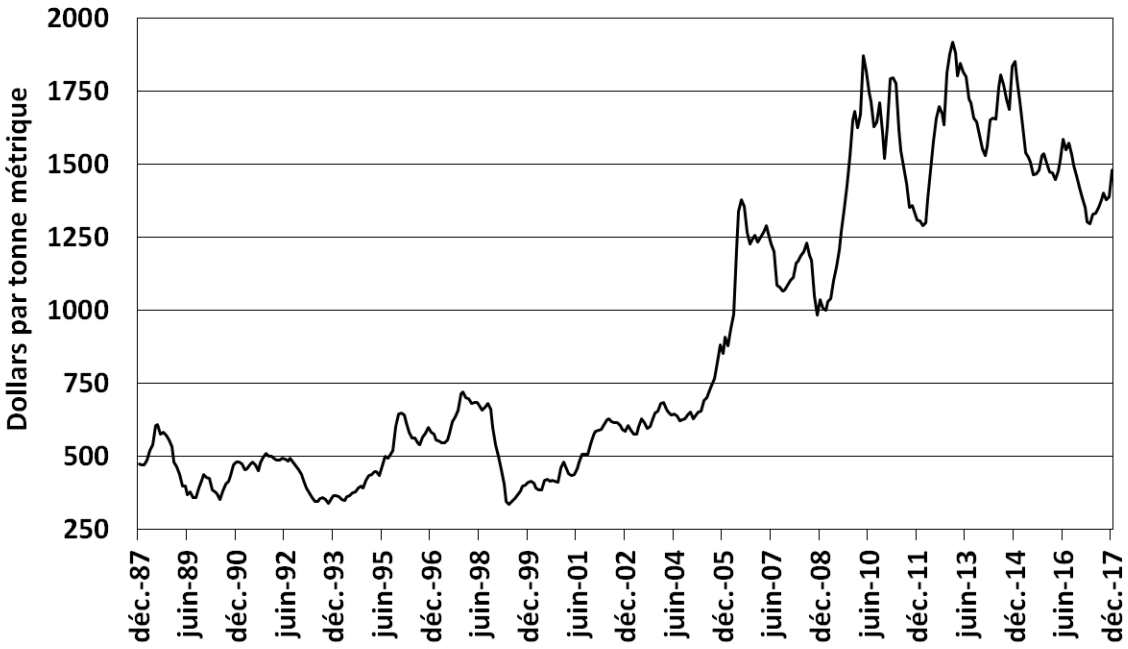


FIGURE 7 – Evolution du prix des farines de poisson. Données index mundi de 2018.

2.3.2 Les farines d'origine végétale

Le développement de l'aquaculture ainsi que l'amélioration de sa durabilité reposent en grande partie sur l'identification de sources alternatives de protéines, notamment d'origine végétale, moins coûteuses que les FP et pouvant les substituer, sans pour autant compromettre les performances de croissance des poissons d'élevage.

Il existe un grand nombre de sources de protéines d'origine végétale susceptibles d'être utilisées en aquaculture. Néanmoins, aucune d'entre elles ne réunit toutes les qualités nutritionnelles des FP. Les produits végétaux oléagineux sont commercialisés sous formes de tourteaux, c'est à dire de co-produits issus de l'extraction de l'huile. Ces produits possèdent entre 35 et 50% de protéines [Médale et Kaushik, 2009]. Il existe également des protéagineux tel que le pois ou le lupin de teneur plus faible en protéines, 26 et 39% respectivement [Médale et Kaushik, 2009].

Ainsi, pour la plupart des farines d'origine végétale (FV), le taux de protéines (30–40%) est bien plus faible que celui des FP. Pour compenser cette faiblesse, les industriels ont développé les concentrés de soja et de colza ainsi que de gluten de blé et de maïs, qui contiennent 60 à 80% de protéines [Médale et Kaushik, 2009], et qui sont de plus en plus utilisées dans les formules d'aliments. Toutefois, malgré leur teneur élevée en protéines, ces matières premières possèdent un profil en AAI moins adapté aux besoins des poissons. En effet, elles ont généralement une teneur plus faible en certains AA essentiels comme la méthionine et la lysine, voire parfois la cystéine ou la thréonine [Médale et Kaushik, 2009]. Leur carence a pour conséquence une diminution des performances zootechniques et de conversion alimentaire chez de nombreuses espèces d'élevage, en particulier lors de tentatives de remplacement total de la FP [Daniel, 2018].

Il est également bien décrit que les FV contiennent des facteurs anti-nutrititionnels (FAN) et des glucides qui affectent la digestibilité et les performances de l'aliment [Francis *et al.*, 2001, Krogdahl *et al.*, 2005, Welker *et al.*, 2016]. Le **Tableau 4** résume les principaux FAN retrouvés dans les FV ainsi que leurs effets sur les poissons.

Tableau 4 – Principaux facteurs anti-nutritionnels des farines d'origine végétale. [Médale *et al.*, 2013].

Facteurs antinutritionnels	**Tourteau de soja**	**Tourteau de colza**	**Farine de lupin**	**Pois dépelliculé**	**Effet/fonction affectée**
Acide phytique	X	X		X	Digestion du P et des protéines
Allergènes	X				Immunité, entéropathies
Alcaloïdes			X		Appétit
Antivitamines	X			X	Métabolisme
Glucosinolates		X			Appétit, hyperthyroïdie
Inhibiteurs de protéinase	X	X	X	X	Digestion
Lectines	X			X	Absorption, entéropathies
Phytoœstrogènes	X		X		Reproduction
Saponines	X		X	X	Entéropathies, digestion
Tannins		X		X	Digestion

Abréviation : P : Phosphate.

2.4 Performance des aliments à forte teneur en protéines d'origine végétale chez les poissons carnivores

Réussir à atteindre les performances d'un aliment riche en FP avec de fortes teneurs en FV reste aujourd'hui un vrai challenge. De nombreuses études ont mis en évidence que les FV impactaient à différents niveaux les performances des poissons carnivores (pour revue Daniel, 2018).

2.4.1 Effets des protéines d'origine végétale sur le comportement alimentaire et les performances de croissance du poisson carnivore

De nombreux travaux ont mis en évidence les effets négatifs des régimes appauvris en FP sur la prise alimentaire et les performances de croissance chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) [Gomes *et al.*, 1995, Adelizi *et al.*, 1998, Francesco *et al.*, 2004, Snyder *et al.*, 2012], le bar européen [Dias *et al.*, 1997], le

turbot (*Scophthalmus maximus*) [Fournier *et al.*, 2004, Bonaldo *et al.*, 2011], le saumon de l'Atlantique *(Salmo salar)* [Berge *et al.*, 1998, Sveier *et al.*, 2001, Espe *et al.*, 2007, Torstensen *et al.*, 2008], la daurade royale (*Sparus aurata*) [Gómez-Requeni *et al.*, 2004], l'anguille d'Australie (*Anguilla australis*) [Engin et Carter, 2005]. Toutefois, d'autres études ne rapportent pas d'impact de la diminution des FP sur la prise alimentaire [Carter et Hauler, 2000, Montero *et al.*, 2005] et ce, même pour une substitution presque totale [Kaushik *et al.*, 2004].

La qualité des matières premières et la stratégie de formulation sont déterminantes dans ce genre d'étude. L'utilisation de mélange de plusieurs sources protéiques d'origine végétale permet généralement d'obtenir des résultats positifs. Toutefois, aujourd'hui, il est reconnu par la profession qu'en situation de production, une réduction de la FP dans les aliments formulés pour les poissons carnivores, entraîne une modification du comportement alimentaire du poisson, notamment sur le long-terme et lors des périodes d'élevage plus stressante pour l'animal.

2.4.2 Effet des protéines d'origine végétale sur les performances alimentaires du poisson carnivore

La baisse des performances zootechniques observées chez les poissons carnivores nourris avec des FV pourrait trouver son origine dans la digestibilité apparente des protéines plus faible de ces FV [Gatlin *et al.*, 2007]. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que les FV peuvent affecter la digestibilité des nutriments [Fontaínhas-Fernandes *et al.*, 1999, Chong *et al.*, 2002, Gaylord *et al.*, 2004, Santigosa *et al.*, 2008, Richard *et al.*, 2011, Santigosa *et al.*, 2011a, Santigosa *et al.*, 2011b, Li *et al.*, 2013]. Ainsi, lors du remplacement de la FP par une ou plusieurs FV, il a été observé une modification de capacité des poissons à digérer et à assimiler les nutriments qui peut trouver son explication dans la présence de FAN, le déséquilibre en AA des protéines d'origine végétale, la dénaturation des protéines lors du traitement thermique des matières premières ... etc.

De manière intéressante, Santigosa *et al.* (2008) ont remarqué que lorsque la daurade royale était nourrie avec des sources de protéines d'origine végétale, le pic d'activité de la chymotrypsine à 6 h post-prandiale était diminué tandis que les performances de croissance restaient similaires à celles des régimes à base de FP.

En parallèle, ils ont observé une augmentation de la longueur de l'intestin ainsi que de l'activité de la trypsine, enzyme digestive intestinale. Il semble que la truite arc-en-ciel soit également capable de mettre en place des mécanismes pour limiter l'impact de l'inhibition du pic d'activité des protéases observé trois heures après la prise alimentaire avec des FV. Santigosa *et al.* (2011a et 2011b) ont ainsi observé que la diminution de l'absorption dans les *caeca* pyloriques est compensée par une augmentation de l'absorption dans les segments médiaux et distaux de l'intestin, ce qui permet de retarder l'absorption intestinale des nutriments.

Les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes ainsi que les transporteurs d'AA ou de peptides sont responsables de la phase finale de la digestion et de l'absorption des protéines [Klein *et al.*, 1998]. L'influence des FV sur l'activité de ces enzymes a été étudiée chez plusieurs espèces. Ainsi, l'utilisation de la farine de soja est connue pour diminuer l'activité des enzymes de la bordure en brosse chez les salmonidés [Olli *et al.*, 1995, Bureau *et al.*, 1998, Bakke-McKellep *et al.*, 2000] ainsi que l'activité de la γ-glutamyltranspeptidase chez le bar européen [Tibaldi *et al.*, 2006]. Des effets similaires sont observés avec de la farine de lupin et de colza. La farine de lupin provoque une diminution de l'activité de la phosphatase alkaline, de la γ-glutamyltranspeptidase et de la maltase chez la daurade royale ainsi qu'une baisse de l'activité de la maltase chez le poisson rouge (*Carassius auratus*). La farine de colza entraîne quant a elle, une diminution de l'activité de la phosphatase alkaline et de la γ-glutamyltranspeptidase chez la daurade royale mais aucune modification chez le poisson rouge [Silva *et al.*, 2010]. Une altération de l'absorption des AA par les entérocytes a été mise en évidence chez la truite arc-en-ciel et la daurade royale [Santigosa *et al.*, 2011b]. La substitution totale de la FP par des FV entraîne une diminution de l'absorption globale des nutriments chez ces deux espèces. Cependant, pour une substitution de la FP à hauteur de 75%, l'absorption globale des AA est maintenue chez la truite-arc-en-ciel contrairement à la daurade royale [Santigosa *et al.*, 2011b].

La réduction des FP au profit des FV entraîne également, une modification dans l'apport des micronutriments (notamment vitamines, minéraux et ions métaux). Ainsi, des carences en certaines vitamines telles que la riboflavine, la niacine, l'acide pantothénique et la vitamine B12 ont pu être observées notamment chez le saumon de l'Atlantique [Bell et Waagbø, 2008]. L'utilisation des protéines d'origine végétale dans les formules alimentaires diminue l'apport en certains minéraux tels que le phosphore chez la truite arc-en-ciel en raison de la très faible biodisponibilité de ce dernier dans les FV [Cheng *et al.*, 2016]. En effet, environ 75 % du phosphore contenu dans les plantes se trouve sous la forme d'acide phytique [Lall, 1991] qui est difficilement digestible par les poissons du fait d'une déficience en phytase [Kumar *et al.*, 2012]. Kaushik *et al.* (2004) ont observé une augmentation des rejets en azote et en phosphore chez le bar européen nourri avec des FV. La même tendance a été observée chez la truite arc-en-ciel par Lund *et al.* (2011). Ils ont également mis en évidence que les truites arc-en-ciel excrétaient davantage d'azote ammoniacal indiquant un déséquilibre dans la composition en AA des FV. Les poissons assimilant moins de phosphore à partir des FV génèrent des pollutions dans l'environnement contribuant à une eutrophisation du milieu [GESAMP, 1996]. Enfin, Welker *et al.* (2016) ont mis en évidence que les FAN présents dans les FV peuvent rendre les micronutriments tels que le zinc indisponibles pour les poissons pouvant conduire à des carences.

Au contraire, d'autres travaux mettent par ailleurs en évidence que l'alimentation à base de FV n'a pas d'effet négatif sur la digestibilité des nutriments chez certains poissons. Ainsi, Hansen *et al.* (2006) ont rapporté que la morue (*Gadus morhua*) peut être nourrie avec des aliments à base de plantes avec un pourcentage atteignant 44% sans aucun effet négatif sur la digestibilité des nutriments. Bonaldo *et al.* (2011) ont montré chez le turbot que l'utilisation d'un mélange de protéines d'origine végétale (tourteau de soja, farines de gluten de blé et de maïs) ne provoquait pas d'impact sur la digestibilité des ingrédients et l'histologie intestinale. Da *et al.* (2013) ont constaté, chez les alevins de poisson-chat rayés (*Pangasianodon hypophthalmus*), que le tourteau d'arachides peut être utilisé pour remplacer la FP sans aucune modification de la digestibilité de l'aliment. Santigosa *et al.* (2011a) concluent qu'il est possible de substituer 75% des protéines et 66% des lipides d'origine marine par des ingrédients d'origine végétale chez la daurade royale sans perturber les processus

de digestion.

2.4.3 Effet des protéines d'origine végétale sur le métabolisme du poisson carnivore

Le métabolisme des poissons carnivores peut être profondément modifié lorsqu'ils sont nourris avec des régimes contenant des teneurs élevées en FV. Ainsi le métabolisme des lipides est particulièrement affecté par l'utilisation de FV. L'utilisation de régimes à forte teneur en FV (>50% de remplacement de la FP) peut conduire à un dépôt plus important de lipides chez le bar européen (Kaushik *et al.*, 2004). Tocher *et al.* (2003) ont observé, chez le saumon de l'Atlantique nourri avec des ingrédients d'origine végétale, une augmentation des concentrations de triacylglycérol dans le foie. D'autres études ont par contre démontré que l'utilisation de FV dans l'alimentation entraînent un effet hypolipémiant. Cela peut être expliqué par la faible teneur en cholestérol des ingrédients d'origine végétale [Yun *et al.*, 2011]. Plus précisément, l'utilisation importante de FV dans les formules alimentaires entraine une diminution de la taille du foie, de la concentration plasmatique de triacylglycérol et de la production de lipide chez la morue [Espe *et al.*, 2010, Hansen *et al.*, 2011]. Une réduction de la teneur plasmatique en cholestérol a également été rapportée chez la daurade royale [Gómez-Requeni *et al.*, 2004] et la truite arc-en-ciel [Kaushik *et al.*, 1995].

Chez la morue, il a été démontré que l'utilisation de FV à hauteur de 75% perturbe l'anabolisme des protéines [Lie *et al.*, 2011] et réduit la rétention en protéines [Hansen *et al.*, 2007]. Chez le turbot, les régimes contenant de fortes teneurs en FV induisent une forte activité du catabolisme des protéines conduisant à la diminution des taux d'accrétion azotée [Fournier *et al.*, 2004].

Seules quelques études menées chez les poissons carnivores ont démontré l'absence d'impact des FV sur le métabolisme. Elles ont généralement été menés avec des taux d'incorporation des FV faibles à modérés (<50%). Par exemple, Rodiles *et al.* (2015) ont montré qu'il était possible de remplacer 30% des FP par des FV telles la farine de soja, le concentré de protéines de soja et la farine de gluten de blé chez la sole sénégalaise (*Solea senegalensis*) sans induire de modification dans la composition des filets, du profil des acides gras ni des métabolites plasmatiques, hépatiques ou musculaires.

2.4.4 Effet des protéines d'origine végétale sur la composition de la chair du poisson carnivore

La composition des formules alimentaires influence directement la composition biochimique des poissons [Zhou et Yue, 2010]. Les professionnels et le consommateur final portent une attention particulière à la qualité de la chair des poissons d'élevage. C'est pourquoi des travaux ont étudié la modification de la composition biochimique des poissons carnivores nourris avec des fortes teneurs en FV [Daniel, 2018]. Plusieurs études ont également abordés les aspects de qualité de la chair.

Certains auteurs ont ainsi rapporté que les protéines végétales induisent une diminution de la qualité de la chair chez la truite arc-en-ciel [De Francesco *et al.*, 2004, Alami-Durante *et al.*, 2010] et chez la sole sénégalaise [Valente *et al.*, 2016]. Des résultats contradictoires ont été obtenus chez la sole sénégalaise avec des taux d'inclusion de FV de 30% [Rodiles *et al.*, 2015] et de 75% [Cabral *et al.*, 2013, Moreira *et al.*, 2014]. Chez la truite arc-en-ciel Kaushik *et al.* (1995) n'ont pas observé de modification de la qualité de la chair. Les FV n'altèrent également pas la composition de la chair chez la daurade royale [Matos *et al.*, 2012], la brème (*Pagrus major*) [Aoki Hamashima *et al.*, 1996], le pacu (*Piaractus mesopotamicus*) [Hisano *et al.*, 2016] et le saumon de l'Atlantique [Johnsen *et al.*, 2011].

2.4.5 Effet des protéines d'origine végétale sur la santé du poisson carnivore

L'utilisation des FV dans les formules alimentaires peut également induire un stress nutritionnel affectant la santé des poissons [Vilhelmsson *et al.*, 2004, Sissener *et al.*, 2013]. C'est le cas notamment chez les salmonidés et l'utilisation de farine de soja qui peut provoquer des phénomènes d'inflammation dans la partie distale de l'intestin [van den Ingh *et al.*, 1991, Baeverfjord et Krogdahl, 1996, Krogdahl *et al.*, 2005, Urán *et al.*, 2008]. Les entérites résultantes sont caractérisées par des altérations de la muqueuse intestinale se traduisant par une diminution de la longueur des replis intestinaux, un amincissement de la *lamina propia* et de la sous-muqueuse, une diminution du nombre de vacuoles supranucléaires ainsi que par une infiltration de leucocytes dans la *lamina propia* et la sous-muqueuse [Baeverfjord et Krogdahl, 1996].

Des effets similaires ont été rapportés chez la carpe commune *Cyprinus carpio* [Urán *et al.*, 2008] et le sar à museau pointu *Diplodus puntazzo* [Ferrara *et al.*, 2015]. Chez la truite arc-en-ciel, l'utilisation de farine de soja diminue l'expression de gènes liés à la survie et au renouvellement cellulaire alors que ceux liés aux réactions immunitaires et à l'apoptose sont surexprimés [Overturf *et al.*, 2012]. Cette modification de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire avait également été observée chez le saumon de l'Atlantique par Lilleeng *et al.* (2009). Ils ont mis en évidence une diminution de l'expression de TGF-β (Transforming Growth Factor β) et de GILT (Interferon-γ inducible lysosomal thiol reductase) lors des stades précoces de l'entérite. Ces entérites diminuent les défenses immunitaires des poissons [Bakke-McKellep *et al.*, 2000, Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005] et seraient la conséquence de la présence de FAN présents dans les FV [Hardy, 2010].

D'autres études ont au contraire mis en évidence qu'il était possible de remplacer la FP par de la FV sans affecter la santé des poissons. C'est le cas notamment de la morue qui peut être nourrie avec des FV à hauteur de 44% sans perturber les fonctions de l'intestin ou du foie [Hansen *et al.*, 2006]. De la même manière, il est possible de nourrir des daurades royales avec 50% de FV sans impacter l'immunité ni déclencher de stress oxydatif [Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005].

Comme le montrent les études citées précédemment, l'impact des FV sur les performances de croissance, la digestibilité, la qualité de la chair ou la la santé est désormais bien documenté. Depuis peu de temps, le développement des analyses transcriptomiques haut débit a permis de mener des analyses approfondies sur les perturbations métaboliques liées au remplacement des FP par des FV chez le poisson [Qian *et al.*, 2014, Martin *et al.*, 2016, Sudhagar *et al.*, 2018]. Les résultats des analyses transcriptomiques obtenus chez le bar européen nourris avec un aliment riche en FV et supplémenté en hydrolysat dans le cadre de ce travail de thèse feront l'objet du chapitre « Caractérisation fonctionnelle : identification de marqueurs transcriptomiques pour la mesure de la performance des hydrolysats » page 175.

2.5 Optimisation des régimes alimentaires riches en farines d'origine végétale

La réduction des FP au profit des FV dans les aliments destinés aux poissons carnivores nécessite généralement d'adapter les formulations alimentaires, soit en modifiant les processus de fabrication des aliments soit en supplémentant les formules avec des additifs spécifiques. Ces optimisations peuvent ainsi permettre de restaurer des performances de croissance similaires à celles observées avec un régime alimentaire riche en FP.

2.5.1 Supplémentation en acides aminés essentiels des régimes alimentaires riches en farines d'origine végétale

Une méthode efficace pour l'amélioration de la formulation des régimes riches en FV consiste à les supplémenter avec les composés qui leur font défaut dans le but d'équilibrer les formules alimentaires pour répondre aux besoins nutritionnels des poissons carnivores. C'est par exemple le cas de certains AAI tels que la méthionine, l'arginine et la lysine. On observe une amélioration des performances alimentaires lorsque les FV sont supplémentées avec ces AA [Bautista-Teruel *et al.*, 2003, Espe *et al.*, 2006, Goda *et al.*, 2007, Médale et Kaushik, 2009].

La lysine et la méthionine sont deux éléments essentiels de l'alimentation car elles interviennent dans le métabolisme des protéines et des lipides chez de nombreuses espèces de poissons [Walton *et al.*, 1984a, Marcouli *et al.*, 2006, Espe *et al.*, 2008]. La supplémentation en lysine permet ainsi de moduler le métabolisme lipidique et de diminuer les dépôts lipidiques chez la morue [Hansen *et al.*, 2011] et la truite arc-en-ciel [Gibson Gaylord *et al.*, 2007]. Il est important de ne pas modifier la composition biochimique des poissons car l'excès de graisse entraîne une baisse de qualité de la chair et le rejet de la part des consommateurs. De plus, la restauration des profils alimentaires en AA permet d'augmenter l'accrétion protéique chez la truite arc-en-ciel [Rolland *et al.*, 2015] mais également de réduire l'excrétion d'azote ammoniacal et de phosphore [Cheng *et al.*, 2003]. La lysine et la méthionine sont également nécessaires à la biosynthèse de la L-carnitine et au métabolisme énergé-

tique chez les poissons [Tanphaichitr *et al.*, 1971]. La L-carnitine joue un rôle dans la croissance des animaux, réduisant simultanément l'accumulation de graisse dans les tissus des poissons et augmentant l'oxydation des lipides pour produire de l'énergie [Harpaz, 2005, Ozorio, 2009]. Il est également possible de supplémenter les régimes riches en FV directement avec de la L-carnitine pour favoriser la croissance tout en diminuant le taux de graisse intrapéritonéale et les teneurs en lipides chez la perche (*Bidyanus bidyanus*) [Yang *et al.*, 2012].

L'ajout de taurine permet d'augmenter les performances de croissance chez la truite arc-en-ciel et le charbonnier (*Anoplopoma fimbria*) [Gibson Gaylord *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2015] mais également d'améliorer l'immunité et de réduire les niveaux d'excrétion d'ammoniac chez le poisson-chat jaune (*Pelteobagrus fulvidraco*) [Li *et al.*, 2016].

De nombreux travaux montrent qu'il est possible de compenser les carences en micro-nutiments liés à l'incorporation de FV dans les aliments par l'ajout de compléments alimentaires. C'est le cas de la vitamine B peu présente dans les FV qui est essentielle pour le fonctionnement du métabolisme des animaux [Hansen *et al.*, 2015]. Lee *et al.* (2010) suggèrent d'utiliser la farine d'os de poissons comme source de calcium et de phosphore. Néanmoins, il faut être prudent avec l'ajout de calcium et de phosphore dans l'alimentation car il a été démontré qu'en excès, ils réduisent l'activité de la phytase[2] chez les poissons [Vandenberg *et al.*, 2012]. Cela pourrait être lié à la formation de complexes de calcium-acide phytique insolubles qui rendent l'acide phytique alimentaire insensible à la phytase [Qian *et al.*, 1996].

Il est également possible d'ajouter du cholestérol pour augmenter la prise alimentaire et la croissance avec des régimes riches en FV [Twibell et Wilson, 2004, Yun *et al.*, 2012].

2.5.2 Amélioration de la digestibilité des aliments à forte teneur en farines d'origine végétale

De nombreux travaux de recherche ont également été menés pour améliorer la digestion des FV chez les poissons carnivores. Ils ont montré que la supplémentation des formules alimentaires avec certains additifs zootechniques permettait d'en

2. Voir paragraphe suivant

améliorer les performances.

Des enzymes peuvent ainsi être ajoutées lors de la formulation des aliments. La xylanase permettrait d'obtenir de meilleures performances de croissance des poissons en améliorant les capacités de digestion des glucides (arabinoxylanes) par la flore intestinale [Dumitrescu *et al.*, 2011, Jiang *et al.*, 2016]. Papatryphon *et al.* (2001) ont démontré que la supplémentation en phytase dans les aliments augmente la digestibilité apparente des protéines ainsi que l'absorption de phosphore chez le bar rayé (*Morone saxatilis*).

Il est également possible de supplémenter les aliments avec des acides organiques qui induisent une augmentation de l'absorption du phosphore dans l'intestin [Ravindran et Kornegay, 1993]. Øverland *et al.* (2000) pensent que les acides organiques, en abaissant le pH dans le système digestif, augmentent la capacité du phosphore à se lier à divers cations. De plus, les oligo-éléments chélatés sont plus stables dans le tube digestif car ils sont moins susceptibles de se lier avec d'autres molécules organiques [Bharadwaj *et al.*, 2014]. L'acide citrique et l'acide formique dans les régimes alimentaires à base de protéines d'origine végétale améliorent ainsi la biodisponibilité et la rétention de certains minéraux (Ca, Mg, Na, K, Zn et Mn) chez les poissons [Sugiura *et al.*, 2000, Sarker *et al.*, 2012a, Zhang *et al.*, 2016]. Les concentrations plasmatiques post-prandiales de minéraux sont ainsi plus importantes chez la truite arc-en-ciel alimentée avec des FV supplémentées avec du phosphate de calcium [Antony Jesu Prabhu *et al.*, 2014]. Sarker *et al.* (2012b) ont observé que la supplémentation en acide citrique (et en acide gras) dans le régime alimentaire végétal augmente significativement la rétention de phosphore et d'azote chez la limande (*Limanda limanda*), diminuant ainsi leur excrétion dans l'eau.

L'acide citrique peut également être utilisé pour baisser le pH dans l'estomac permettant d'améliorer l'activité de la pepsine et la digestion des protéines chez les animaux [Mroz *et al.*, 2000].

2.5.3 Procédés industriels pour l'amélioration des farines d'origine végétale

L'application de traitements spécifiques au moment de la fabrication des FV permet de limiter leur teneur en FAN. On retrouve notamment les procédés suivants :

la concentration et l'extraction sélective des protéines à l'aide de solvants ou le traitement thermique. C'est le cas notamment pour la farine de soja qui constitue l'une des meilleures sources de protéines en remplacement des FP [Lemos *et al.*, 2000]. Toutefois, sans traitement préalable, la farine de soja ne peut être incorporée à de fortes concentrations dans les formules alimentaires en raison des FAN qu'elle contient [3] [Rumsey *et al.*, 1994, Anderson et Wolf, 1995].

Comme beaucoup d'autres FV, la farine de soja à un profil en AAI déséquilibré en comparaison aux besoins en AAI du poisson et sa digestibilité est plus faible qu'une FP [Wilson, 1989, Floreto *et al.*, 2000]. Cependant, il est possible de pallier ce problème en réalisant une fermentation à l'état solide en utilisant des micro-organismes. La farine de soja ainsi traitée voit sa digestibilité augmentée et le métabolisme des animaux amélioré [Hölker et Lenz, 2005], grâce à l'augmentation de la disponibilité des micro-nutriments (vitamine A et B) et de la teneur en AAI [Weng et Chen, 2010]. Il serait ainsi possible de diminuer l'ajout de micronutriments et d'AAI dans les aliments riches en FV.

2.5.4 Diversification alimentaire de l'apport en protéines d'origine végétale

Le mélange de différentes sources de FV dans les formules alimentaires destinées aux poissons carnivores permet également de limiter les effets négatifs observés lorsqu'une seule source de FV est utilisée [Liti *et al.*, 2006]. Une amélioration des performances de croissance a ainsi été observée chez la truite arc-en-ciel [Lund *et al.*, 2011], la sole sénégalaise [Valente *et al.*, 2016], le turbot [Bonaldo *et al.*, 2011] et la morue [Hansen *et al.*, 2011], espèce pour laquelle, le mélange des FV est à même de compenser les carences en méthionine et en lysine. Chez la daurade royale, un mélange de farines de gluten de maïs, de gluten de blé, de pois extrudés et de tourteau de colza équilibrés avec des AAI améliore l'accrétion protéique [Gómez-Requeni *et al.*, 2004].

Enfin, il est également possible d'utiliser alternativement des aliments riches en FP et des régimes riches en FV pour supprimer ou limiter les carences dues aux FV [Nandeesha *et al.*, 2002].

D'autres stratégies sont également possibles comme l'utilisation de FV génétique-

3. Cf. **Tableau 4** page 35.

ment modifiées, de probiotiques ou de nombreux additifs alimentaires, mais celles-ci seront abordées dans la partie « *Développement d'aliments fonctionnels destinés à améliorer la résistance des poissons* » page 85.

Pour résumer, quelques succès de substitutions partielles ou totales de la FP au profit des FV chez le poisson sont présentées dans le **Tableau 5**. Les taux d'inclusions des FV varient en fonction des espèces.

Tableau 5 – Exemples de quelques études sur l'inclusion des farines d'origine végétale sans altération des performances de croissance des poissons. Modifié d'après Daniel, 2018.

Espèce	**Régime**	**Inclusion**	**Référence**
Truite arc-en-ciel	Farine de soja, blé complet, farines de gluten de maïs et de blé. Supplémenté avec de la lysine	50%	Cheng *et al.*, 2003
Truite arc-en-ciel	Combinaison de pois, de haricots et de colza	44%	Lund *et al.*, 2011
Truite arc-en-ciel	Gluten de maïs, concentré de protéines de soja jaune et farine de gluten de blé. Supplémenté avec des AAI et du phosphate inorganique	100%	Lee *et al.*, 2010
Truite arc-en-ciel	Concentrés de protéines de pois, de canola, de pomme de terre et de soja. Supplémenté avec des AAI, de la farine de krill et la fraction hydrosoluble de krill comme appétant	100 %	Zhang *et al.*, 2012
Bar européen	Farines de gluten de maïs et de blé, blé extrudé, tourteaux de soja et de colza	95 %	Kaushik *et al.*, 2004
Daurade royale	Farines de glutens de maïs et de blé, pois extrudés, tourteau de colza. Supplémenté avec des AAI	100 %	Gomez-Requeni *et al.*, 2004
Daurade royale	Farines de gluten de maïs et de blé, petits pois extrudés, tourteau de colza et blé entier extrudé	75 %	de Francesco *et al.*, 2007
Morue	Mélange de farine de soja, concentrés de protéines de soja et de gluten de blé. Supplémenté avec de la lysine et de la méthionine	50 %	Hansen *et al.*, 2007
Cobia	Concentré de protéines de soja	94 %	Salze *et al.*, 2010
Turbot	Mélange de farines de soja, de gluten de blé et de gluten de maïs	52 %	Bonaldo ,extitet al., 2011
Turbot	Mélange de gluten de blé, de farine de soja et de concentré de protéines de soja	50 %	Bonaldo *et al.*, 2015
Carpe de roseau	Farines de graines de coton, de tournesol et de maïs	75 %	Köprücü et Sertel, 2012
Sole sénégalaise	Pois concentrés de protéines de soja et de pommes de terre, farines de soja, de gluten de blé et de maïs. Supplémenté avec des AAI	75 %	Cabral *et al.*, 2013
Sole sénégalaise	Farine de soja, de concentré protéique de soja et farine de gluten de blé	30 %	Rodiles *et al.*, 2015
Sole sénégalaise	Mélange de tourteaux de soja, de pois, de gluten de maïs et de blé	75 %	Valente *et al.*, 2016
Tambour rouge	Mélange de concentrés de protéines de soja et d'orge	50 %	Rossi *et al.*, 2013
Carpe commune	Graines de caoutchouc dégraissées	50 %	Suprayudi *et al.*, 2015
Corvina à nageoires courtes	Mélange de concentrés de protéines de soja et de maïs	75%	Minjarez-Osorio *et al.*, 2016
Tilapia	Tourteau de coton et son de blé	100 %	Liti *et al.*, 2006
Esturgeon sibérien	Mélange de farines de soja et de gluten de blé. Supplémenté avec AAI et du phosphate monocalcique	100 %	Yun *et al.*, 2014

Abréviations : AAI : acide aminé indispensable. FV : farine d'origine végétale.

2.5.5 Les aliments aquacoles – évolution récente

Les premiers travaux expérimentaux réalisés sur la substitution des FP par des FV avaient conduit à des baisses de performances chez le poisson carnivore. Néanmoins, depuis les années 80, des améliorations significatives ont été apportées aux matières premières d'origine végétale permettant ainsi d'augmenter la part des FV dans les aliments aquacoles sans modification des performances.

Aujourd'hui, les aliments commerciaux peuvent contenir jusqu'à 80% de protéines d'origine végétale (% de la protéine totale de l'aliment) grâce à différentes évolutions technologiques. L'amélioration des performances trouve son origine dans l'application de nouveaux procédés de fabrication des matières premières et des aliments permettant de limiter facteurs anti-nutritionnels des FV et d'augmenter la valeur énergétique des aliments (**Figure 8**).

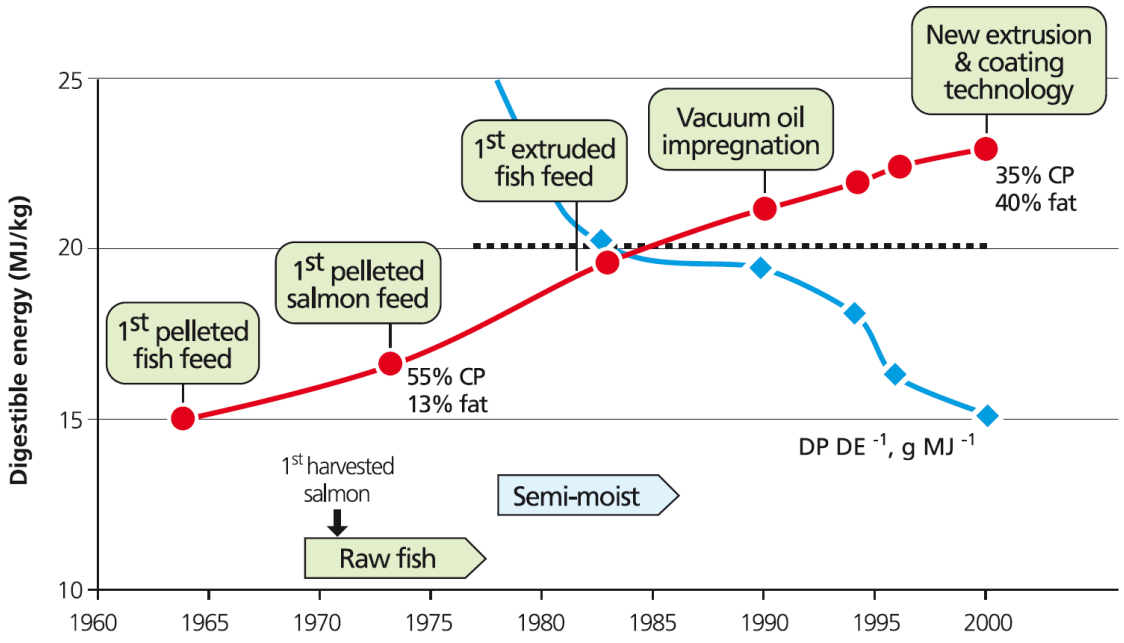


FIGURE 8 – Développement des aliments aquacoles pour la salmoniculture en Norvège [Tacon *et al.*, 2011].

Ces avancées techniques fondamentales se sont traduites par la diminution effective de la part des FP dans les aliments tout en améliorant les taux de conversion des principales espèces de poissons carnivores (**Figure 9**). A l'horizon 2020, les projections prévoient un taux d'incorporation des FP compris entre 1 et 12% [Tacon *et al.*, 2011] et leur utilisation pourrait être quasiment nulle vers 2040 [Duarte *et al.*, 2009].

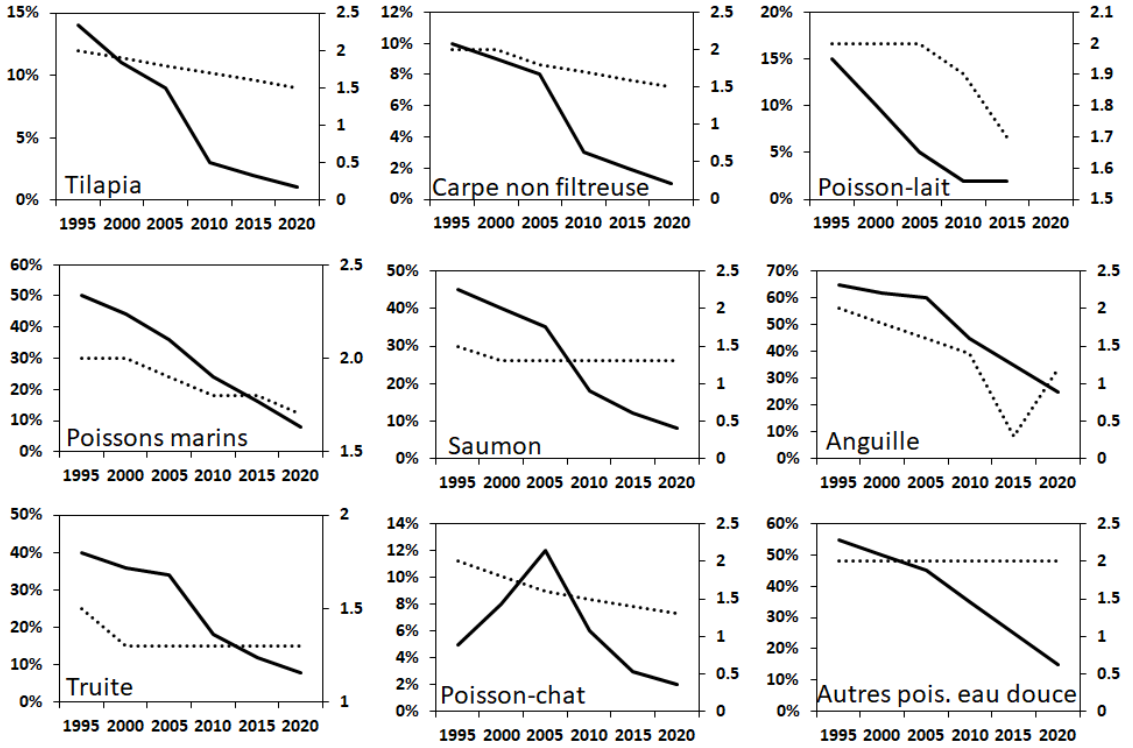


FIGURE 9 – Evolution de la part de farine de poisson (ligne pleine) dans les aliments pour poissons carnivores et taux de convertion correspondants (ligne en pointillés), d'après les données de Tacon et Métian (2008).

2.5.6 Les aliments aquacoles – le futur

Les études sur les aliments aquacoles se poursuivent et se concentrent toujours sur le remplacement des FP.

En 2000, l'utilisation de farines issues d'animaux terrestres dans les aliments déstinés aux animaux d'élevage (y compris ceux destinés à l'aquaculture) a été interdite en Europe en raison de la crise sanitaire de la vache folle (Arrêté du 14 novembre 2000). Ces sources de protéines restent cependant utilisées dans de nombreux pays d'Asie et d'Amérique. En 2013, l'utilisation de farines animales a été

de nouveau autorisée pour l'alimentation des poissons d'élevage sous la forme de Protéines Animales Transformées (PAT) par la Commission Européenne. Ces PAT sont désormais produites à partir de co-produits d'animaux destinés à l'alimentation humaine contrairement aux farines animales qui provenaient d'animaux destinés à l'incinération ou à l'utilisation comme matières fertilisantes. Néanmoins, les inquiétudes des consommateurs amènent les producteurs d'aliments à ne pas considérer ces sources de protéines dans les aliments aquacoles proposés en Europe.

En revanche, les co-produits d'origine marine (crustacés, mollusques et poissons) sont une source intéressante de protéines pour l'alimentation aquacole car elles sont mieux acceptées par les consommateurs. Outre leur transformation en farines, ils peuvent être également valorisés sous forme d'hydrolysat protéiques. Ce sujet sera abordé dans le chapitre suivant : « *Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique* » page 53.

D'autres matières premières candidates pour le remplacement des FP sont également considérées par les fabricants d'aliments aquacoles :

Le krill

Le krill est une source de protéines très intéressante. En effet, elle couple un profil en AAI proche de celui des FP (**Tableau 6**) avec de bonnes propriétés appétentes. C'est pourquoi, la farine de krill est souvent utilisée dans des aliments à base de FV [Hatlen *et al.*, 2017].

Tableau 6 – Comparaison de la composition de la farine de krill et des farines de poisson [Médale et Kaushik, 2009].

AAI	Farine de Krill	Farine de poisson
Protéines brutes	60,0	66,0–72,0
Arginine	6,0	5,8
Histidine	2,0	2,4
Isoleucine	4,9	4,3
Leucine	7,6	7,2
Lysine	8,2	7,5
Méthionine-Cystéine	4,8	3,7
Phénylalanine-Tyrosine	8,7	7,0
Thréonine	4,3	4,2
Tryptophane	1,2	1,0
Valine	5,4	5,1

Néanmoins, la farine de krill est très riche en fluor (1 000 à 6 000 mg/kg), ce qui limite son utilisation, la limite de fluor étant fixée à 150 mg/kg aliment sec par une

directive européenne de 1999. Enfin, les ressources mondiales en krill sont limitées, la biomasse est estimée à 44 millions de tonnes, et d'importants quotas de pêche sont imposés. En 2014, 316 408 tonnes de krill[4] (*Euphausia superba*) ont été péchées.

Les insectes

Depuis quelques années, les insectes font l'objet d'un fort engouement pour la production de farine. En effet, la Commission Européenne a autorisé leur utilisation dans l'alimentation aquacole depuis le 1^{er} juillet 2017. Sept espèces sont concernées : 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 (*Gryllodes sigillatus*) et le grillon des steppes (*Gryllus assimilis*). Le **tableau 7** présente les taux de protéines dans les farines d'insectes autorisées.

Tableau 7 – Quantités de protéines dans les farines d'insectes autorisées en alimentation aquacole.

Espèce	Quantité de protéines	Référence
Hermetia illucens	42,1%	Sanchez-Muros *et al.* (2014)
Musca domestica	37,5%	Sanchez-Muros*et al.* (2014)
Tenebrio molitor	47,8–67,3%	Sanchez-Muros *et al.* (2014)
Alphitobius diaperinus	60,0%	Adámková *et al.* (2016)
Acheta domesticus	66,6%	Sanchez-Muros *et al.* (2014)
Gryllodes sigillatus	56,8%	Hall *et al.* (2017)
Gryllus assimilis	56,5%	Bednářová *et al.* (2014)

Le profil en AAI, qui est dépendant de l'espèce, est proche de celui de la farine de soja [Barroso *et al.*, 2014]. Leur utilisation chez la truite arc-en-ciel [St-Hilaire *et al.*, 2007, Sealey *et al.*, 2011], le tilapia (*Oreochromis niloticus*) [Jabir *et al.*, 2012] et le turbot [Kroeckel *et al.*, 2012] à hauteur de 30% ne diminuerait pas la croissance des poissons. Cependant, l'inclusion de teneurs élevées, peut modifier la qualité de la chair et la composition en lipides [Mancini *et al.*, 2017]. Ainsi, la teneur précise en farine d'insectes qu'il est possible d'incorporer dans les formules alimentaires reste à déterminer précisément pour chaque espèce. Toutefois, aujourd'hui, la disponibilité en farines d'insectes reste très limitée et, à court-terme, ne permet pas d'envisager une incorporation à des teneurs élevées dans les aliments aquacoles.

4. Données FAOSTAT.

Les micro-algues

Les farines de micro-algues représente une source de protéines alternatives à la FP interessante car elles peuvent contenir jusqu'à 70% de protéines et leur profil en AA est adapté aux poissons d'élevage. A des taux d'inclusion relativement bas (2–10%), elles semblent présenter de nombreux effets bénéfiques sur les poissons (réduction du stress, croissance et santé des poissons) et les phénomènes d'inflammation intestinale. Elles possèdent également des propriétés appétentes et d'agent liant, cette dernière influençant la texture des aliments. Toutefois, au delà de 10% d'inclusion, les études ont montré une baisse de la croissance et de l'appétence [Sheikhzadeh *et al.*, 2012, Norambuena *et al.*, 2015]. Les micro-algues sont également très regardées pour leur teneur en acides gras oméga-3 [Sarker *et al.*, 2016] et en molécules antioxydantes tels que les caroténoïdes [Spolaore *et al.*, 2006, Gouveia *et al.*, 2008]. Tout comme les farines d'insectes, leur disponibilité reste actuellement très faible.

3 Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique

3.1 Les co-produits d'origine aquatique

Les co-produits d'origine aquatique représente une excellente source de protéines et leur disponibilité est importante. Ils proviennent des usines de transformation des poissons (tête, viscères, chute de parage, arêtes, peau, écailles et queue) et des crustacés (céphalothorax) destinés à la consommation humaine. Les co-produits représentent en moyenne entre 30% et 60% du poids des animaux et le volume annuel a été estimé à 63 millions de tonnes [Rai *et al.*, 2012].

Le volume de co-produits générés ne devrait pas diminuer dans les prochaines années car la part de produits de la mer transformés et consommés (filet de poisson, crevettes décortiquées) ne cesse de progresser par rapport aux produits de la mer entiers [FAO, 2016b].

La gestion et la valorisation des déchets restent des enjeux majeurs. Les coûts environnementaux et les pressions économiques sont au cœur des préoccupations de toutes les filières industrialisées.

La filière piscicole intègre de mieux en mieux ces questions d'impacts et de valorisation (**Figure 10**). Néanmoins il s'agit majoritairement d'un « re-traitement » des co-produits (engrais, combustibles, biocarburant) qui n'apporte que peu de valeur ajoutée au produit fini[FAO, 2012].

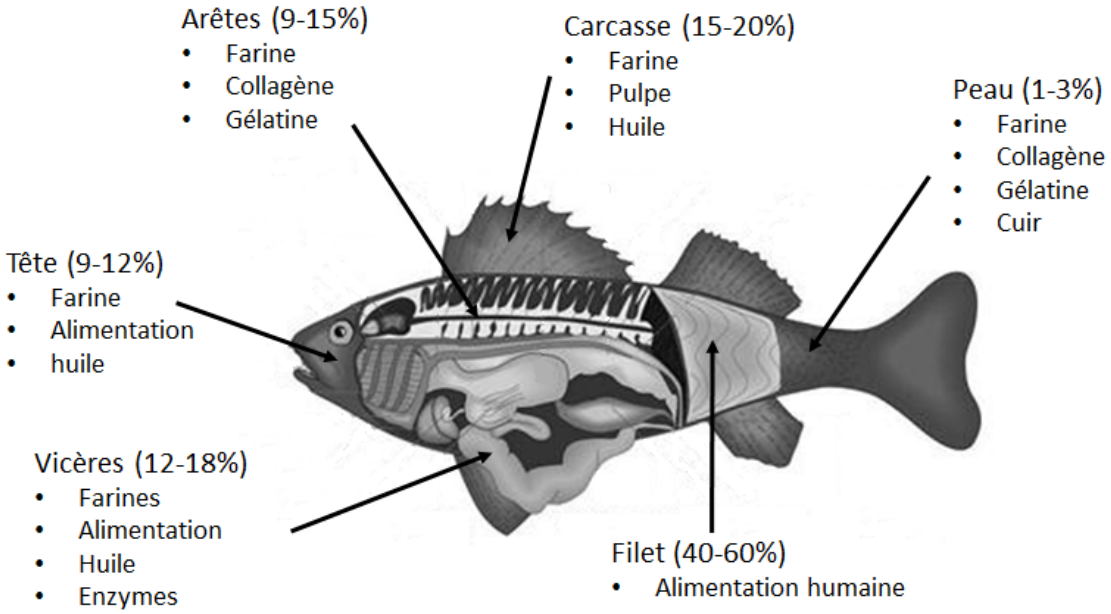


FIGURE 10 – Principales voies de valorisation des co-produits de poissons.

Seules quelques applications génèrent une meilleure valeur ajoutée, d'une part, en nutrition humaine et animale en raison de la forte teneur en protéines et en acides gras insaturés oméga-3 (EPA et DHA), et d'autre part, en santé humaine grâce à la production de composés fonctionnels [Suleria *et al.*, 2015]. Le **Tableau 8** présente succinctement les principales valorisations agroalimentaires et pharmaceutiques des co-produits d'origine aquatique.

Tableau 8 – Principales applications alimentaires et pharmaceutiques des co-produits d'origine marine [Suleria *et al.*, 2015].

Catégorie	Molécules bioactives	Applications	Source majeure	Application en santé
Peptides et protéines	Collagène	Enduit comestible dans l'industrie de la viande (ex : saucisses)	Poissons	Anti-oxidant, anti-hypertensif et anti-âge
	Gélatine	Stabilisant, texturant ou épaississant dans les aliments allégés	Poissons, en particulier d'eau froide	Prévention et traitement de la gastrite atrophique chronique
	Albumine	Fouetter, suspendre ou stabiliser	Mollusques, crustacés, poissons à faible teneur en matière grasse	Anticoagulant et antioxidant
Polysaccharides	Chitine, chitosan, et dérivés	Gélifiants, films protecteurs comestibles, clarification et désacidification des fruits	Crevettes, crabe, homard et krill	Amélioration du transit, réduction de l'absorption des lipides, antitumoral, bactéricide et fongicide

Tableau 8 – Principales applications alimentaires et pharmaceutiques des co-produits d'origine marine [Suleria *et al.*, 2015] (Suite).

Catégorie	Molécules bioactives	Applications	Source majeure	Application en santé
Acides gras	Acides gras Oméga-3	Nutraceutiques (huile et capsules de poisson), enrichissement du bétail, aliments pour animaux et préparations pour nourrissons	Presque toutes les sources marines.	Développement visuel et neuronal, diminution du risque de problèmes cardiovasculaires, amélioration de l'arthrite et de l'hypertension
Enzymes marines	Pepsines, gastricines et chymosines	Digestibilité du lait et des aliments pour poissons à présure froide	Divers viscères de corps de poissons	
	Protéases à sérine et cystéine	Stabilisation de la couleur dans les produits alimentaires, attendrissage de la viande, durcissement du hareng, fermentation du calmar	Crustacés, mollusques et calmar à nageoires courtes.	
	Lipases	Nombreuses utilisations dans l'industrie des graisses et des huiles	Morue franche, phoque, saumon, sardine, maquereau indien et daurade	
	Transglutaminases	Amélioration des gels	Daurade rouge, truite arc-en-ciel, maquereau, doré jaune, foie de goberge et pétoncle	
Vitamines et sels minéraux	Vitamines (lipo- et hydrosolubles), Fe, I, Mn et Zn	Industrie alimentaire, pharmaceutique et nutraceutique	Presque toutes les sources marines.	Complément alimentaire

3.2 L'hydrolyse de protéines

Deux types d'hydrolyse protéique sont couramment utilisées par les industries agroalimentaires.

L'hydrolyse **chimique**, qui conduit au clivage d'une molécule mère en deux molécules filles par une molécule d'eau. Elle se produit généralement en milieu fortement acide ou basique et à haute température.

L'hydrolyse **enzymatique**, qui est quant à elle catalysée par une enzyme. Le site d'hydrolyse d'une protéine se situe au niveau de la liaison peptidique libérant 2 peptides (**Figure 11 A**). L'hydrolyse d'une protéine va conduire à la production de peptides hydrolytiques sous l'action des endoprotéases et à la libération d'acides aminés libres sous l'action des exoprotéases. Un hydrolysat protéique est donc un mélange de peptides hydrolytiques et d'acides aminés libres (**Figure 11 B**). Leur proportion relative variera en fonction des paramètres de process et des spécifications de(s) enzyme(s) utilisée(s). A l'échelle industrielle, l'hydrolyse enzymatique se déroule en différentes étapes qui sont présentées en **Figure 11 C**.

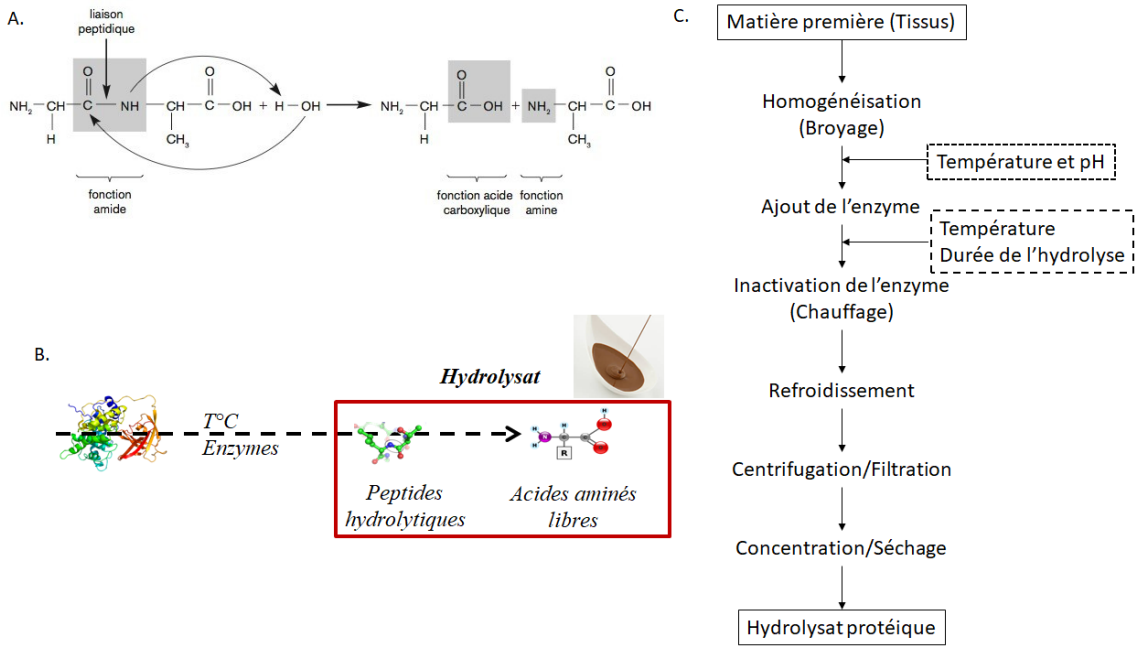


FIGURE 11 – Principes généraux de la réaction d'hydrolyse enzymatique. **A.** Principe de la réaction d'hydrolyse intervenant au niveau de la liaison peptidique d'une protéine. **B.** Cinétique de dégradation aboutissant à la production d'un hydrolysat. **C.** Différentes étapes d'une hydrolyse enzymatique industrielle. Les paramètres à maîtriser sont encadrés.

Il est possible de classer les hydrolyses enzymatiques en 2 grandes catégories : l'**autolyse** et l'**hétérolyse**. Dans le cas de l'autolyse, ce sont les enzymes endogènes des matières premières (viscères de poissons, têtes de crevettes, ...), gastriques, pancréatiques (pepsine, trypsine, chymotrypsine) et lysosomales (cathépsines), qui catalysent l'hydrolyse [Raa et Gildberg, 1982]. L'autolyse a l'avantage d'être relativement facile à mettre en œuvre car elle ne nécessite pas l'ajout d'enzymes. En revanche, l'autolyse est difficile à contrôler et donc difficillement reproductible car

dépendante de nombreux facteurs : espèce d'origine des co-produits, saison de pêche ou d'élevage, température de stockage, et fraîcheur de la matière première, ... etc [Benjakul et Morrissey, 1997].

L'hétérolyse, quant à elle, définit les réactions d'hydrolyse mettant en œuvre des enzymes exogènes ajoutées à la matière première dans des conditions contrôlées. De nombreuses protéases sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, elles sont d'origine végétale (papaïne, bromolaïne), animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine), ou microbiennes (issus de bactéries ou de levures). L'hétérolyse en système batch (en opposition à l'hydrolyse continue) assure une meilleure reproductibilité process après process et génère aussi des hydrolysats plus standardisés [Liaset *et al.*, 2000]. Dans l'industrie, des mélanges d'enzymes peuvent être utilisés. Le choix des enzymes dépend de leurs propriétés (pH, température), de leur site de clivage (endoprotéases, exoprotéases) de la matière première ciblée (carnée, marine, végétale, unicellulaire) et de leur coût. Il est donc indispensable de prendre en compte le type d'enzyme et les conditions d'hydrolyse (température, durée) afin de produire un cocktail d'enzymes correspondant aux objectifs industriels. Ainsi, à partir d'une même matière première, il sera possible de produire plusieurs types d'hydrolysats protéiques, ayant des propriétés structurales et fonctionnelles différentes, en modulant et en maitrisant les conditions d'hydrolyse.

3.3 Caractérisation analytique des hydrolysats de protéines

Les hydrolysats de protéines sont généralement caractérisés par leur degré d'hydrolyse (DH), paramètre représentant le nombre de liaisons peptidiques clivées par rapport au nombre de liaisons peptidiques initiales. Le degré d'hydrolyse définit les propriétés physico-chimiques de l'hydrolysat [Mullally *et al.*, 1995].

Différentes méthodes sont disponibles pour déterminer le DH d'un hydrolysat de protéines : le dosage de la quantité d'azote libéré au cours de la protéolyse, la mesure de la libération des groupements α-aminés par dosage spectrophotométrique et le suivi des protons libérés (technique du pH-stat). Cette méthode est rapide à mettre

en place et repose sur la mesure de la baisse du pH due à la libération des protons lors de la rupture des liaisons peptidiques. La baisse de pH n'est pas directement mesurée mais l'on dose en continu le volume de solution alcaline nécessaire au maintien du pH constant (**Équation 3.1**).

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} = \frac{B \times N_b}{\alpha \times MP \times h_{tot}} \times 100 \tag{3.1}$$

3.1 – Calcul du degré d'hydrolyse. B = consommation de solution alcaline en ml. N_b = normalité de la solution alcaline. MP = Masse de protéine (NT x 6,25) en g. α = degré moyen de dissociation du groupement α-aminés. h_{tot} = nombre de liaisons peptidiques dans la matière protéique (7,501 méq/g).

Toutefois, la détermination du DH n'est pas suffisante pour caractériser un hydrolysat car pour un même DH, plusieurs profils de masses moléculaires peuvent être obtenus. La détermination des profils peptidiques apportera des informations plus précises sur les caractéristiques des hydrolysats.

Pour analyser les profils peptidiques des hydrolysats à l'issue du processus d'hydrolyse, plusieurs méthodes peuvent être appliquées : l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium [Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999], la chromatographie d'exclusion stérique de haute performance [Guérard et al., 2001] ou la spectrométrie de masse [Robert *et al.*, 2015]. Toutefois, chaque méthode utilisée indépendamment des autres ne sera pas suffisante pour caractériser complètement les hydrolysats de protéines et plusieurs méthodes devront être couplées pour obtenir une meilleure caractérisation de leur structure. Les hydrolysats de protéines complexes peuvent contenir plus de 1000 peptides de différentes tailles [Robert *et al.*, 2014, Robert *et al.*, 2015].

Le développement d'une méthodologie performante pour la caractérisation structurale des hydrolysats a fait l'objet d'une étude dans le cadre de ce travail de thèse. Ce sujet sera abordé dans le chapitre « *Caractérisation structurale des hydrolysats de protéines : développement d'un outil d'analyse de la diversité et de l'abondance en peptides de faible masse moléculaire* » page 125.

3.4 Valeurs ajoutées des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique

Si certains co-produits d'origine aquatique sont actuellement valorisés en farines (procédés de cuisson suivi d'un séchage), le procédé d'hydrolyse permet d'apporter de nouveaux bénéfices fonctionnels au produit fini. En effet, la production et la concentration en peptides de faible masse moléculaire lors du procédé d'hydrolyse permet à la fois d'améliorer les performances nutritionnelles du produit fini mais d'apporter au produit fini de nouvelles propriétés fonctionnelles.

3.4.1 Bénéfices nutritionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique

L'ajout d'hydrolysat de protéines dans l'alimentation des poissons est connue pour améliorer les performances zootechniques chez plusieurs espèces de poissons : la truite arc-en-ciel [Aksnes *et al.*, 2006], *Lates calcarifer* [Srichanun *et al.*, 2014], le saumon de l'Atlantique [Refstie *et al.*, 2004], le bar européen [Cahu *et al.*, 1999], *Paralichthys olivaceus* [Khosravi *et al.*, 2015a], la brème [Khosravi *et al.*, 2015b].

Les gains de croissance observés chez les poissons nourris avec des hydrolysats de protéines sont liés aux caractéristiques des hydrolysats et notamment à leurs performances nutritionnelles. Ces dernières s'expliquent par différentes propriétés. En premier lieu, les hydrolysats de co-produits d'origine marine contiennent des taux très importants de protéines variant de 60 à 90%. Ces taux de protéines sont supérieurs à ceux de la plupart des FP [1] [Choi *et al.*, 2009]. Par ailleurs, les hydrolysats sont constitués de peptides de faible masse moléculaire [Espe *et al.*, 1999, Cahu *et al.*, 1999, Liaset *et al.*, 2000], qui permettent d'améliorer la digestibilité des aliments [Bui *et al.*, 2014], et par conséquent l'efficacité alimentaire [Aksnes *et al.*, 2006]. Zheng et al. (2014) ont démontré que les peptides de faible masse moléculaire présents dans les hydrolysats de protéines de poisson augmentent l'accrétion protéique chez la plie japonaise.

À ces propriétés nutritionnelles s'ajoute également un bénéfice appétent des hy-

1. Cf. **Tableau 3** page 31.

drolysats, lié à la présence d'acides aminés libres, qui permet d'augmenter la prise alimentaire [Refstie *et al.*, 2004].

Enfin, l'utilisation des hydrolysats de protéines lors du développement larvaire des poissons présente des bénéfices fonctionnels. En effet, l'utilisation ou l'ajout d'hydrolysats permet une meilleure maturation du système digestif chez le bar européen [Zambonino Infante *et al.*, 1997]. Ils peuvent également améliorer la digestion et l'assimilation des nutriments chez le flétan *H.hippoglossus* [Tonheim *et al.*, 2005].

3.4.2 Bénéfices fonctionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique

Les hydrolysats de protéines présentent également des propriétés fonctionnelles de par leur teneur en peptides bioactifs, lesquels ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche.

Plusieurs études montrent que les hydrolysats de protéines permettent d'améliorer la survie lors de challenges bactériens chez le bar européen [Kotzamanis *et al.*, 2007], *P. olivaceus* [Khosravi *et al.*, 2017] et la brème [Bui *et al.*, 2014]. Il a également été démontré chez le poisson que les hydrolysats de protéines étaient à même d'augmenter les taux d'immunoglobulines, du complément C3 ou du lysozyme impliqués dans l'immunité [Khosravi *et al.*, 2017, Bui *et al.*, 2014, Tang *et al.*, 2008].

Des activités antioxydantes ont également été mesurées dans les hydrolysats de co-produits de poissons, notamment au niveau de la peau [Zamora-Sillero *et al.*, 2018].

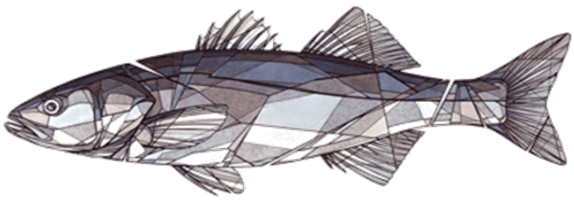
Enfin, des propriétés antibactériennes sur des pathogènes retrouvés en aquaculture ont été démontrées en particulier avec les hydrolysats de crevette [Robert *et al.*, 2014] et de tilapia [Robert *et al.*, 2015].

3.4.3 Autres domaines d'application des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique

De nombreux hydrolysats de poissons entrent dans la composition de produits nutraceutiques destinés à l'homme. Ces produits répondent à des besoins différents (digestion, nutrition sportive, diminution du stress, performances cognitives, protection cardio-vasculaire, diabète, cholestérol, santé intestinale) [Chalamaiah *et al.*, 2012].

En effet, l'identification de peptides fonctionnels d'origine marine fait l'objet de nombreux travaux ces dernière années notamment dans le domaine de la médecine [Cheung *et al.*, 2015]. L'hydrolyse enzymatique des co-produits de poisson est un moyen efficace de produire ces peptides d'intérêt et de plus en plus d'études portent sur la production de peptides hydrolytiques présentant des propriétés hypertensives, anti-prolifératives, anti-diabétiques ou encore anti-inflammatoires [Zamora-Sillero *et al.*, 2018].

4 Modèle d'étude : Le bar européen *Dicentrarchus labrax*



Le bar européen est un poisson apprécié des consommateurs pour la qualité de sa chair. Au cours de ce chapitre, dans un premier temps, nous décrirons cette espèce de poisson puis nous nous attarderons sur ses besoins nutritionnels et ses spécificités d'élevage en ferme aquacole. Enfin, nous terminerons en abordant les aspects relatifs à la santé de cette espèce.

4.1 Présentation générale

4.1.1 Taxonomie (ID : 13489)

Super-classe : Poissons
Classe : Ostéichthyens
Sous-classe : Actinoptérygiens
Super-ordre : Téléostéens
Ordre : Perciformes
Sous-ordre : Percoidei
Famille : Mornidae
Genre : *Dicentrarchus*
Espèce : *Dicentrarchus labrax*

Le bar européen ou loup de mer, « European seabass » en anglais et « lubina » en espagnol a pour nom scientifique *Dicentrarchus labrax* (Linné, 1758).

La position systématique du bar européen est ambigüe. En effet, certains auteurs le place dans la famille des *Moronidae* et d'autres dans la famille des *Serranidae* avec les *Morone* et les *Roccus*.

4.1.2 Aire de répartition

Le bar européen est présent de la Norvège au Sénégal ainsi qu'en Méditerranée et dans la mer Noire (**Figure 12**).

C'est une espèce côtière appréciant les côtes rocheuses ou sableuses battues par une mer bien oxygénée [FAO, 2006]. Grégaire, le bar vit en banc dès la fin de la vie larvaire. Il s'agit d'une espèce eurytherme (5–28°C) et euryhaline (de 3–38‰).

Le bar européen fraie dans les eaux dont la salinité est inférieure à 35‰, près des embouchures des rivières et des estuaires ou dans les zones littorales où la salinité est supérieure à 30‰.

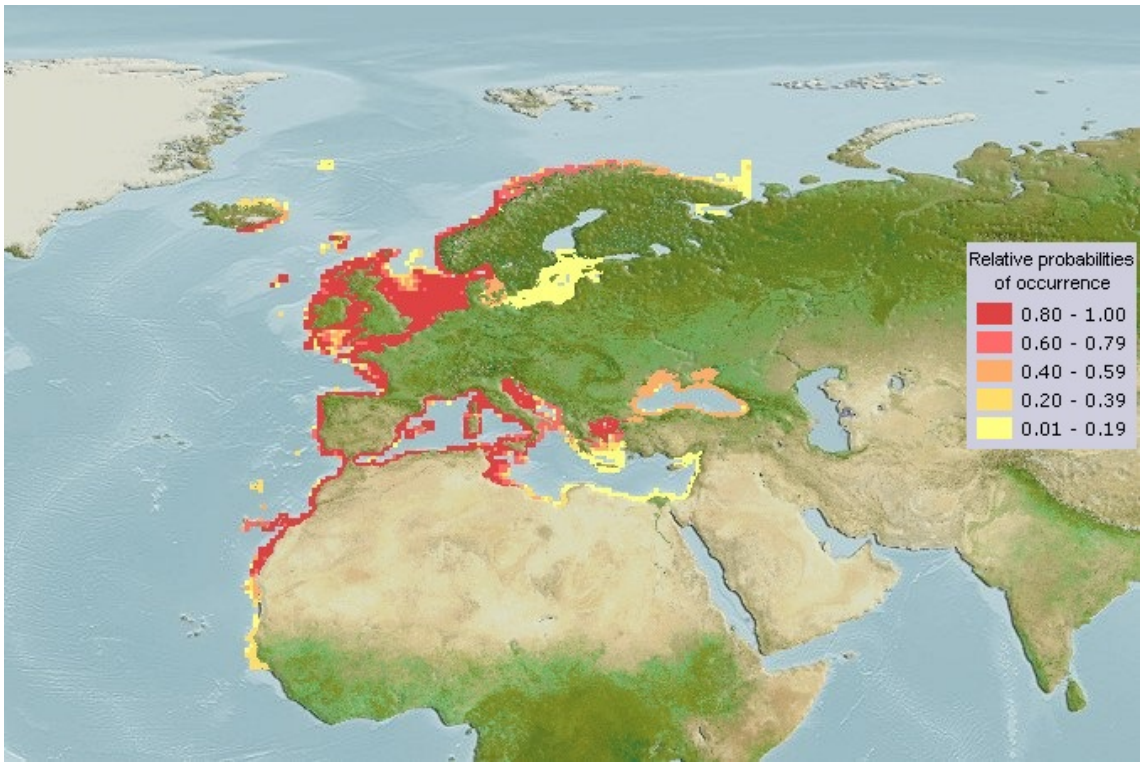


FIGURE 12 – Aire de répartition du bar européen sauvage (www.aquamaps.org).

4.1.3 Éléments d'anatomie générale

Le bar européen atteint sa maturité sexuelle à la taille d'environ cinquante cm et un poids d'un kg [FAO, 2006]. Il possède un corps symétrique, des nageoires pectorales élevées sur les flancs, des nageoires pelviennes en position thoracique ainsi qu'une nageoire dorsale épineuse. Les particularités du genre *Dicentrarchus* sont une bouche protractile et des opercules épineux. Le bar européen possède une nageoire dorsale double : la première compte entre huit et neuf épines et la deuxième compte une épine suivie de dix à quatorze rayons mous (**Figure 13**). Chez les femelles, la tête est plus allongée [Barnabe, 1976].

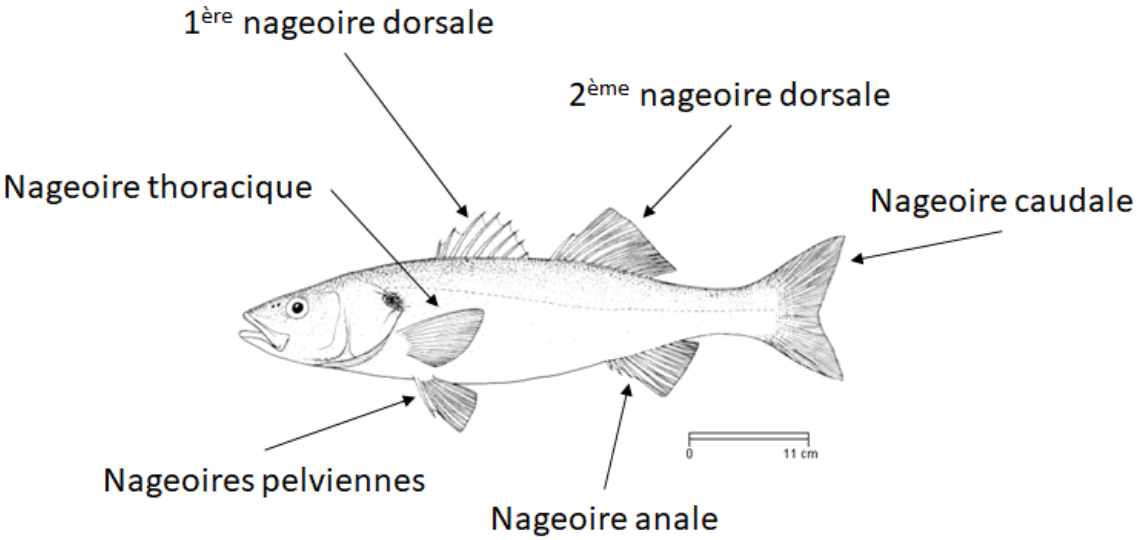


FIGURE 13 – Morphologie générale du bar européen. Modifié d'après [Bauchot, 1987].

4.1.4 Développement et croissance

A l'état sauvage, les femelles pondent des œufs pélagiques de petite taille, environ 1,3 mm de diamètre en Manche [Kennedy et Fitzmaurice, 1972]. Les larves de 4 mm sont libérées entre 2 et 5 jours plus tard [Barnabe, 1976]. Le développement se déroule en zone côtière jusqu'à ce que les larves aient atteint une taille d'environ 10 mm [Jennings *et al.*, 1992]. Elles migrent alors dans les zones estuariennes où elles resteront pendant les 3 premières années de leur vie. Le bar européen adulte a une croissance lente et un âge de maturité sexuel tardif. Les femelles ont une croissance plus importante que les mâles.

La croissance du bar européen dépend principalement de la température. C'est pourquoi il existe des différences de développement le long de l'aire de répartition entre le nord et le sud de l'Europe. D'autres facteurs influencent également la vitesse de croissance, comme la disponibilité en nourriture et la physiologie des individus.

4.2 Pisciculture du bar européen

4.2.1 Production aquacole

Le bar européen a été le premier poisson marin n'appartenant pas aux salmonidés à être commercialement cultivé en Europe. De nos jours, il s'agit du poisson le plus cultivé dans la région de la Méditerranée, avec la daurade royale. La Grèce, la Turquie, l'Italie, l'Espagne, la Croatie et l'Egypte sont les plus grands producteurs de bar d'élevage [FEAP, 2016]. Les tonnages produits sont en constante augmentation depuis les années 2000 (**Figure 14**). La production mondiale était de 162 399 tonnes en 2015. Les principaux pays producteurs en 2015 étaient la Turquie (46,28%), la Grèce (21,79%), l'Espagne (11,45%), l'Egypte (8,83%) et l'Italie (3,57%). L'élevage du bar européen est à présent bien documenté et les professionnels ont des aliments adaptés et performants (pour revue : Kousoulaki et al. (2015) et Oliva-Teles et al. (2000)).

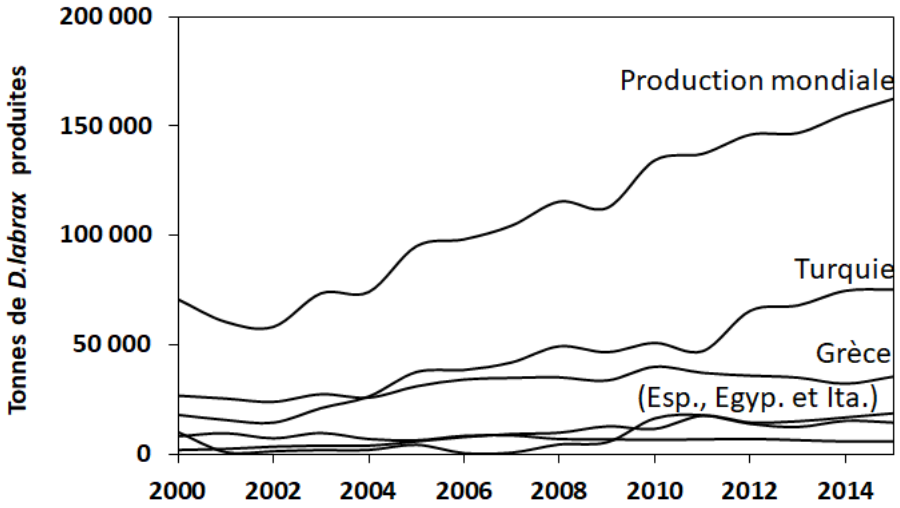


FIGURE 14 – Production mondiale de bar européen d'élevage. Données FAOSTAT.

4.2.2 Élevage en ferme aquacole

Plusieurs systèmes de culture sont aujourd'hui appliqués à l'élevage du bar européen.

Systèmes lagunaires extensifs

Les systèmes extensifs (**Figure 15**) constituent la méthode de production traditionnelle du bar d'élevage. Le principe est simple. Il s'agit de capturer dans les lagunes les juvéniles arrivant de la pleine mer de février à mai, puis à les empêcher d'y retourner en automne. Les poissons se nourrissent des proies naturelles de la lagune. Dans ce système le bar européen est toujours cultivé en polyculture avec des espèces comme le mulet et l'anguille. Il faut 37 mois au bar européen pour atteindre une taille commerciale de 400 g. Le rendement annuel d'une lagune est de 50-100 kg/ha.

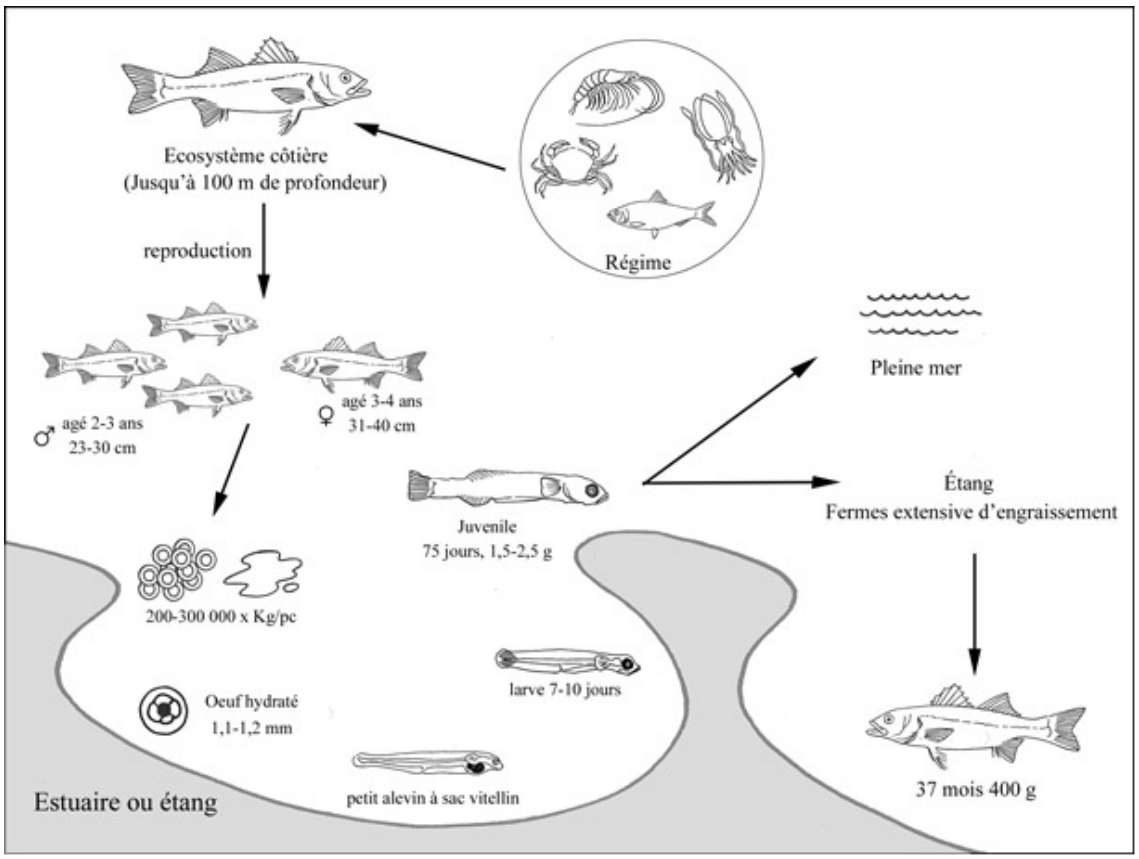


FIGURE 15 – Élevage extensif du bar [FAO, 2006].

Le système extensif peut être optimisé avec le système semi-extensif. Il s'agit d'enrichir le milieu en juvéniles et d'apporter une source alimentaire extérieure. Il est

également possible de faire des aménagements de la lagune afin d'améliorer l'apport d'aliments naturels (plancton et alevins) et les échanges d'eau pour en stabiliser les paramètres (oxygène, salinité). Enfin, il est possible de limiter la prolifération de la végétation, consommatrice d'oxygène, afin d'éviter la suffocation des poissons qui entraîne des pertes de production.

Systèmes intensifs

C'est avec le développement de technique de production de masse des alevins qu'ont débuté les systèmes intensifs d'élevage [FAO, 2006]. Ce système est plus complexe que le système extensif et fait intervenir différents acteurs au cours du cycle de production du bar européen. Ce dernier est aujourd'hui principalement élevé en système extensif (**Figure 16**).

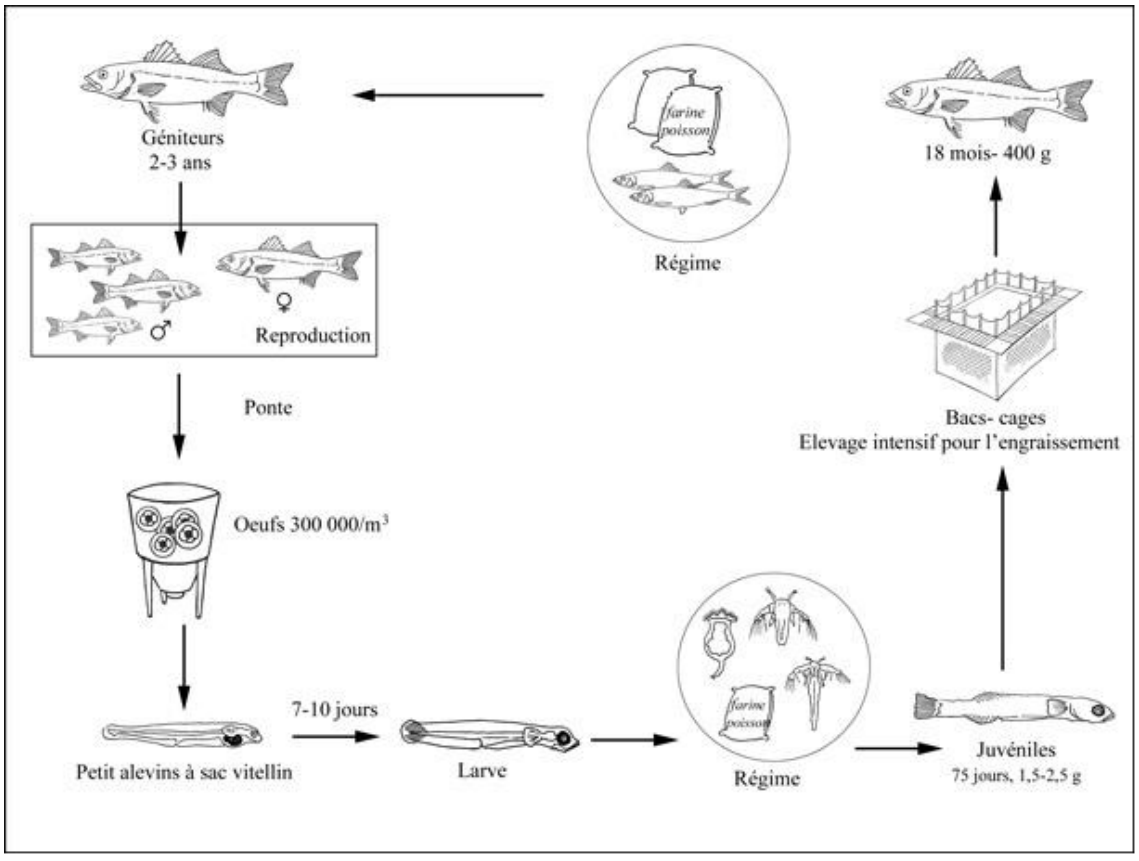


FIGURE 16 – Élevage intensif du bar [FAO, 2006].

Les systèmes intensifs reposent sur la production, contrôlée en bassin, d'oeufs par des géniteurs sélectionnés au sein d'écloseries. L'âge optimal des géniteurs pour la production d'oeufs est compris entre cinq et huit ans pour la femelle, et entre

deux et quatre ans pour le mâle. Il est possible de moduler l'ovulation des femelles en modifiant la photopériode artificiellement, la température de l'eau ou grâce à des injections de gonadotrophine humaine. Après éclosion, les larves sont conservées et nourries jusqu'au stade d'alevins. Ces derniers seront élevés du stade de pré-grossissement, où ils seront nourris avec un régime alimentaire contrôlé, jusqu'au stade de juvéniles (1,5–2,5 g). Enfin, les juvéniles sont livrés aux pisciculteurs pour une étape de grossissement dans des cages en pleine mer ou dans des structures d'élevage fermées et contrôlées. Les bars atteignent alors 400–450 g en 18–24 mois selon la température de l'eau. Il est possible d'augmenter encore la croissance du bar en contrôlant parfaitement les paramètres d'élevage (**Figure 17**).

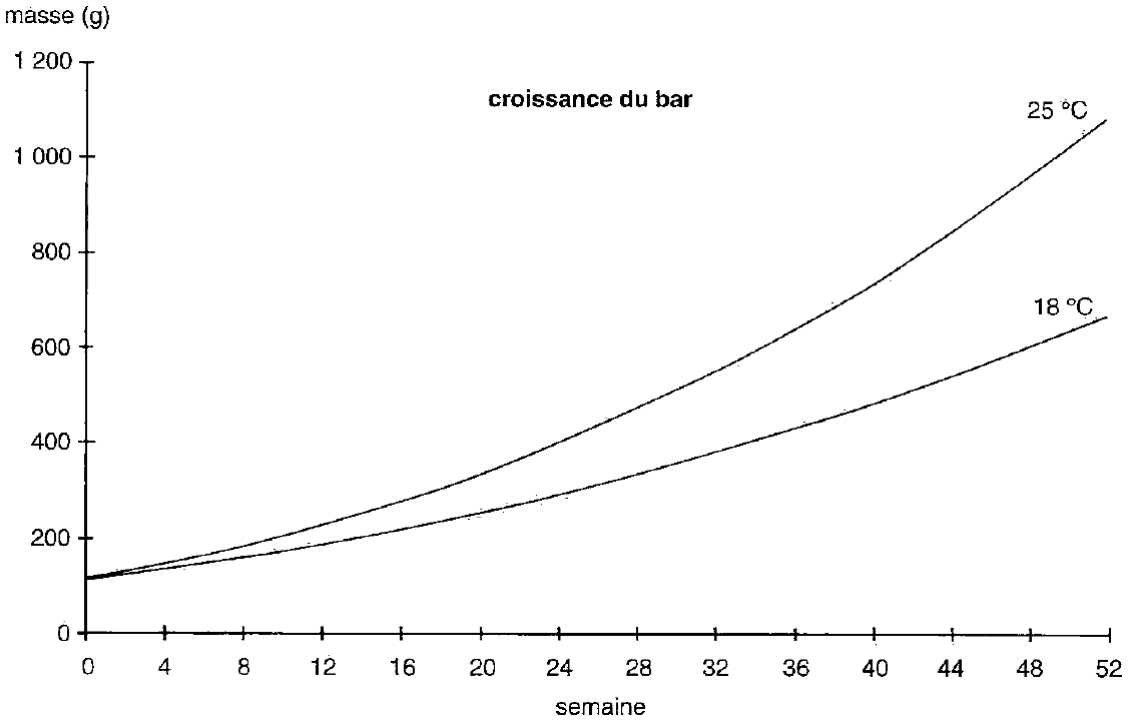


FIGURE 17 – Performance de croissance du bar européen en conditions optimales d'élevage [Guillaume *et al.*, 1999].

Les systèmes intensifs permettent de produire de 500 à 700 kg/ha/an. Les coûts de productions en Italie ont été estimés à 0,30 € par juvénile et à 4,00 €/kg de poisson sur l'ensemble du cycle d'élevage. Ces coûts sont répartis entre l'écloserie (30%), les unités de pré-grossissement (15–20%) et les fermes de grossissement (50–55%). Il est à noter que le coût de l'aliment représente 40–60 % du coût de production d'un bar en fonction des pays.

4.3 Nutrition du bar européen

4.3.1 Régime alimentaire

Le bar européen est un prédateur. C'est un carnivore strict qui a besoin d'un régime alimentaire contenant des taux élevés (43–50%) de protéines animales [Kaushik, 2002]. Au stade de post-larve et juvénile, il se nourrit de petits crustacés (Mysidacés, Amphipodes, Corophium ou Cirripèdes) et de larves de crustacés décapodes [Léauté, 1984]. A l'âge adulte, le bar devient un excellent prédateur. Il est capable d'ingérer des proies de grande taille telles que des poissons (anchois, sardine, sprat, hareng, merlan, tacaud, lançon, gobie), des crustacés (crabes et crevettes) ou des mollusques céphalopodes (seiches et calmars).

4.3.2 Besoins nutritionnels

La nutrition chez les poissons carnivores, se caractérise par leur besoin élevé en acides aminés qu'ils utilisent préférentiellement comme source d'énergie, à la différence des mammifères qui tirent principalement leur énergie de la digestion des sucres [Guillaume *et al.*, 1999]. C'est la raison pour laquelle ce chapitre est focalisé sur le métabolisme protéique.

De nombreuses études ont été réalisées depuis les années 80 dans le but de déterminer les besoins nutritionnels des poissons (protéines, lipides, acides aminés, vitamines..etc). Selon le type de régime alimentaire (herbivore, détritivore, omnivore, ou carnivore) de l'espèce de poisson ciblée, ainsi que le stade d'élevage (larve juvéniles, prégrossissement, géniteurs), les besoins nutritionnels seront différents. Les poissons carnivores ont des besoins nutritionnels importants en protéines et spécifiques en acides gras oméga-3 (**Tableau 9**), en raison de capacités limitées d'élongation et de désaturation des acides gras.

Chez les poissons carnivores, il n'y a pas de réel besoin en glucides identifiés. Les poissons utilisent peu ou pas cette source énergétique car ils ne possèdent pas toutes les enzymes nécessaires à leur digestion, notamment les β-glucanases et les β-xylanases [Kuz'mina, 1996].

Certains poissons carnivores comme les salmonidés ont la capacité d'utiliser les

Tableau 9 – Besoins nutritionnels de différents poissons. Modifié d'après [Cahu, 2004].

Espèce	Protéines (%)	Acides gras essentiels	Lipides (%)
Carpe commune	31–38	18 : 2n-6, 18 : 3n-3 1	1, 1
Tilapia	35	18 : 2n-6	1
Truite	40	18 : 3n-3	0,8–1,7
Saumon	45	18 : 2n-6, 18 : 3n-3	1,0–2,5
Bar	**45–50**	**20 : 5n-3, +22 :6n-3**	**1,7**
Turbot	55	20 : 5n-3, +22 :6n-3	0,8

lipides comme source d'énergie. Les fabricants d'aliments utilisent cette spécificité en incorporant des quantités importantes de lipides dans les aliments pour bénéficier de l'effet d'épargne protéique de ces derniers [Guillaume *et al.*, 1999].

Besoins protéiques

Les apports alimentaires en protéines doivent donc couvrir une partie des besoins énergétiques et également fournir les acides aminés essentiels et non-essentiels en quantité suffisante pour satisfaire les besoins d'accrétion protéique.

Chez les poissons carnivores, les AAI sont au nombre de 10 (**Tableau 10**). La cystéine et la tyrosine ne sont pas considérées comme indispensables car ces AA sont synthétisées respectivement à partir de la méthionine et de la phénylalanine.

Tableau 10 – Besoins en acides aminés indispensables [Guillaume *et al.*, 1999].

Acide aminés	Besoins (g/16g d'azote)	Rôle
Arginine (R)	2,0–6,0	Sécrétion d'insuline, d'hormone de croissance, synthèse des polyamines. Précurseur du monoxyde d'azote
Lysine (K)	3,8–6,6	Précurseur à la carnitine
Histidine (H)	0,9–2,7	Pouvoir tampon du noyau imidazole, liaison des ions métalliques (site actif des enzymes)
Thréonine (T)	0,6–5,0	La formation de glycine
Tryptophane (W)	0,2–1,1	Précurseur de la sérotonine
Isoleucine (I)	1,2–4,4	Antagoniste de l'absorption de L et de V
Leucine (L)	2,7–8,4	Antagoniste de l'absorption de I et de V
Valine (V)	0,6–5,5	Antagoniste de l'absorption de I et de la L
Méthionine (M)	1,3–3,6	Synthèse de la cystéine, initiation de la synthèse protéique, précurseur de la choline, créatine et des polyamines.
Phénylalanine (F)	2,0–6,5	Précurseur de la tyrosine, d'hormones thyroïdiennes, de la dopamine et de la mélanine

La carence en arginine entraîne une chute de la croissance chez le bar européen [Tibaldi *et al.*, 1994]. Les carences en méthionine, en tryptophane ou en histidine

intervenant dans la synthèse de molécules essentielles peuvent engendrer des cataractes, des scolioses ou un déséquilibre du métabolisme minéral chez les salmonidés [Poston *et al.*, 1977, Walton *et al.*, 1984b, Waagboø *et al.*, 2010].

4.3.3 Système digestif

Le système digestif représente l'ensemble des organes assurant l'ingestion, la digestion des aliments et leur absorption : la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, l'anus ainsi que deux glandes digestives : le foie et le pancréas (**Figure 18**).

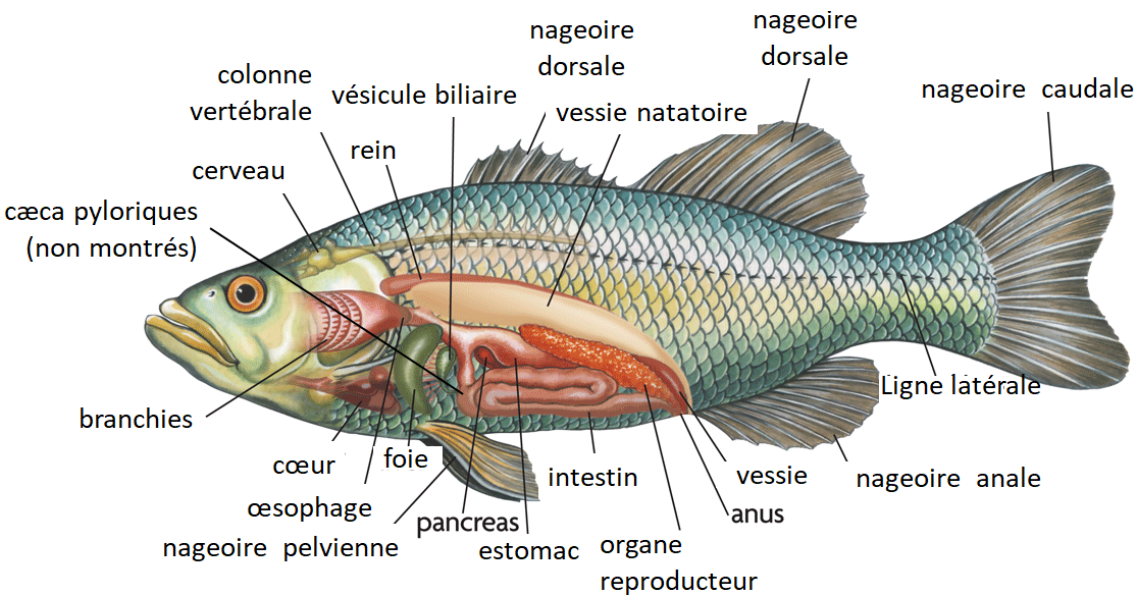


FIGURE 18 – Organes internes d'un poisson perciforme. (http ://marine-bio.mbhs.edu)

L'ouverture du tube digestif se fait au niveau de la cavité buccale. Elle assure chez les poissons une double fonction : une fonction digestive en assurant l'ingestion des aliments et une fonction respiratoire. Le bar européen possède une ouverture buccale horizontale et des dents vomériennes formant une rangée permettant la prédation.

L'œsophage fait le lien entre la cavité buccale et l'estomac. Il est large et court et possède une grande capacité de distension.

L'estomac est individualisé chez le bar européen. Il est coudé en forme de Y. Il est séparé de l'intestin par une valvule ou un sphincter pylorique permettant de contrôler l'avancée du bol alimentaire. Entre l'estomac et l'intestin, on trouve des évaginations de la paroi intestinale appelées *caeca* pyloriques. On en dénombre

ainsi 4 à 5 chez le bar européen [García Hernández *et al.*, 2001]. Ces diverticules aveugles ont la même structure et le même rôle que la partie antérieure de l'intestin, ils participent ainsi très activement à la digestion et l'absorption des nutriments [Buddington *et al.*, 1997].

L'intestin fait suite à l'estomac et débouche sur l'anus situé en avant de la nageoire anale. Chez le bar européen, il est long et replié. L'intestin est l'organe dans lequel se déroule l'absorption des nutriments. Il présente de nombreux replis correspondants aux villosités chez les vertébrés supérieurs permettant d'augmenter la surface d'absorption. Néanmoins, ces replis sont moins bien individualisés par rapport aux mammifères et sont appelés pseudo-villosités. La muqueuse intestinale est prismatique simple composée de différents types cellulaires (**Figure 19**).

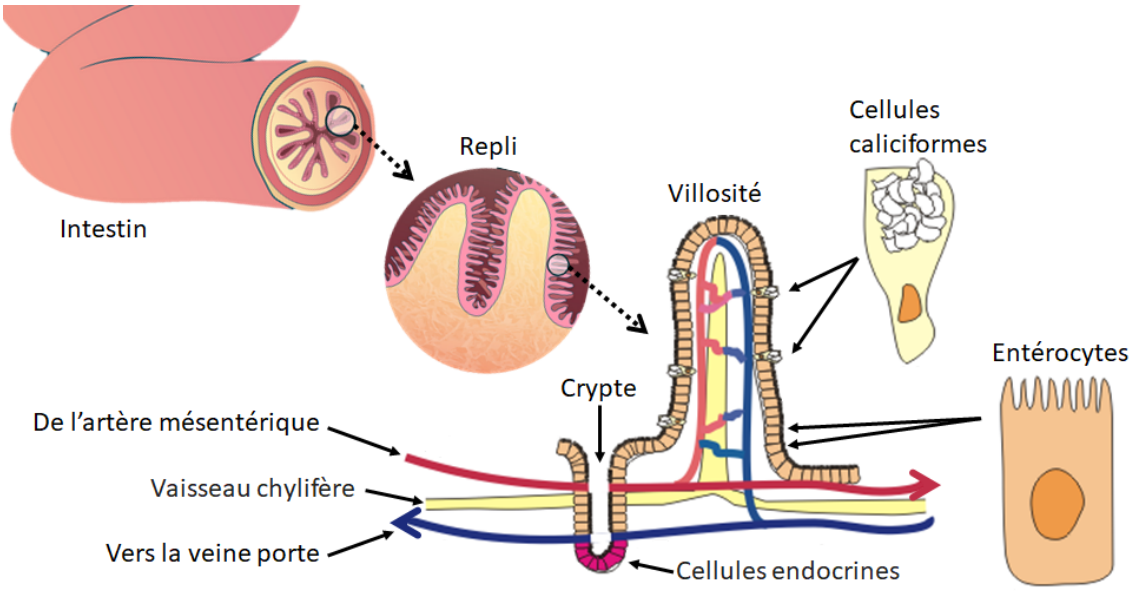


FIGURE 19 – Organisation cellulaire d'une villosité intestinale.

Les cellules intestinales les plus nombreuses sont les entérocytes ou cellules absorbantes. Elles sont hautement spécialisées dans la digestion et l'absorption des nutriments et sont dotées de microvillosités ou bordure en brosse au pôle apical augmentant la surface d'échange avec l'extérieur. On trouve également des cellules à mucus appelées cellules caliciformes ainsi que des cellules endocrines responsables de la sécrétion d'hormones (gastrine, cholécystokinine, greline, somatostatine, serotonine [Holmgren et Olsson, 2009].

Des cellules appelées « rodlet cell » ont également été observées chez les poissons. Elles se distinguent par la présence d'une couche fibreuse sous la membrane

plasmique et de granules cytoplasmiques en forme de bâtonnets. Leurs fonctions exactes restent inconnues mais des travaux les associent à des fonctions sécrétrices [Vigliano *et al.*, 2006] et immunitaires [Reite, 2005, Bosi *et al.*, 2018].

L'intestin est segmenté en différentes parties, mais contrairement aux vertébrés supérieurs, celles-ci ne présentent pas de différenciations anatomiques externes. Cependant, des différences histologiques permettent de déterminer trois segments souvent nommés antérieur, moyen et postérieur, correspondant au duodénum, au jejunum et à l'ilèon. La structure des entérocytes se modifie le long de l'intestin, dans la partie moyenne ils se possèdent de grandes vacuoles supranucléaires qui disparaissent dans la partie distale. Dans cette dernière, les entérocytes perdent également leur fonction d'absorption et présentent des microvillosités très courtes ainsi que de nombreuses mitochondries. On observe de plus, une diminution de la taille des pseudo-villosités dans les parties moyenne et distale (**Figure 20**). Les différences fonctionnelles entre ces trois segments ont été mises en évidence grâce à l'analyse différentielle de l'expression des gènes. En effet, les parties antérieures et moyennes sont spécialisées dans l'absorption des nutriments tandis que la partie postérieure de l'intestin est spécialisée dans le déclenchement et la mise en œuvre de l'immunité chez le bar européen [Calduch-Giner et al., 2016].

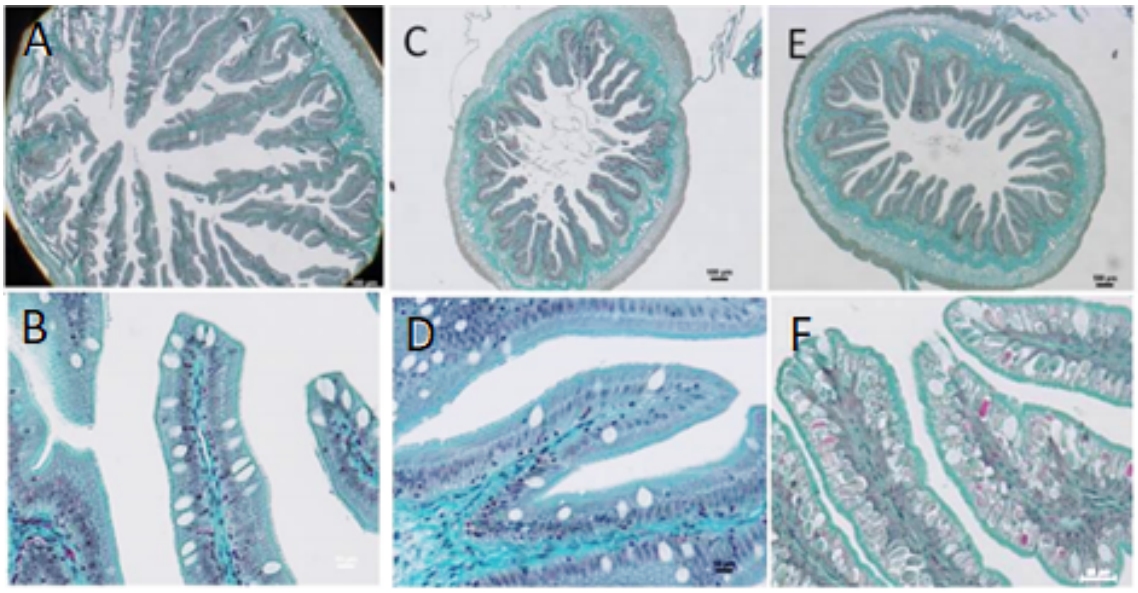


FIGURE 20 – Coupe histologique d'un intestin de bar européen. Organisation histologique de l'intestin. Clichés de microscopie optique au grossissement x4 et x40 des segments proximal (A et B), moyen (C et D) et distal (E et F) de l'intestin [Robert, 2014].

L'intestin joue également un rôle dans la santé chez les poissons car il participe aux défenses immunitaires au niveau du tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT pour Gut Associated Lymphoid Tissue)[1].

Le système digestif comprend également deux glandes principales, le foie et le pancréas. L'organisation tissulaire du foie diffère de celle des vertébrés supérieurs par l'absence de lobes hépatiques. Le foie remplit les mêmes fonctions que chez les vertébrés supérieurs : détoxication, synthèse et stockage du glycogène, glycolyse et sécrétion de bile.

Chez les poissons, la glycolyse sert davantage à fournir des précurseurs pour la biosynthèse de molécules variées qu'à produire du pyruvate pour l'oxydation [Guillaume *et al.*, 1999]. Les cellules du foie sécrètent de la bile de façon continue. Celle-ci contient de la bilirubine, des acides biliaires, du cholestérol, de la lécithine et de nombreux autres composants. Les acides biliaires et d'autres composants de la bile interviennent dans la digestion des graisses qui se déroule dans l'intestin. La bile a aussi pour fonction de transporter jusqu'à l'intestin les produits liposolubles à éliminer après leur passage dans le foie. Le foie joue en outre un rôle essentiel dans le cycle de dénaturation de l'hémoglobine. Les globules rouges sont détruits dans la rate, où la dégradation de l'hémoglobine produit de la bilirubine libre. La bilirubine libre est toxique et peut être nocive. Elle parvient au foie par voie sanguine et y est transformée en bilirubine conjuguée, non toxique. Celle-ci est ensuite déversée dans la bile, dont elle est un des composants majeurs [Mony et Duclos-Vallée, 2014].

Le pancréas est un organe diffus dont les nodules sont disposés dans le mésentère et dans le foie. Le pancréas sécrète des enzymes digestives et assure également une fonction endocrine comme chez les vertébrés supérieurs.

4.3.4 Nutrition protéique

Digestion

La digestion transforme les aliments ingérés en nutriments absorbables par l'organisme. Chez le bar européen, ce processus débute dans l'estomac où la digestion des protéines commence avec l'action d'une endoprotéase : la pepsine. Le précurseur de la pepsine, le pepsinogène, est produit par les cellules pariétales de l'estomac.

1. L'organisation cellulaire du GALT sera abordée à la page **80** de la section **4.4.1.**

Ces mêmes cellules sécrètent l'acide chlorhydrique qui active la pepsine. La pepsine fonctionnelle est également capable d'activer le trypsinogène, précurseur de la trypsine (cf ci-dessous). Le bol alimentaire séjourne dans l'estomac pendant plusieurs heures avant de passer dans l'intestin pour continuer la l'hydrolyse protéique.

Dans l'intestin, les enzymes pancréatiques et intestinales prennent le relai. C'est le cas notamment de la trypsine qui est sécrétée sous forme de zymogène (le trypsinogène) puis activée dans l'intestin grâce à l'action des entérokinases de la bordure en brosse. La trypsine active à son tour les autres enzymes (chymotrypsine, carboxypeptidases A et B, élastases et collagènase). Chaque mécanisme d'action de ces enzyme est spécifique (**Tableau 11**).

Tableau 11 – Sites de coupure des enzymes digestives protéolytiques [Guillaume *et al.*, 1999].

Enzymes	**Liaisons hydrolysées**
Pepsine	NH2 des acides aminés aromatiques et diacides
Trypsine	COOH de l'arginine et de la lysine
Chymotrypsine	COOH des acides aminés aromatiques
Elastase	Acides aminés aliphatiques
Carboxypeptidases	Acides aminés Cter
Aminopeptidase	Acides aminés Nter
Di- et tri-peptidase	Liaisons peptidiques des di et tri peptides

Les protéines d'origines alimentaire sont ainsi clivées en peptides de tailles variables. Les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes (dipeptidyl peptidase IV, leucine aminopeptidase, phénylalanine-glycine peptidase, γ-glutamyl-transférase, aminopeptidases....) terminent le clivage des peptides en acides aminés libres ou di/tri-peptides pouvant alors être absorbés par les entérocytes au niveau de l'intestin.

Absorption

L'absorption des acides aminés libres et des di- et tri-peptides est réalisée par des transporteurs membranaires des enterocytes de la paroi intestinale. Plusieurs familles de transporteurs ont été décrites chez les mammifères. Ils sont classés en fonction de leur substrat. Leur mode de fonctionnement (uniport, symport ou antiport) est représenté **Figure 21**.

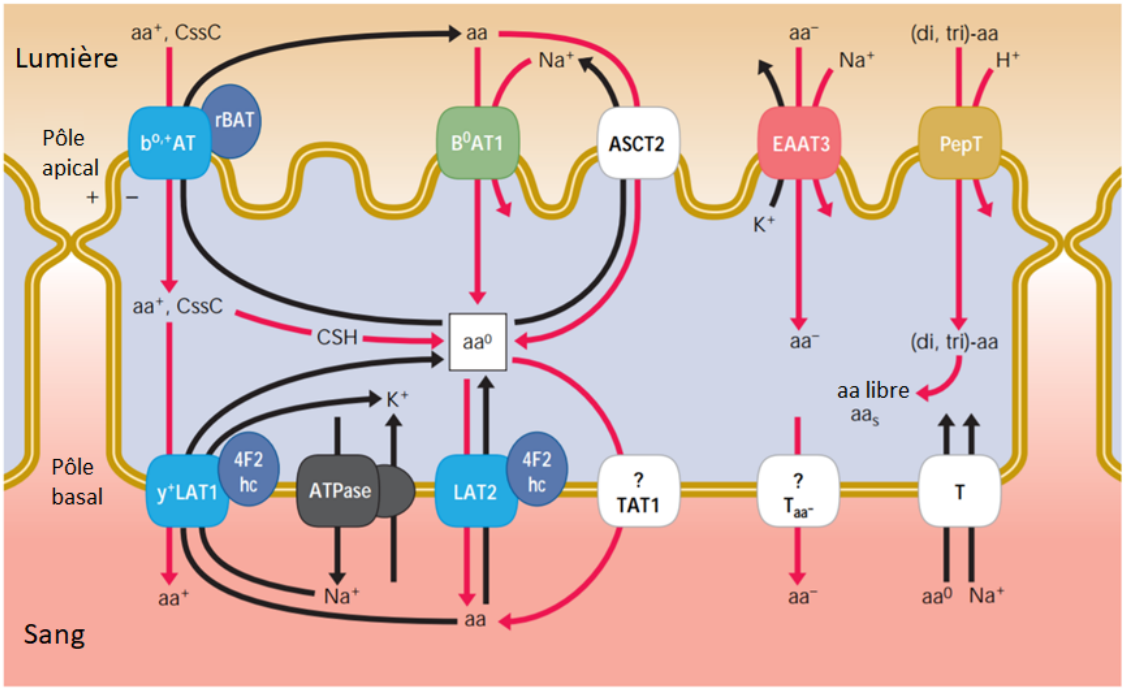


FIGURE 21 – Mécanismes d'absorption des acides aminés libres, di et tri peptides dans les enterocytes intestinaux. Les transporteurs jouant un rôle connu dans l'absorption intestinale des acides aminés (aa) sont colorés. Les transporteurs identifiés mais sans preuve de leur rôle dans l'absorption des acides aminés sont figurés en blanc. Les flèches rouges correspondent à une absorption des acides aminées. La concentration intracellulaire élevée en acides aminés neutres (aa^0), due à l'action des transporteurs apicaux (B^0AT1) et basaux (y^+LAT1-4F2hc, T), entraîne l'absorption active des acides aminés dibasiques (aa^+) et de la cystine (CssC). Cette absorption est également favorisée par le potentiel membranaire et par la réduction intracellulaire de la CssC en cystéine (CSH) [Palacín *et al.*, 2005].

Chez les poissons, les transporteurs de di/tripeptides et d'acides aminés libres ont été peu décrits. Seuls deux transporteurs ont fait l'objet d'études : PepT1 et B^0AT1. PepT1 est un transporteur de la membrane apicale peu spécifique qui transporte des di- et tri-peptides [Wang *et al.*, 2017]. Il a suscité un grand intérêt et a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques sur l'alimentation des poissons d'élevage. En effet, il permet de transporter plus d'acides aminés (sous forme de di/tripeptides) avec un moindre coût énergétique comparé aux transporteurs d'acides aminés libres. Il a été identifié chez le bar européen en 2009 [Terova *et al.*, 2009]. Un deuxième transporteur intestinal a été décrit, B^0AT1 [Margheritis *et al.*, 2013].

Toutefois, même s'ils n'ont pas encore été caractérisés, d'autres transporteurs semblent être présents chez les poissons [Saroglia *et al.*, 2012]. Cette hypothèse est

étayée par de nombreux travaux portant sur les flux d'acides aminés à travers la membrane intestinale qui suggèrent l'existence de transporteurs semblables à ceux des mammifères.

4.3.5 Alimentation industrielle

Comme nous l'avons vu précédemment, le bar est un poisson carnivore. Les formules alimentaires destinées à cette espèce contiennent donc une part non négligeable de FP pour les raisons nutritionnelles et réglementaires mentionnées précédemment. A l'heure actuelle, les FP représentent en moyenne 20% du produit final pour des poissons en grossissement. Ce taux varie en fonction du stade de croissance des bars et peut atteindre 50% à 60% pour des larves et juvéniles, en écloserie et pré-grossissement. Les taux de protéines sont également plus importants pour les aliments destinés aux alevins en raison de leur potentiel de croissance et, par conséquent de leur besoins nutritionnels plus élevés (**Tableau 12**).

Tableau 12 – Composition d'aliments destinés à la pisciculture du bar européen (Le Gouessant, source internet).

Produits :	Protéine	Lipide	ED (MJ/kg)	Stade physiologique
MARINSTART	64%	12%	19	Alevinage (<0,5–1,5 g)
NEOSTART 1 MER	52%	17%	19	Pré-grossissement (<2,5–10 g)
NEOSTART 2/3 MER	47%	18%	19	Pré-grossissement (10–50 g)
NEO GROWER EXTRA MARIN	43%	20%	18	Grossissement (50–>400 g)
NEO REPRO MER	50%	11%	17	Reproduction (0,5–>2 kg)

Abréviation : ED : Énergie digestible.

4.4 Santé chez le bar européen

Le bar européen d'aquaculture, comme toute espèce cultivée en élevage intensif est susceptible d'entrer en contact avec des pathogènes dans les différents systèmes de culture qu'il rencontrera.

La santé des poissons dépend de l'interrelation de composantes endogènes du poisson et de l'environnement dans lequel il vit (**Figure 22**). L'environnement peut être la composante la plus impactante sur la santé des poissons. En effet, les variations des paramètres abiotiques impactent directement la physiologie et la capacité de résistance du poisson. Le statut physiologique et sanitaire du poisson est

également en grande partie influencé par les pratiques de l'élevage : densité dans les cages/bassins, manipulation, vaccination, l'équilibre nutritionnel de l'aliment, taux de rationnement ... etc. Une variation importante ou chronique de ces facteurs provoquera un stress du poisson, le rendant ainsi plus sensible aux pathogènes [Kum et Sekki, 2011].

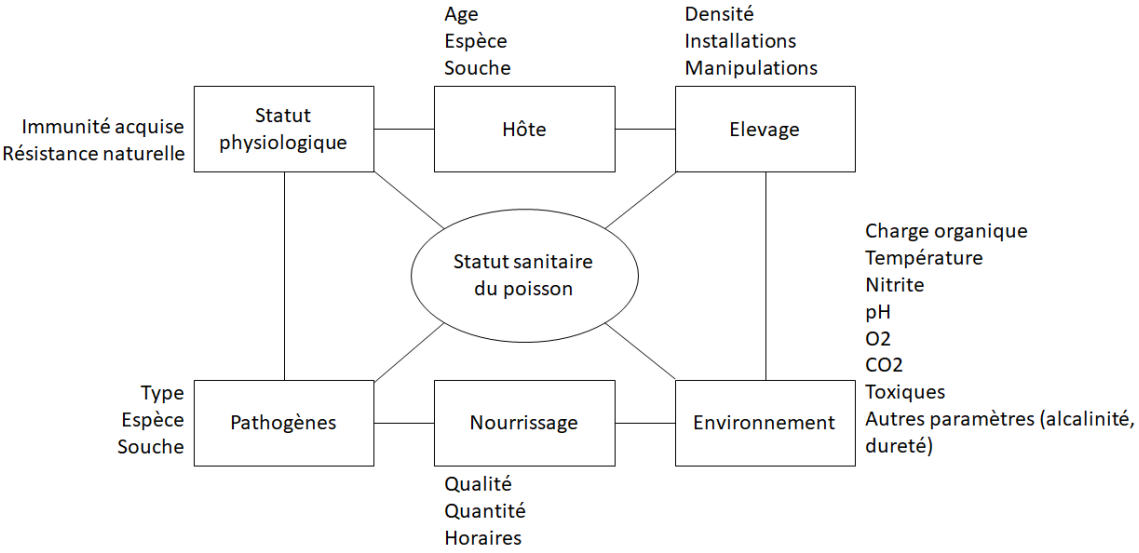


FIGURE 22 – Relation des différents facteurs dans la santé des poissons [Kum et Sekki, 2011].

4.4.1 Le système immunitaire chez le bar européen

Le bar européen possède les deux types de mécanisme de défense caractéristiques des vertébrés : **le système immunitaire inné** et le **système immunitaire adaptatif**. La **Figure 23** présente les principaux acteurs des systèmes de défense immunitaire du bar européen. Le système immunitaire des poissons est composé par des barrières physiques (peau, muqueuses digestives et branchiales) visant a empêcher l'introduction de pathogènes tels que les virus et les bactéries dans l'organisme [Alberts *et al.*, 2002]. Lorsque les agents pathogènes pénètrent dans l'organisme, une réponse rapide et non spécifique est alors mise en place par le système immunitaire inné [Litman *et al.*, 2005]. Puis le système immunitaire acquis est activé et une réponse spécifique est appliquée par les effecteurs [Rauta *et al.*, 2012].

Les organes de l'immunité. Le système immunitaire des poissons est très proche de celui des vertébrés supérieurs, néanmoins la composante acquise y est moins

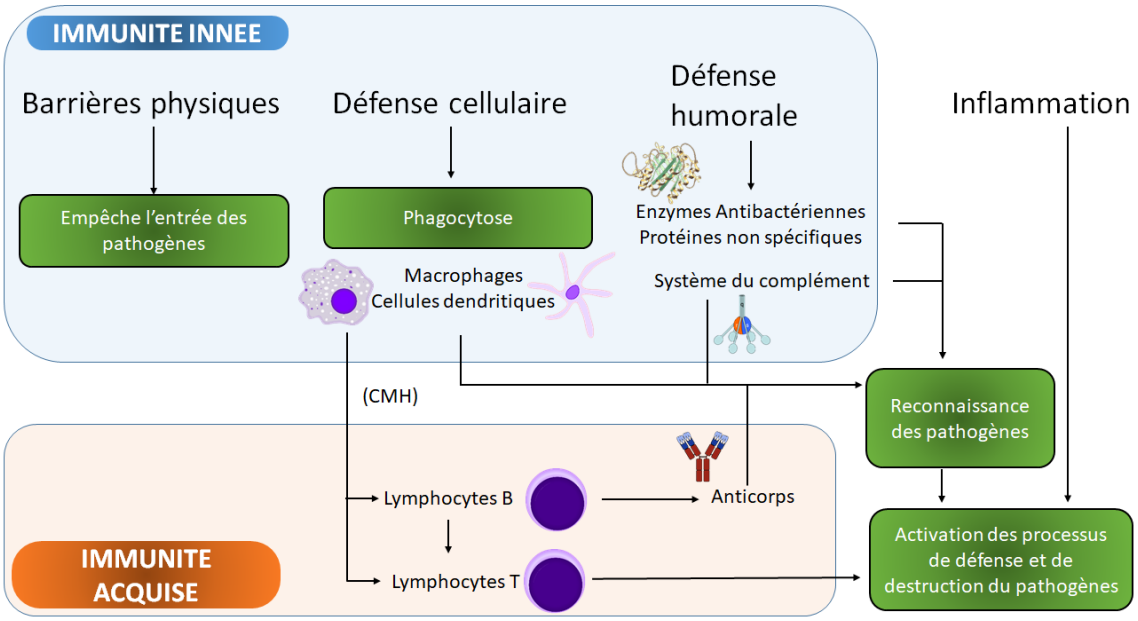


FIGURE 23 – Schéma récapitulatif des systèmes de défense immunitaire chez le bar européen. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

développée au profit de la composante innée [Sunyer *et al.*, 2003]. Il se compose des organes lymphoïdes, principalement le rein, la rate et le thymus ainsi que le GALT. Chez les poissons, le rein est un organe central car il assure la fonction hématopoïétique et il est le lieu principal de la phagocytose, de l'apprêtement de l'antigène et de la production d'immunoglobuline.

Le GALT est également très développé chez les poissons, il se distingue par une forte infiltration de lymphocytes T dans l'épithélium intestinal et de lymphocytes B dans la *lamina propia*. On trouve également des granulocytes et des cellules eosinophiles (pour revue, voir Rauta et al., 2012). La **Figure 24** présente l'organisation du GALT.

Le foie joue également un rôle important dans l'immunité innée chez les poissons. Wu et al. ont publié (2016) une étude transcriptomique sur l'interaction entre l'intestin et le foie chez le tilapia en condition d'homéostasie mais également lors d'épisode inflammatoire. Ils ont comparé les niveaux d'expression des transcrits entre les deux organes et ils ont mis en évidence une plus grande diversité des transcrits surexprimés dans l'intestin, centrés sur la réponse adaptative et la reconnaissance des antigènes en condition d'homéostasie. Dans le foie, les transcrits surexprimés sont majoritairement liés quant à eux à la réponse innée (système du complément). De manière très intéressante, lors de l'épisode inflammatoire, l'écart d'expression entre

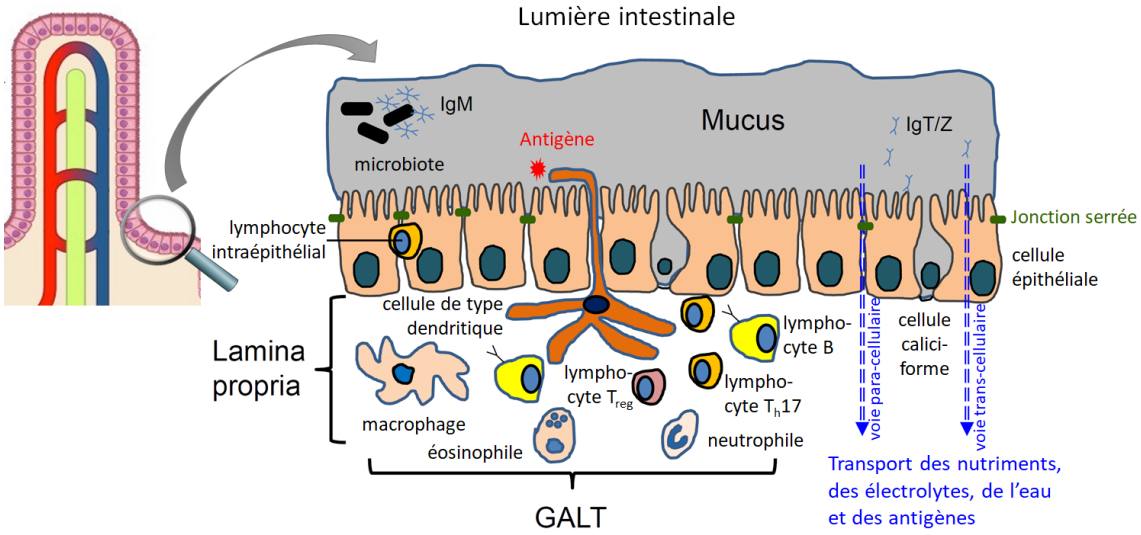


FIGURE 24 – Muqueuse intestinale des poissons téléostéens. Ce tissu complexe contient des cellules épihéliales impliquées dans la fonction de barrière intestinale qui contrôle les transports para- et transcellulaires, au moyen de gènes régulant ces processus. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) est contenu à l'intérieur de la *lamina propria* où l'on retrouve une population complexe de cellules immunitaires. La présence de cellules de type dendritique et de sous-populations de cellules de type T n'a pas encore été complétement confirmée. Modifié d'après Martin, 2016.

l'intestin et le foie diminue. Il ont ainsi émis l'hypothèse d'une synchronisation des réponses médiée par la bile vers le mucus intestinal .

La réponse immunitaire innée. La réponse immunitaire innée est le premier niveau de défense mis en jeu pour lutter contre des agents infectieux. Elle n'est pas spécifique de l'agent pathogène infectant le poisson. Elle comprend des effecteurs cellulaires mais également des acteurs moléculaires, agissant de différentes manières pour éliminer ou prévenir la propagation des pathogènes, et qui sont représentés respectivement dans les **tableaux 13** et **14**.

Tableau 13 – Cellules de l'immunité innée chez les poissons ainsi que leurs caractéristiques fonctionnelles et leur mode d'action [Kum et Sekki, 2011].

Acteurs cellulaires	**Fonctionnement et mode d'action**
Monocytes/Macrophages	Phagocytose et activation des phagocytes, production de cytokines, mort intracellulaire, dégradation et présentation des antigènes, sécrétion des hormones de croissance et enzymes nécessaires au remodelage des tissus endommagés, stimulation des lymphocytes T
Granulocytes (ou neutrophiles)	Phagocytose et activation des phagocytes, sécrétion, production des cytokines, mort extracellulaire, inflammation.
Cellules cytotoxiques non spécifiques (ou cellules « natural killer »)	Reconnaissance et lyse des cellules cibles, induction de l'apoptose des cellules infectées, synthèse et sécrétion de l'interféron-γ

Tableau 14 – Molécules humorales non spécifiques ainsi que leur composition et leur mode d'action chez les poisssons modifié d'après [Kum et Sekki, 2011].

Composants humoraux	**Nature**	**Mode d'action**
Peptides antibactériens (*histone H2B, cecropine P1, pleurocidine, parasine, hippocine, dicentrarcine, piscidine, SAMP H1*)	Protéine	Mécanisme de défense innée inductible et constitutif, actif contre les bactéries, présent lors du développement de la réponse immunitaire spécifique chez les poissons au stade larvaire
Antiprotéases (*anti-protéase $\alpha 1$, anti-plasmine $\alpha 2$, macroglobuline $\alpha 2$*)	—	Réduit la capacité des bactéries à envahir et se propager
Céruloplasmine	Protéine	Fixe le cuivre
Système du complément (*C3, C4, C5, C7, C8, C9 et leurs isoformes, facteurs B et D*)	Protéine	Favorise la fixation des pathogènes sur les phagocytes, facilite l'inflammation, provoque la lyse osmotique ou la mort apoptique
Intérferon (*INF*) /protéines des myxovirus (*IFN-α, β, IFN-γ*)	Glycoprotéine ou Protéine	Aide à la résistance aux infections virales, inhibe la réplication virale, les gènes des interférons sont inductibles.
Lectines	Glycoprotéine et/ou protéine spécifique d'un sucre en particulier	Induisent les réactions de précipitation et d'agglutination, reconnaissance des pathogènes, facilitent la fixation de différences sucres en présence de Ca^{2+}, activent le système du complement, activité d'opsonisation et de phagocytose
Enzymes lytiques (*lysozyme, chitinase, chitobiase*)	Protéines catalytiques	Modifient la charge électrique à la surface des pathogènes pour faciliter la phagocytose. Effets hémolytique, antibactérien, antiviral et antiparasitaire. Opsonisation et inactivation des endotoxines bactériennes.
Anticorps naturels	—	Reconnaissance et retrait des cellules sénescentes et apoptotiques et autres antigènes du soi. Contrôle et coordonne les réponses immunitaires innée et acquise. Activité contre les protéines haptenées
Pentraxines (*protéine réactive C, sérum amyloïde P*)	Protéine	Opsonisation ou activation du complement, facilite la fixation des structures polysacharidiques en présence de Ca^{2+}, induisent la liberation des cytokines, facilitent la phagocytose des pathogènes par les macrophages.
Protéases (*cathépsine L et B, trypsin-like*),	—	Défense contre les bactéries, activité contre *Vibrio anguillarum*
Transferrine/Lactoferrine	Glycoprotéine	Fixation du fer, agissent comme inhibiteur de la croissance des bactéries, activent les macrophages

La réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire adaptative est le prolongement de la réponse innée. Elle est plus spécifiquement dirigée vers un agent infectieux donné. Les effecteurs principaux du système immunitaire acquis sont les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les premiers ont un rôle dans la coordination des cellules immunitaires et sont capables de secréter des molécules cytotoxiques engendrant la mort des pathogènes [Rauta *et al.*, 2012]. Différents marqueurs des lymphocytes T ont été identifiés chez les poissons, dont les marqueurs CD8, CD4, CD28, CD3e,TCRa, TCRb, TCRg et TCRz [Bernard *et al.*, 2006, Yazawa *et al.*, 2008]. Les lymphocytes B sont quant à eux capables de produire des immunoglobulines. Des Ig de la classe des IgM, IgD, IgT et IgZ/IgT ont été identifiées [Du Pasquier, 2001, Hansen *et al.*, 2005, Ohta et Flajnik, 2006, Ryo *et al.*, 2010].

Les cytokines. Elles régulent l'initiation, le maintien et l'amplification de la réponse immunitaire. Les cytokines sont les messagers solubles du système immunitaire et ont la capacité de réguler de nombreux types de cellules de manière autocrine, paracrine et endocrine, et peuvent également être des effecteurs immunitaires [King *et al.*, 2001]. Le **Tableau 15** présente les principales cytokines identifiées chez les poissons.

Tableau 15 – Cytokines des poissons téléostéens ainsi que leurs fonctions et/ou structure. Modifié d'après Aoki et al., 2008 .

Classe	Fonction /ou Structure	Membres
Cytokines de classe 1	Impliquées dans l'expansion et la différentiation. Possèdent une superstructure à 4 hélices α	I-6α et -β, IL-11α et -β, GCSF-α et -β, leptine, Epo, PRL, GH, M17 son homologue (MSH)
Cytokines de classe 2	Impliquées dans la limitation des dommages à l'hôte après l'agression. Possèdent plus de 4 hélices α.	IFN de type 1 (IFN-α1, INF-α2), IFN-γ, IL-10, IL-20, IL-24
Chimiokines	Régulent la migration cellulaire lors de l'homéostasie et lors d'une inflammation. Protéines de petite taille contenant 4 résidus cystéines conservés.	CXC (CXCL8-like, CXC-10, -12, -13, -14), CC (CCL19/21/25, CCL20, CCL27/28, CCL17/22, MIP, MCP)
Super famille du TNF	Impliquée dans l'inflammation et le développement des organes lymphoïdes. Trimères protéiques compacts liés aux membranes ou solubles.	TNF-α1,TNF-α2, TNF-N, lymphotoxine-β1, lymphotixine-β2
Famille des IL-1	Impliquée dans la réponse pro-inflammatoire. Protéines riches en feuillets β.	IL-1α, IL-1β, IL-18

Abréviations : IL, interleukine ; INF, Interféron ; TNF, tumor necrosis fator.

4.4.2 Les principaux agents pathogènes chez le bar européen

Les agents pathogènes suceptibles d'affecter le bar européen sont d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. Le déclenchement de la maladie n'est pas seulement dûe à la présence des microorganismes mais elle est le plus souvent associé à un état de stress des poissons [FAO, 2016b]. Le **tableau 16** présente les principaux agents pathogènes identifiés chez le bar européen et les symptômes associés, ainsi que les traitements curatifs. Encore aujourd'hui, pour certaines pathologies, comme les myxosporidioses, il n'existe pas de traitement efficace.

Tableau 16 – Principales pathologies du bar européen [FAO, 2006].

Maladie	Agent	Type	Symptômes	Mesures
Maladie Virale encephalo-retinopathie	Nodavirus	Virus	Nervosité	Prophylaxie ; Bonnes conditions d'élevage
Vibriose	*V. anguillarum* ; *V. ordali* ; *Vibrio spp*	Bactérie	Anorexie ; couleur foncée ; ulcères de la peau ; distension abdominale ; splénomégalie ; viscérale pétéchie ; entérite nécrotique	Vaccination des juvéniles ; traitement antibiotique
Photobactériose ou Pseudotuberculose	*Photobacterium damsela subsp. pasteurella*	Bactérie	Anorexie ; assombrissement ; splénomégalie ; lésions de la rate ou granulomatose de rate (forme chronique)	Traitement antibiotique

Tableau 16 – Principales pathologies du bar européen [FAO, 2006] (Suite).

Maladie	Agent	Type	Symptômes	Mesures
Myxobacteriose	*Flexibacter maritimus*	Bactérie	Ulcères de la peau ; nécrose ; érosion des nageoires	Traitement antibiotique
Mycobacteriose	*Mycobacterium marinum*	Bactérie	Emaciation ; croissance faible ; hypertrophie du rein et de la rate avec des granulomes	Prophylaxie
Epitheliocystose	Chlamydia-like	Bactérie	Nodules sur la peau et branchies	Prophylaxie
Amyloodiniase	*Amyloodinium occelatum*	Dinoflagellés	Peau foncée ; apparence trouble de la peau (maladie de velvet)	Choc osmotique
Cryptocaryoniase	*Cryptocaryon irritans*	Ciliés	Lésions de peau ; taches blanches ou taches blanches multifocales (maladie marine des taches blanches)	Choc osmotique
Scuticociliatose ; autres ciliatose	*Philasterides dicentrarchi* ; *Uronema sp.* ; *Tetrahynema sp.*	Ciliés	Lésions de peau et branchies ; dépigmentation ; ulcérations ; hémorragies de certaines zones de la peau	Choc osmotique
Myxosporidiose	*Shaerospora dicentrarchi* ; *S. testicularis* ; *Ceratomyxa labraci*	*Myxosporidés*	Réduction de la production ; réduction du taux de croissance ; faible mortalité	Pas de traitement
Microsporidiose	*Glugea sp.*	Microsporidés	Réduction de la production ; faible mortalité	Pas de traitement
Infestation branchiale	*Diplectanum aequans* ; *D. laubieri*	Monogènes trématode	Peau trouble ; rougeur localisée, avec production excessive de mucus hyperplasie épithéliale ; hémorragie des branchies	Prophylaxie ; bonnes conditions d'élevage
Infection à *Anisakis*	*Anisakis spp.*	Nématode	Larve dans la cavité coelomique	Prophylaxie
Atteinte par des Isopodes	*Ceratothoa oestroides* ; *Nerocilla orbiguyi* ; *Anilocra physoides*	Crustacés (isopodes)	Retard de croissance ; nécrose des branchies et tissus de la peau ; adultes et larves	Prophylaxie

4.4.3 Stratégie de vaccination chez le bar européen.

La présence d'une réponse adaptative chez le bar européen, permet de le vacciner contre certains agents pathogènes reponsables des vibrioses. En pisciculture, le bar est généralement vacciné par injection 4 mois après le début de l'élevage (eau à 17–19°C, poids moyen de 2 grammes). Ils sont en effet déjà matures immunologiquement [dos Santos *et al.*, 2000]. Il est possible d'immuniser des poissons plus jeunes mais la réponse immunitaire observée est à la fois moins importante mais également plus lente par rapport aux animaux plus âgés [Gravningen *et al.*, 1998, Dos Santos *et al.*, 2001, Bakopoulos *et al.*, 2003]. Pour les poissons plus jeunes, la balnéation semble être le moyen le plus efficace pour la vaccination car cette méthode est plus représentative des voies naturelles de contamination par les branchies, la bouche, l'intestin, l'anus et les blessures de la peau [Angelidis, 2006]. Des efforts très importants sont entrepris afin de permettre l'immunisation du bar européen contre les nodavirus et notamment des juvéniles qui sont très sensibles à cet agent

pathogène [Buonocore *et al.*, 2017].

4.5 Développement d'aliments fonctionnels destinés à améliorer la résistance des poissons

Ces dernières années, les aliments destinés aux poissons carnivores sont devenus très performants malgré la diminution de la part de FP au profit des FV [2]. En effet, la supplémentation de ces aliments avec des **ingrédients fonctionnels** a permis de compenser les pertes de performances zootechniques et sanitaires liées aux fortes teneurs de FV dans les aliments [3]. Pour atteindre des performances élevées, différents ingrédients peuvent être ajoutés aux formules alimentaires (pour revue Dawood et al., 2017). Le **Tableau 17** présente quelques catégories d'ingrédients entrant dans la composition des **aliments fonctionnels**.

Tableau 17 – Performances fonctionnelles des additifs alimentaires utilisés chez certaines espèces animales aquatiques modifié d'après Dawood et al., 2017.

Additif	**Performance de croissance et utilisation alimentaire**	**Réponses immunitaire et physiologique**	**Résistance aux maladies**	**Références**
Probiotiques (microorganismes vivants ou inactivés)	(+++)	(+++)	(+++)	Merrifield et al. (2010), Ringø et al. (2010a,b), Aguirre-Guzman et al. (2012), Martınez Cruz et al. (2012), Zhou et Wang (2012), Mohapatra et al. (2013), Rico et al. (2013), De et al. (2014), Merrifield et Ringo (2014), Navarrete et TovarRamırez (2014), Perez-Sanchez et al. (2014), Akhter et al. (2015), Iwashita et al. (2015), Dawood et Koshio (2016)
Prébiotiques (fibres non-digestibles)	(++)	(+++)	(++)	Yousefian et Amiri (2009), Merrifield et al. (2010), Ringø et al. (2010b, 2014b), Patel et Goyal (2012), Ganguly et al. (2013), Merrifield et Ringo (2014), Song et al. (2014), Akhter et al. (2015), Iwashita et al. (2015) et Dawood et Koshio (2016
Synbiotiques (pré- + probiotiques)	(+++)	(+++)	(+++)	Cerezuela et al. (2011), Dawood et Koshio (2016) et Ringø et Song (2016)
Immunostimulants (β-glucane et lactoferrine	(++)	(+++)	(++)	Lin et al. (2011), Ringø et al. (2011), Alishahi et Aïder (2012), Ganguly et al. (2013), Meena et al. (2013) et Ringø et Song (2016)
Nucléotides	(++)	(+++)	(+)	Li Et Gatlin (2006), Ringø et al. (2011) et Hossain et al. (2016)

2. voir **Figure 8** page 47.
3. voir « Optimisation des régimes alimentaires riches en farine d'origine végétale » page 42.

Tableau 17 – Performance fonctionnelle des additifs alimentaires utilisés chez certaines espèces animales aquatiques modifié d'après Dawood et al., 2017 (Suite).

Additif	Performance de croissance et utilisation alimentaire	Réponses immunitaire et physiologique	Résistance aux maladies	Références
Plantes médicinales	(+)	(++)	(++)	Citarasu (2010), Chakraborty et Hancz (2011), Direkbusarakom (2011), Harikrishnan et al. (2011), Lee et Gao (2012), Pandey et al. (2012), Hwang et al. (2013), Ramudu et Dash (2013), Reverter et al. (2014), Vaseeharan et Thaya (2014), Syahidah et al. (2015) et Van Hai (2015)
Acides organiques ou acidifiants	(+)	(+)	(+)	Gislason et al. (1994), Vielma et al. (1999), Lückstädt (2008), Bai et al. (2015), Elala et Ragaa (2015) et Ng et Koh (2016)
Antioxydants	(-)	(++)	(++)	Frigg et al. (1990), Gatlin et al. (1992), Lygren et al. (1999) et Bai et al. (2015)

Amélioration : (+++) très significative ; (++) significative ; (+) probable et (-) controversée.

La **supplémentation en AA** dans les formulations alimentaires permet également, chez certaines espèces, d'améliorer la santé des poissons. L'arginine permet d'augmenter la résistance aux maladies chez le poisson-chat (*Ictalurus punctatus*) [Alejandro Buentello et Gatlin, 2001] et la sole sénégalaise [Costas *et al.*, 2011]. La glutamine permet d'améliorer la réponse immunitaire innée chez le poisson-chat [Pohlenz *et al.*, 2012]. Chez l'ombrine (*Sciaenops ocellatus*), la glutamine permet d'améliorer la réponse immunitaire [Cheng *et al.*, 2011b, Cheng *et al.*, 2011a] et d'augmenter les capacités de détoxification contre le stress oxydant [Hu *et al.*, 2014]. Des résultats similaires ont été observés chez le poisson-chat jaune lors d'une suppélementation du régime alimentaire avec de la méthionine [Elmada *et al.*, 2016].

L'amélioration des performances de croissance et du statut sanitaire des poissons par la supplémentation en ingrédients fonctionnels ouvre la voie à de nouvelles formulations à la fois performantes et respectueuses de l'environnement. En effet, les hydrolysats de protéines de co-produits aquatiques, de part leur origine et leur composition en **peptides bioactifs** [4] et en **AA libres** sont des **ingrédients fonctionnels** à forts potentiels pour une utilisation en aquaculture.

Il reste néanmoins à déterminer leurs niveaux de performance ainsi que leurs profils de fonctionnalité. Ces deux aspects seront discutés dans les chapitres suivants.

4. voir « Bénéfices fonctionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique » page 60.

5 Contexte et objectifs de la thèse

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans une thématique relative au développement d'une pisciculture durable reposant sur des pratiques respectueuses de l'environnement.

L'aquaculture est en pleine croissance et produit aujourd'hui la moitié des produits aquatiques destinés à la consommation humaine. Elle constitue ainsi un secteur clé pour le maintien et l'amélioration de la sécurité alimentaire dans le monde. Au cours de ces dernières années, la part des FP dans la formulation des aliments a particulièrement diminué au profit des FV pour répondre aux nombreuses contraintes économiques et environnementales. Le remplacement des FP dans les aliments destinés aux poissons carnivores est un défi majeur pour l'industrie de l'aquaculture. En effet, le développement d'aliments à faible teneur en FP doit tenir compte des contraintes économiques liées à la productivité des fermes piscicoles, qui peut être impactée par une mauvaise performance des nouvelles formulations. En effet, si certaines études ont démontré que le remplacement partiel des FP par des FV était possible, il reste encore des points bloquants (nutrition, appétence, santé) à lever pour atteindre un remplacement total des FP par des FV. Le développement de nouvelles stratégies de formulation combinant protéines alternatives aux FP et ingrédients fonctionnels pourrait permettre d'atteindre, avec des aliments à forte teneur en FV, des niveaux de performance proches de ceux observés avec des aliments plus conventionnels.

Diana Aqua est une division du groupe Symrise spécialisée dans la production d'hydrolysats de protéines destinés à la formulation d'aliments pour poissons et crevettes, et ce, pour en améliorer les bénéfices appétence, nutritionnel et santé. Plusieurs études réalisées par Diana Aqua chez le poisson ont pu montrer le potentiel des hydrolysats de protéines pour la formulation d'aliments à faible teneur en farines

de poissons. Ainsi, des essais menés chez le bar européen lors de la thèse de Marie Robert financée par Diana Aqua et soutenue en 2014, ont montré que les hydrolysats de co-produits de crevette et de tilapia permettaient de formuler des aliments avec seulement 5% de FP sans affecter les performances de croissance et de santé du poisson.

Les hydrolysats de protéines restent des produits difficiles à caractériser de part la diversité des matières qui les compose, leur richesse en peptides et les activités biologiques qu'ils peuvent porter. Il est devenu nécessaire d'aller plus loin dans la caractérisation de ces ingrédients fonctionnels pour mieux en comprendre la performance. De plus, il n'existe aucuns travaux n'ayant étudié chez le poisson la réponse du métabolisme aux hydrolysats de protéines d'origine alimentaire pour en expliquer les mécanismes d'action.

Dans la continuité des travaux menées Robert (2014), ce travail de thèse s'est concentré sur la compréhension des mécanismes sous-jacents à la performance de deux hydrolysats de co-produits (crevette et tilapia) chez le bar européen, grâce au développement d'outils innovants permettant d'analyser les paramètres structuraux et les propriétés fonctionnelles des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique (**Figure 25**). Dans un premier temps, les études se sont focalisées sur le développement de méthodes de normalisation et de caractérisation de la quantité et de la diversité en peptides de faible masse moléculaire puis sur l'identification des peptides hydrolytiques d'hydrolysats de co-produits de différentes origines. Dans un second temps, les travaux de recherche se sont orientés vers l'évaluation des performances zootechniques et fonctionnelles des deux hydrolysats (tilapia et crevette) chez le bar européen. Ainsi, les activités myotropes, d'une part, et la réponse du transcriptome intestinal et hépatique, d'autre part, ont été étudiés dans le cadre de deux essais zootechniques indépendants.

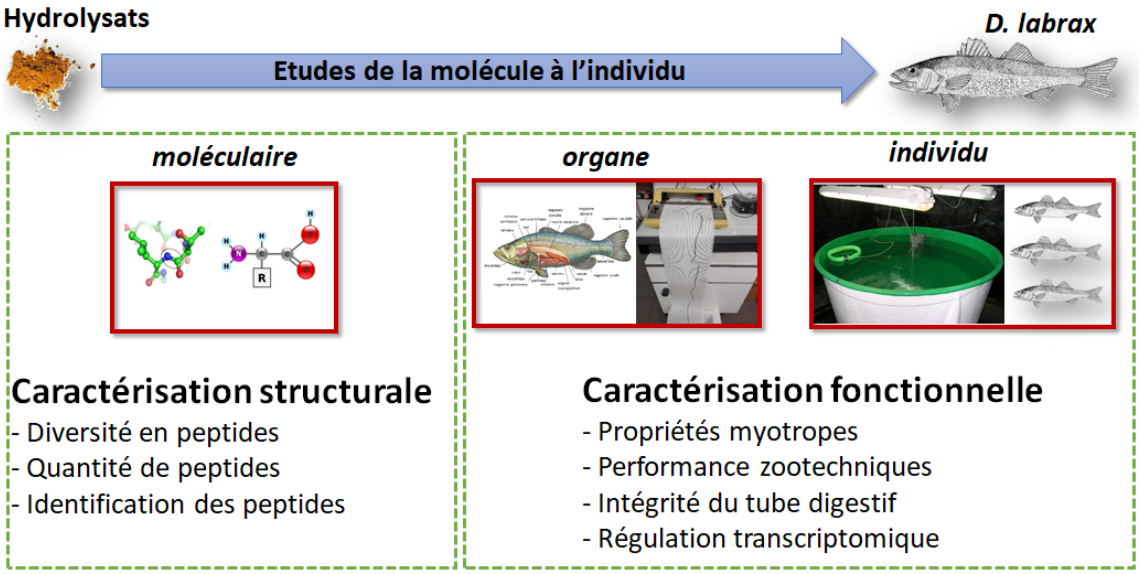


FIGURE 25 – Résumé graphique des objectifs de la thèse.

Deuxième partie

Matériels et méthodes

1 Origine des hydrolysats de protéines

Les hydrolysats de protéines testés lors de ces travaux de thèse ont été fournis par Diana Aqua. Ils différent par l'origine de la matière première : céphalothorax de crevette (*Litopenaeus vannamei*), viscères de thon (*Katsuwonus pelamis*), têtes et arêtes de saumon (*Salmo salar*), ou différentes espèces de *Gadidae* ou de tilapia (*Oreochromis niloticus*), têtes et viscères de calmar (*Illex argentinus*), krills entiers (*Euphausia superba*), ainsi que par le procédé de fabrication. Les différentes co-produits utilisés dans les procédés d'hydrolyse sont issus d'usines de transformation. Pour la réaction d'hydrolyse, les matières premières congelées sont broyées à 6 mm et chargées dans un réacteur thermostaté de 10 litres équipé d'un agitateur central (40 tours.min^{-1}). Les matières premières sont chauffées à 50 °C, puis soumises à des procédés d'hydrolyse enzymatique différents, dont les spécifications (nature et dose de l'enzyme, durée d'hydrolyse) ne seront pas détaillées dans ce manuscrit pour des raisons de confidentialité. Aucune régulation du pH n'est appliquée pendant l'étape d'hydrolyse. Cette dernière se termine par une inactivation des enzymes par traitement thermique (80 °C pendant 15 minutes). Les hydrolysats sont ensuite tamisés à 500 µm pour éliminer les déchets solides (arêtes, carapaces, ...) puis séchés par atomisation et conservés sous forme de poudre entre 0 et 4 °C jusqu'à utilisation. Des antioxydants et conservateurs sont ajoutés aux hydrolysats pour assurer leur stabilité dans le temps.

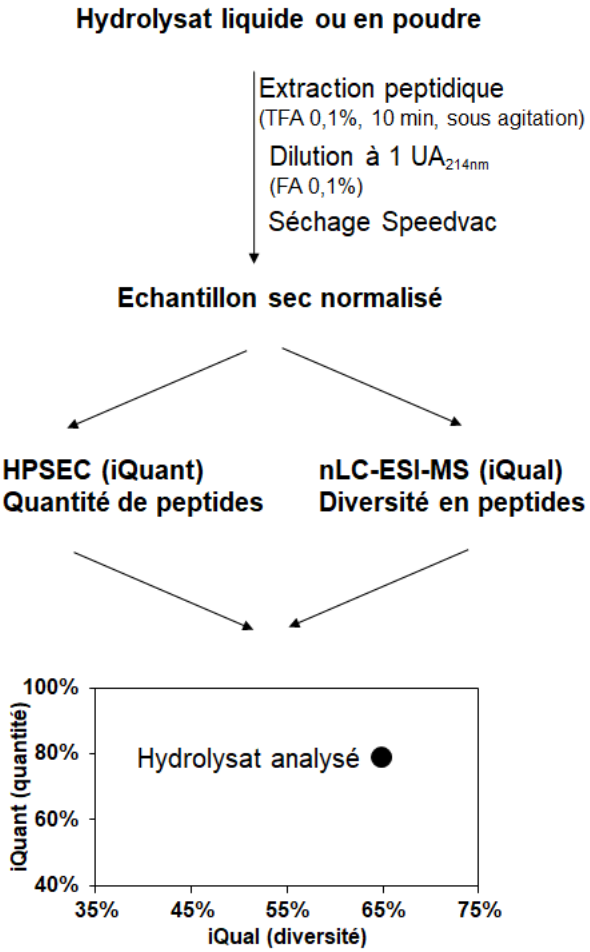


FIGURE 26 – Méthodologie d'analyse des propriétés structurales des hydrolysats. Les peptides des hydrolysats sont extraits puis les échantillons sont normalisés à l'aide d'un dosage spectrophotométrique. La quantité de peptide est déterminée grâce à des expériences de chromatographie liquide d'exclusion stérique. La diversité en peptides est déterminée grâce à une analyse de l'échantillon par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de type électro-spray. Enfin, les résultats sont fusionnés dans un diagramme à deux dimensions.

2 Caractérisation des performances structurales des hydrolysats de protéines d'origine aquatique – approche peptidomique

Toutes les analyses de caractérisation structurale des hydrolysats de protéines ont été menées sur des extraits issus des échantillons fournis par Diana Aqua. La méthodologie est présentée et discutée en détail dans le chapitre « *Caractérisation structurale des hydrolysats de protéines : développement d'un outil d'analyse de la diversité et de l'abondance en peptides de faible masse moléculaire* » page 125. Néanmoins, pour faciliter la lecture de ce manuscrit, la méthodologie est présentée succinctement **Figure 26** ci-contre.

2.1 Extraction et pré-purification des peptides

Les extractions peptidiques des hydrolysats ont été réalisées en milieu acide. Un gramme d'hydrolysat est homogénéisé dans 10 ml d'acide trifluoroacétique 0,1% (TFA, HPLC-grade, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) et incubé sous agitation 10 minutes à température ambiante pour la caractérisation structurale des hydrolysats ou une nuit à 4°C pour l'identification du peptide myotrope de l'hydrolysat de crevette. Après centrifugation pendant 15 minutes à 30 000 x g et à 4°C, le surnageant est filtré sur un filtre en papier (Whatman) puis concentré sur colonne SepPak C18 (Waters, Milford, Massachusetts, USA). La fraction organique est éluée avec 80% d'acétonitrile (ACN, HPLC-grade, Sigma-Aldrich) à 0,1% de TFA. Une

étape optionnelle de normalisation de l'échantillon est réalisée pour la détermination des indices de quantité et de diversité en peptides des hydrolysats [1]. L'éluat est alors dilué dans de l'acide formique à 0,1% (AF, HPLC-grade, Sigma-Aldrich). Tous les échantillons sont aliquotés puis évaporés avec un speed vac. Les extraits secs sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.2 Chromatographie liquide haute performance

2.2.1 Chromatographie liquide d'exclusion stérique (HPLSEC)

L'analyse de la quantité de peptides de faible masse moléculaire (seuil fixé à 1000 Da pour les raisons expliquées dans le § 2.6) est réalisée sur une chaine VARIAN composée d'une pompe à gradient VARIAN-9012, d'un détecteur UV-VIS VARIAN-9050 à 214 nm et d'un collecteur Biorad 2110. L'acquisition du chromatogramme est gérée par le logiciel Masslynx (Waters). Nous avons utilisé une colonne Reprosil 50 SEC (AIT, Houilles, France) et un gradient isocratique eau/ACN/TFA (89,9/10/0,1 v/v/v) avec un débit de 0,7 ml.min^{-1} pendant 45 minutes.

2.2.2 Chromatographie en phase inverse C18 (rpHPLC)

A l'issue des tests d'activité myotrope réalisés sur les différents hydrolysats de protéines, des étapes de purification du peptide myotrope de l'hydrolysat de crevette (montrant l'activité myotrope la plus importante) sont réalisées. Elle ont mis en œuvre un système UFLC Shimadzu composé d'une pompe LC-202A, d'un dégazeur DGU-20A3R, d'un four CTO-10ASVP, d'un module de communication CBM-20A, d'un détecteur SPD-20A et d'un collecteur FRC-10A. L'élution est conduite sur une colonne EC 250/4 Nucleodur 100-10 C18-ec column (réf : 760003.40, Macherey-Nagel, Hoerdt, France) avec un mélange ACN/eau/TFA (80/19,9/0,1, v/v/v) avec un débit de 1 ml.min^{-1}. Le gradient d'ACN est réalisé de 10% à 17% en 14 minutes pour la première étape de séparation et de 0% à 8% en 55 minutes pour la seconde étape de séparation. Toutes les fractions sont collectées lors du gradient d'ACN puis sont évaporées à l'aide d'un speedvac et conservées à 4°C jusqu'à utilisation. Les

1. Voir méthodologie détaillée page 127.

culots peptidiques secs sont re-suspendus dans 600 μl d'une solution de TFA à 0,1% et injectés à raison de 50 μl par run.

2.3 Electrophorèse préparative (OFFGEL)

La technologie OFFGEL sépare les composants d'un mélange liquide selon leur point iso-électrique. Elle permet de décomplexifier l'échantillon en amont d'une séparation chromatographique en phase inverse. Les hydrolysats de krill sont traités par électrophorèse OFFGEL (3100 OFFGEL fractionnator, Agilent) selon une gamme de pH s'étendant de 3 à 10 répartie dans 12 puits. Les extraits peptidiques sont repris dans de l'eau puis 800 μl de cette solution sont ajoutés à 3200 μl de Peptide OFFGEL Stock solution 1,25X (6 ml de glycérol + 600 μl de tampon OFFGEL). Le gel du strip de séparation est monté sur le support et réhydraté par 40 μl de tampon Peptide OFFGEL Stock solution 1X dans chacun des 12 puits. Les électrodes sont hydratées dans cette solution et déposées en appui des puits. Après 15 minutes d'incubation, 150 μl d'échantillon sont déposés dans chacun des puits puis de l'huile minérale est déposée sur les électrodes. Enfin, le support est placé sur la plateforme et une tension est appliquée jusqu'à atteindre la valeur de 20 kV (en 18 heures environ).

2.4 Chromatographie liquide nano (nLC)

A l'issue de la séparation des composants par la technologie OFFGEL, une seconde étape de fractionnement est réalisée à partir des 12 puits collectés. Les échantillons sont préalablement dessalés et concentrés sur μC18 Omix (Varian). La séparation chromatographique est menée sur un système nano-LC (Prominence, Shimadzu). Les peptides sont concentrés sur une pré-colonne Zorbax C18 (5 x 0,3 mm, Agilent Technologies) puis séparés sur une colonne Zorbax C18 (150 x 75 μm, Agilent Technologies). Les phases mobiles sont composées d'un mélange eau/TFA (99,9%/0,1%, v/v) (Phase A) ou d'un mélange eau/ACN/TFA (20%/79,9%/0,1%, v/v/v) (Phase B). Les échantillons sont élués selon le gradient suivant : 7% de B pendant 5 minutes, augmentation de la quantité de B de 7% à 70% en 183 minutes, 70 à 100% de B en 5 minutes puis retour à 7% de B. Le débit est paramétré à 300

nl.min^{-1} auquel s'ajoute la matrice CHCA (Acide α-cyano-4-hydroxy cinnamique à 5 mg.ml^{-1}) au débit de 1,2 μl.min^{-1}. Les fractions de 30 secondes sont déposées automatiquement sur une cible Opti-TOF# 384 spots par un AccuSpot (Shimadzu).

2.5 Spectrométrie de masse

2.5.1 nLC-ESI-orbiTRAP

L'analyse par spectrométrie de masse à ionisation de type électrospray (ESI-MS/MS) permet d'analyser la diversité en peptides de faible masse moléculaire des hydrolysats de protéines. Pour l'optimisation de cette analyse, les échantillons ont été concentrés. Les extraits peptidiques réalisés à partir des différents hydrolysats ont été chargés sur une colonne SepPak C18 (Waters) puis élués par un mélange ACN/eau/TFA (20%/79,9%/0,1%, v/v/v). Après évaporation au speed vac, les échantillons sont concentrés sur μC18 Omix (Varian). Le fractionnement chromatographique des extraits est réalisé sur un système Ultimate 3000 (Thermo Scientific) équipé d'une colonne Pepmap C18 (250 x 75 μm, 3 μm, Thermo Scientific). Les phases mobiles utilisées sont composées respectivement d'acide acétique (AcOH) 0,1% et d'un mélange eau/ACN/AcOH (20/79,9/0,1 ; v/v/v). Le nano-débit est fixé à 300 nl.min^{-1} et le profil du gradient est défini comme suit : 0,5% d'ACN par minute, de 0 à 30% d'ACN. L'analyse en spectrométrie de masse est conduite sur un LTQ-Orbitrap Discovery (ThermoFisher) entre 200 et 1000 m/z.

2.5.2 MALDI-TOF/TOF

Les spectres de fragmentation des peptides composant les hydrolysats de krill, sont réalisés en spectrométrie de masse de type désorption-ionisation laser assistée par matrice couplé à un analyseur temps de vol (MALDI-TOF/TOF) sur la plateforme PROTEOGEN au moyen d'un AB Sciex 5800 équipé d'un laser OptiBeam. Le système est calibré avant chaque analyse avec une solution contenant de la des-Arg-Bradykinine, de l'Angiotensine-I, de la Glu1-Fibrinopeptide B, de l'ACTH (18-39) et de l'ACTH (7-38). La précision de masse est de l'ordre de 50 ppm. Les spectres MS sont acquis en mode réflectron par compilation de 1000 (5 x 200) spectres dans la

gamme de masse 800-4000 Da. L'intensité du laser est de 3200. Les spectres MS/MS sont acquis en mode réflectron positif par compilation de 2500 (10 x 250) spectres sous une intensité laser de 3900. Ils permettent l'identification des peptides grâce au logiciel Mascot associé aux banques de données transcriptomiques.

2.6 Détermination des indices de quantité et de diversité en peptide dans les hydrolysats

Pour l'analyse des indices de quantité et de diversité des peptides, le seuil de 1000 Da (peptides de moins de 10 AA) a été défini. Ils constituent la fraction la plus couramment trouvée dans les hydrolysats de protéines aquatique et la plus performante pour le poisson en terme d'appétence, de nutrition et de santé [Cahu *et al.*, 1999, Refstie *et al.*, 2004, Choi *et al.*, 2009, Khosravi *et al.*, 2015a, Khosravi *et al.*, 2017].

L'indice quantitatif (**iQuant**) représente l'abondance en peptides de moins de 1000 Da dans l'hydrolysat. Il est basé sur l'intégration de l'aire sous la courbe extraite des valeurs du chromatogramme d'exclusion stérique (**Equation 2.1**).

$$iQuant = 100 \times \frac{\text{aire des peptides inférieurs à 1000 Da}}{\text{aire totale}} \tag{2.1}$$

2.1 – Calcul de l'iQuant des hydrolysats (en %).

L'indice qualitatif (**iQual**) représente la diversité en peptides de moins de 1000 Da dans l'hydrolysat. Pour le calcul de cet indice, les valeurs en duplicat des masses mesurées sont supprimées de l'analyse (± 0,01 Da). iQual est basé sur les valeurs des « peak list » obtenues à l'issue des séparations par nLC-ESI-orbiTRAP. Ce type d'ionisation génère des ions multichargés. Il est indispensable de prendre en compte ce paramètre lors de l'analyse d'iQual. Les « peak list » se composent d'une suite de masse (m) détectées associées à un nombre de charge (z).

Pour connaitre la masse réelle mesurée, il est nécessaire de multiplier la masse par le nombre de charge et de soustraire 1 Da à la masse totale par charge (**Equations 2.2** et **2.3**).

$$\text{masse réelle mesurée} = (m \times z) - z \tag{2.2}$$

2.2 – Calcul des masses réelles mesurées (en Da).

$$iQual = 100 \times \frac{\text{nombre de masses réelles mesurées inférieures à 1000 Da}}{\text{nombre total de masses mesurées}} \tag{2.3}$$

2.3 – Calcul de l'iQual des hydrolysats (en %).

2.7 Dégradation d'Edman

Cette méthode permet d'identifier la séquence primaire N-terminale d'un peptide purifié. Elle est utilisée pour l'identification du peptide myotrope de l'hydrolysat de crevettes. Elle est réalisée sur un micro-séquenceur Protein Sequencing System Model 494 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) couplé à un analyseur d'acides aminés PTH Model 140 (Perkin Elmer - Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA) à la plateforme PISSARO de l'université de Rouen. les peptides lyophilisés sont repris dans 30 μl d'une solution d'acétonitrile à 20% et 1% de TFA. Quinze μL d'échantillon sont déposés sur « Biobrene » pré-conditionné sur un disque en fibre de verre. Le disque contenant le peptide est ensuite intégré dans l'appareil pour analyse et le nombre de cycles d'Edman est fonction du nombre de résidus souhaités. Dans notre cas, 6 cycles. Après avoir déterminé la séquence en acides aminés, une recherche d'homologie avec les séquences protéiques présentes dans les banques de données est réalisée par le biais des outils bio-informatiques.

2.8 Identification des peptides

Les séquences des peptides myotropes candidats obtenues par dégradation d'Edman sont confirmées en comparant les profils de fragmentations basés sur l'occurrence des ions y, b et a obtenus par rpHPLC-ESI-MS^2 et les tables théoriques des peptides candidats obtenues avec Protein Prospector (http ://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi ?form=msproduct).

Une analyse *in silico* est réalisée ensuite pour identifier les séquences des peptides candidats. Le logiciel Peptraq [Zatylny-Gaudin *et al.*, 2016] est utilisé pour rechercher les motifs des peptides candidats dans une base de données transcriptomique annotée de *Litopenaeus vannamei* [Robert *et al.*, 2014].

3 Caractérisation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines d'origine aquatique chez le bar européen – approche *in vivo*

3.1 Autorisations réglementaires

Toutes les expériences menées chez le bar européen ont été réalisées selon les lois Françaises et Européennes (article 13 de 86/609/EU) après autorisation du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (APAFIS# 3087), du comité Comité d'Éthique Normandie en Matière d'Expérimentation Animale (numéro d'agrément 54), du comité d'éthique et de l'expérimentation animale interne de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) et du Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (permis 7962).

3.2 Tests de conditionnement alimentaire chez bar européen

3.2.1 Essai zootechnique réalisé à la station expérimentale IRTA (Espagne)

Le premier essai de conditionnement alimentaire a été conduit dans les structures d'élevage de l'IRTA (San Carles de la Rapita, Espagne). L'objectif de cet essai était

d'étudier l'impact des hydrolysats de crevette et de tilapia sur les performances de croissance, l'intégrité du tube digestif ainsi que la régulation transcriptomique de l'intestin, du foie et du rein avant et après challenge bactérien chez le bar européen.

Les juvéniles de bar (poids moyen = 2,0 ± 0.2 g) fournis par la pisciculture Marina Mediterránea SL (Andromeda Group, Burriana, Valencia, Espagne) sont nourris avec un aliment commercial (OptibassL-2, Skretting, Espagne ; 48,5% de protéines, 16 % de lipides, 3,7 % de fibres, 6,4 % de cendres) pendant 2 semaines pour la phase d'acclimatation. Les poissons sont ensuite répartis aléatoirement dans des bassins circulaires en fibre de verre de 500 L à une densité initiale de 0,4 $kg.m^{-3}$ (100 poissons par bassin).

Cing régimes alimentaires (4 réplicats par régime) ont été testés : un aliment contrôle positif contenant 20% de FP (FM20), un aliment contrôle négatif contenant 5% FP (FM5), 3 aliment contenant 5% FP supplémentés avec 5% d'hydrolysat de tilapia (FM5 + 5% TH), de crevette (FM5 + 5% SH) ou d'un mélange des 2 hydrolysats 50/50 (FM5 + 5% MH). La composition des régimes alimentaires est fournie dans le **tableau 18**.

Avant le conditionnement alimentaire, les poissons sont pesés individuellement et la longueur standard (SL) mesurée (poids moyen = 2,2 ± 0,0 g ; SL = 5,1 ± 0,0 cm). Pendant la phase de nourrissage, la température et le pH de l'eau (pHmètre 507, Crison Instruments), la salinité (MASTER-20T, ATAGO Co. Ltd) et l'O_2 dissout (OXI330, Crison Instruments) sont régulés à de 23,2 ± 0,5 °C, 7,5 ± 0,2, 35,8 ± 0,3 ppm et 6,2 ± 1,2 $mg.L^{-1}$. Le débit d'eau dans les bassins est maintenu à environ 9,0 $L.min^{-1}$ au moyen d'un système de recirculation (IRTAmar®) qui maintient une qualité d'eau optimale (ammoniaque : 0,08 ± 0,04 ppm, nitrites : 0,032 ± 0,02 ppm) grâce à une filtration mécanique et biologique associée à une irradiation ultraviolet (UV). La photopériode suit les changements naturels saisonniers (février - avril, latitude 40°37'41'N). Les poissons sont nourris pendant 62 jours, en excès, 6 fois par jour à l'aide de distributeurs automatiques ARVO-TEC T Drum 2000TM (Arvotec, Finland) au taux de 4,5% de la biomasse. Après 31 jours d'expériementation, cinquante poissons par bassin sont pesés pour ajuster la ration de nourrissage.

Tableau 18 – Composition des régimes alimentaires (essai IRTA).

	FM5	FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
Matières premières					
Farine de poisson LT	5,0%	20,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Hydrolysat de tilapia	-	-	**5,0%**	-	**2,5%**
Hydrolysat de crevette	-	-	-	**5,0%**	**2,5%**
Farine de gluten de maïs	17,0%	11,0%	15,0%	15,0%	15,0%
Farine de gluten de blé	19,7%	14,0%	18,9%	18,9%	18,9%
Farine de colza	11,1%	7,0%	9,0%	9,0%	9,0%
Farine de soja 48% CP	17,0%	14,8%	15,0%	15,0%	15,0%
Farine de blé	10,0%	16,0%	12,8%	12,8%	12,8%
DL-Méthionine	0,6%	0,4%	0,5%	0,5%	0,5%
Monochlorhydrate de L-Lysine	1,6%	1,0%	1,4%	1,4%	1,4%
Phosphate de calcium	2,5%	1,2%	2,1%	2,1%	2,1%
Huile de poisson (inclusion)	3,2%	2,3%	2,9%	2,9%	2,9%
Huile de poisson (enrobage)	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Vitamines et minéraux (prémix)	2,3%	2,3%	2,3%	2,3%	2,3%
Composition proximale (% du produit)					
Humidité	7,5%	8,8%	9,5%	8,4%	7,1%
Protéines brutes (N × 6,25)	41,4%	44,6%	42,0%	42,9%	43,2%
Lipides	19,5%	18,8%	19,0%	19,1%	20,1%
Cendres	2,3%	5,7%	5,1%	5,2%	5,2%
Énergie (Kcal/g)	5,1	5,4	5,2	5,2	5,2

Abréviations : FM : farine de poisson, TH : hydrolysat de tilapia, SH : hydrolysat de crevette, MH : mélange d'hydrolysats, LT : basse température, CP : protéines crues, N : azote.

À la fin du conditionnement alimentaire (jour 62), après une période de jeûne de 24 heures, le poids et la SL individuels sont mesurés pour tous les poissons. Durant la manipulation et les pesées, les poissons sont anesthésiés avec 50 mg.L^{-1} de MS-222 (Sigma Aldrich, Saint-Louis, EU). A l'issue du test de conditionnement alimentaire, les poissons sont euthanasiés par surdosage de MS-222 (100 mg.L^{-1}). Le taux de croissance spécifique (SGR pour « Specific Growth rate »), le facteur de condition Fulton (K) et le taux de survie (SR pour « Survival Rate ») sont calculés selon les **équations 3.1**, **3.2** et **3.3**.

$$SGR = 100 \times \frac{\ln(\text{poids final}) - \ln(\text{poids initial})}{\text{durée}} \tag{3.1}$$

3.1 – Taux spécifique de croissance. Le SGR s'exprime en % de poids par jour.

$$K = 100 \times \frac{\text{poids}}{\text{longueur}^3} \tag{3.2}$$

3.2 – Facteur de condition Fulton.

$$SR = 100 \times \frac{\text{nombre de poissons vivants à l'issue du conditionnement}}{\text{nombre initial de poissons}} \tag{3.3}$$

3.3 – Taux de survie. Le taux de survie s'exprime en pourcentage.

Les analyses transcriptomiques sont réalisées à partir d'un échantillonnage d'organes provenant de trois poissons (12 par régime) choisis aléatoirement dans chaque bassin. La partie proximale de l'intestin, le foie et les reins sont prélevés sur lit de glace et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des acides ribonucléiques (ARN).

L'extrémité proximale de l'intestin de cinq poissons (quinze poissons par régime) est également prélevée et conservée dans un tampon phosphate-formaldéhyde à 10% pour l'analyse histologique.

3.2.2 Essai zootechnique réalisé à la station expérimentale d'IFREMER (Brest)

Un deuxième conditionnement alimentaire d'une durée de 46 jours a été réalisé dans les structures d'élevage du laboratoire PFOM-ARN au centre de l'Institut Français de Recherche pour l'Éxploitation de la Mer (IFREMER) de Brest. L'objectif de cette étude portait les propriétés myotropes des hydrolysats de crevette et de *Gadidae* chez le bar européen.

Quarante juvéniles de bars (poids initial de 10,3 ±0,0 g) sont répartis aléatoirement dans chacun des 24 bassins de 80 L correspondant à 8 régimes testés et 3 réplicats par régime. L'eau de mer (salinité : 35 $g.L^{-1}$) est filtrée (filtre à sable à haute pression) et thermo-régulée (20±1°C) sans recirculation (« eau perdue »).

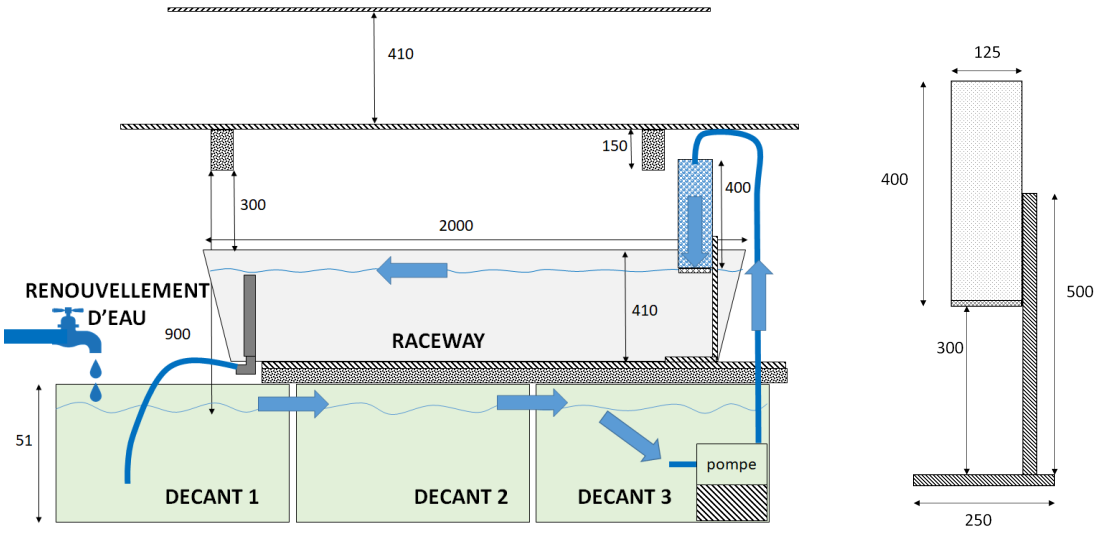
L'application d'une photopériode décalée (12 h de lumière et 12 h d'obscurité, à partir de 2 heures du matin) permet au personnel technique de collecter les fèces pendant les heures ouvrées. Les poissons sont nourris avec un distributeur automatique (Arvotec, Finlande) avec une ration alimentaire fixée à de 3% de la biomasse par jour, et un taux de conversion de l'aliment établi à 1,0 durant tout le test de conditionnement. L'ajustement de la ration quotidienne est pilotée par le logiciel du distributeur automatique de nourriture (Arvotec). Les régimes alimentaires consistaient en, un aliment contrôle positif contenant 20% de FP (FM20), un aliment contrôle négatif contenant 5% FP (FM5), 6 aliments contenant 5% FP supplémentés avec 1%, 5% et 10% d'un hydrolysat de crevette (FM5 + 1% SH, FM5 + 5%SH, FM5 + 10% SH) ou 1%, 5% et 10% d'un hydrolysat de *Gadidae* (FM5 + 1% FH, FM5 + 5%FH, FM5 + 10% FH). La composition des régimes alimentaires est fournie dans le **tableau 19**.

Tableau 19 – Composition des régimes alimentaires (essai IFREMER de Brest).

	FM20	FM5	FM5 + 1% SH	FM5 + 5% SH	FM5 + 10% SH	FM5 + 1% FH	FM5 + 5% FH	FM5 + 10% FH
Matière première								
Farine de poisson premium (67% protéines)	9,73	-	-	-	-	-	-	-
Farine de poisson standard (65% protéines)	10,28	5,04	5,04	5,04	5,04	5,04	5,04	5,04
Hydrolysat de crevette	-	-	**1,00**	**5,00**	**10,00**	-	-	-
Hydrolysat de *Gadidae*	-	-	-	-	-	1,00	5,00	10,00
Farine de gluten de maïs	11,47	16,64	15,98	15,15	14,11	15,98	15,15	14,11
Farine de gluten de blé	14,45	21,04	20,19	19,14	17,83	20,19	19,14	17,83
Farine de colza	9,50	10,45	10,06	9,57	8,96	10,06	9,57	8,96
Tourteau de soja	12,72	14,98	14,41	13,67	12,81	14,41	13,67	12,81
Blé dépélicullé	12,45	10,30	9,94	9,50	8,94	9,94	9,50	8,94
DL-Méthionine	0,35	0,54	0,52	0,49	0,46	0,52	0,49	0,46
Monochlorhydrate de L-Lysine	1,03	1,60	1,54	1,46	1,36	1,54	1,46	1,36
Phosphate de calcium	1,68	2,61	2,51	2,37	2,21	2,51	2,37	2,21
Huile de poisson (inclusion)	14,55	15,29	15,21	15,01	14,7	15,21	15,01	14,7
Vitamines et minéraux (prémix)	1,10	1,10	1,10	1,10	1,1	1,10	1,10	1,1
Cellulose	0,7	0,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Composition proximale								
Humidité (%)	8,05	8,68	8,23	8,78	9,38	8,23	8,78	9,38
Protéines brutes (N × 6,25%)	45,67	45,23	45,32	45,72	45,54	45,32	45,72	45,54
Lipides (%)	15,51	15,25	15,6	15,52	16,45	15,6	15,52	16,45
Cendres (%)	6,56	6,27	6,25	6,48	6,47	6,25	6,48	6,47
Énergie (Kcal/g)	5,05	5,03	5,03	4,99	4,94	5,03	4,99	4,94

FM : farine de poisson, SH : hydrolysat de crevette, FH : hydrolysat de poisson, N : azote.

Le test zootechnique comporte deux étapes. Dans un premier temps les poissons sont conditionnés avec les différents régimes alimentaires pendant 32 jours. Ils sont nourris une fois par jour une heure après le début de la période diurne, pendant 45 à 60 minutes. La production des fèces est ensuite mesurée pendant deux périodes de 5 jours. Pendant cette phase, les poissons sont nourris une fois tous les deux jours une heure après le début de la période diurne pendant 45 à 60 minutes. Les fèces sont collectés pendant 15 heures après le nourrissage, grâce à un tamis placé sous la sortie d'eau, puis regroupés, pesés et congelés (un contenant par bassin). Durant la manipulation et les pesées, les poissons sont anesthésiés avec du MS-222 (50 $mg.L^{-1}$). A l'issue du test de conditionnement, les poissons sont euthanasiés par surdosage de MS-222 (100 $mg.L^{-1}$).



(a) Système semi-ouvert. (b) Colonne de dégazage.

FIGURE 27 – Bassins de la station marine de Luc-sur-mer. **(a)** système semi-ouvert mis en place. La colonne de dégazage mise au point est indiquée en bleu. **(b)** Détail de la colonne de dégazage. La colonne est remplie de capuchons en plastique permettant de réaliser un écoulement laminaire de l'eau qui conduit à un dégazage après pompage.

4 Caractérisation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines d'origine aquatique chez le bar européen – approche *in vitro*

4.1 Aménagement de la station marine de Luc-sur-Mer

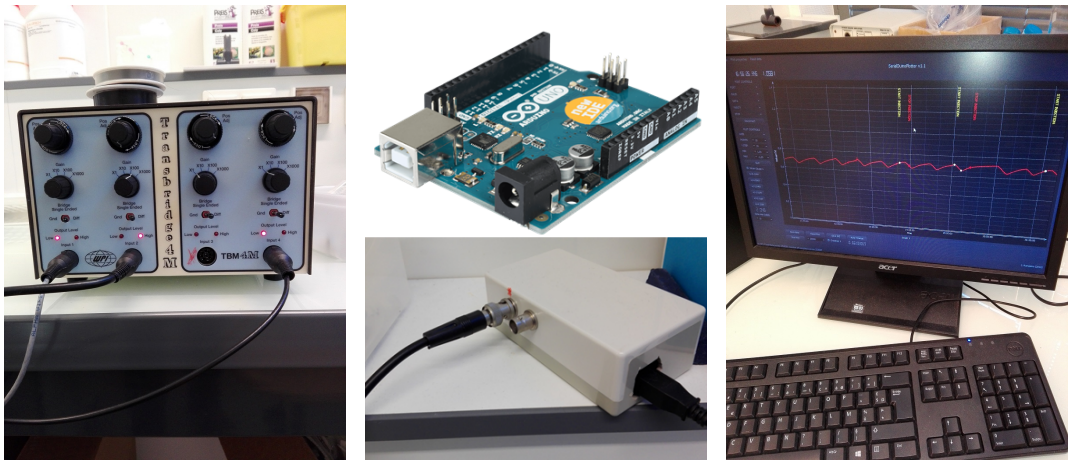
Afin d'accueillir les bars européens à la station marine de Luc-sur-mer, deux bassins spécifiques sont mis en place. La **Figure 27** (ci-contre) présente l'installation en circuit semi ouvert des bassins ainsi que le détail de la colonne de dégazage fabriquée par la cellule technique du laboratoire BOREA.

Les poissons sont maintenus dans des bassins de 300 L à une température de 15 $\pm 1°$ C à la station marine de Luc-sur-Mer (Université de Caen Normandie) et selon la photopériode naturelle. Il s'agit d'un système semi-ouvert (50 $L.min^{-1}$ pour la pompe de recirculation et 10 $L.h^{-1}$ pour le renouvellement d'eau). Les poissons sont nourris *ad libidum* deux fois par jour avec un aliment commercial (BN-NATURE, Le Gouessant, Lamballe, France) selon les tables de nourrissage fournies par le fabriquant d'aliment. Les poissons sont laissés à jeûn 24 heures avant le prélèvement de tissus. L'extrémité proximale de l'intestin des poissons est disséquée et immédiatement installée dans la chambre perfusée pour réaliser les tests d'activité myotrope.

Le jeûne des poissons en aquarium, la dissection de l'intestin et le test myotrope sont réalisés dans une salle thermorégulée à 18°C. Les poissons sont euthanasiés par surdose de MS-222 (100 mg.L^{-1}).

4.2 Système d'enregistrement des contractions de l'intestin *in vitro*

En collaboration avec le docteur Jimmy Rangama du Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique (CEA/DSM/IRAMIS – CNRS/INP – ENSICAEN – Université de Caen Normandie), un système d'enregistrement et de visualisation des contractions de l'intestin a été mis au point. Le système est basé sur un micro-contrôleur Arduino® (https ://www.arduino.cc). L'interface du traceur a été programmée avec l'interface Qt (https ://www.qt.io). Le logiciel permet à la fois de générer un fichier tabulé des valeurs mesurées par le capteur de force en temps réel mais également d'annoter le fichier (**Figure 28**).



(a) Amplificateur. (b) Arduino. (c) Traceur

FIGURE 28 – Système d'enregistrement des contractions de l'intestin *in vitro*. **(a)** Amplificateur multi-voies. **(b)** Micro-contrôleur Arduino et module externe de branchement. **(c)** Traceur permettant la visualisation des contractions.

Les tests myotropes sont réalisés sur la partie antérieure de l'intestin des bars. Une section longue d'un centimètre située juste après les *caeca* piloriques est suspendue à un dynamomètre (UF1 force sensor, LCM Systems, Newport, Isle of Wight, United Kingdom) dans une chambre de 5 mL, au moyen d'un fil de nylon de 0,12 mm

de diamètre. La tension du fil est calibrée à une valeur initiale correspondant à 1V [1]. Le signal du capteur de force est transmis à l'aide d'un amplificateur TB4M (World Precision Instrument, Sarasota, Finlande) et les valeurs de tension sont tracées par une imprimante à rouleau L200E (Linseis, Trenton, NJ, USA) ou affichées sur ordinateur par le système développé au sein du laboratoire. La chambre est perfusée à un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$ avec une solution de perfusion à 340 mOsm (glucose à 1mM, Sigma Aldrich ; 9,945$g.L^{-1}$ d'Instant Ocean, Aquarium system, Sarrebourg, France) maintenue à 18°C. Les fractions HPLC et les peptides synthétiques sont injectés dans le flux de perfusion au moyen d'une valve 3-voies afin d'éviter tout stress mécanique. Chaque expérience est réalisée au minimum en triplicat.

1. 1V = 4,16 g

5 Caractérisation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines d'origine aquatique chez le bar européen – Analyses des prélèvement de tissus

5.1 Histologie

Lors du test de conditionnement alimentaire réalisé à l'IRTA, l'organisation tissulaire de l'intestin proximal a été analysée en réponse aux différents régimes alimentaires.

Après fixation dans tampon phosphate-formaldéhyde à 10% au moment du prélèvement, les échantillons d'intestins issus de l'essai mené à l'IRTA sont déshydratés dans une série alcoolique, rincés dans du xylène, parafinés (Histolab ZX-60 Myr, Medical Specialties MYR SL) et coupés en série de 2-3 μm d'épaisseur (HM Microm, Leica Microsystems Nussloch). Les sections sont colorées à l'Hématoxine-Éosine pour la description générale histologique, tandis que les lames sont colorées à l'acide périodique de Schiff (PAS) et au bleu Alcian (AB) à différents pH (1,0 et 2,5) pour mettre en évidence les différents types de mucines produites par les cellules caliciformes. Le PAS colore en magenta les mucines neutres produites par les cellules calciformes intestinales alors que le AB colore légèrement les glycoconjugés sulphatés ionisés (pH = 1,0) et l'acide sialique (pH = 2,5). Toutes les sections sont observées sous un microscope optique (Leica DM LB, Leica Microsystems) et photographiées (Olympus

DP70 Digital Camera, Olympus Imaging Europa GmbH). Les images sont analysées par la suite logicielle ANALYSIS (Soft Imaging Systems GmbH). Le comptage du nombre total de cellules caliciformes (pleines et vides) et la mesure de la hauteur des *villi* sont basés sur l'analyse de 8 à 10 champs choisis aléatoirement au niveau de la muqueuse intestinale de 15 poissons pour chaque régime. Le comptage des cellules calciformes dans les *villi* intestinaux est exprimé par unité de 100 μm, tandis que la hauteur des *villi* et l'épaisseur ont été calculées selon la méthode de Escaffre et al. (2007).

5.2 Extraction des ARN totaux

Lors du test de conditionnement alimentaire réalisé à l'IRTA, l'expression des gènes de l'intestin, du foie et du rein a été analysée par une technique en RNA-seq (Illumina). Les ARN totaux du foie, du rein et de la partie proximale de l'intestin de trois poissons sont extraits séparément pour chaque bassin. Les organes sont broyés (Mini-Beadbeater, Biospec Products Inc., USA) dans 1 ml de TRIzol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et l'extraction est réalisée selon les recommendations du fabricant. Les concentrations en ARN totaux sont déterminées au moyen d'un dosage spectrophotométrique (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et la qualité et l'intégrité des ARN totaux sont vérifiées à partir du ratio des absorbances à 260 et 280 nm et par gel d'électrophorèse, respectivement. Les échantillons d'un même bassin sont alors poolés avant de générer les banques d'ADN complementaire (ADNc) pour ainsi obtenir 3 banques d'ADNc par régime alimentaire.

5.3 Séquençage Illumina

5.3.1 Préparation des banques d'ADNc

Les banques d'ADNc sont préparées au moyen d'un kit Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Part# 15008136 Rev. A, Illumina Inc ; San Diego, CA, USA), selon le protocole du fabricant à partir d'un μg d'ARN totaux par échantillon. En résumé, les ARN messagers-poly-(A) sont purifiés à l'aide de billes ma-

gnétiques oligo dT (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) et sont rétro-transcrits en ADNc au moyen du kit SuperscriptII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le second brin d'ADNc est ensuite synthétisé. Les ADNc double brin sont clivés en fragments de 300 paires de bases à l'aide d'un sonicateur Covaris S220 (Covaris Inc., Woburn, MA, USA) *(duty cycle 5%, intensity 3, 200 bursts per second, duration 50 s)*. Des adaptateurs permettant d'identifier chaque échantillon sont ajoutés aux fragments d'ADNc double brin et une réaction de polymérisation en chaine est réalisée pour amplifier les ADNc dans la banque. La qualité des ADN de la banque est testée avec une Tape station 2200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) et les concentrations en ADN sont mesurées à l'aide d'un Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Enfin, 18 librairies différentes d'ADNc sont chargées dans les canaux de la flow cell (Illumina Inc) à une concentration de 8 pM par ligne. Le séquençage en mode de lecture pairée à 150 paires de bases est réalisé sur des séquenceurs Illumina Miseq et Nextseq à la plateforme SÉSAME du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse à Caen.

5.3.2 Analyse bioinformatique

L'analyse bioinformatique est réalisée à partir des données de séquençage provenant de la partie antérieure de l'intestin, du foie et du rein prélevés chez le bar européen soumis à différents régimes alimentaires lors d'un essai zootechnique mené à l'IRTA. L'objectif de ces prélèvements était d'étudier la réponse sur le plan quantitatif du transcriptome intestinal, rénal et hépatique face à la réduction du ratio de FP, dans un premier temps, puis à l'inclusion d'hydrolysats de protéines dans les régimes pauvres en FP, dans un deuxième temps. Pour rappel, les régimes alimentaires testés sont : FM5 (5% de FP : contrôle négatif), FM20 (20% FP, contrôle positif) et le régime appauvri en FP FM5 supplémenté avec 5% d'hydrolysat de tilapia (TH), de crevette (SH) ou du mélange (MH) [1].

5.3.3 Génération du transcriptome

Les données brutes de séquençage sont filtrées et nettoyées en utilisant les paramètres suivants : *ILLUMINACLIP :adapter.fa :2 :30 :10 LEADING :5 TRAI-*

1. Cf Tableau 18 page 105

LING :5 SLIDINGWINDOW :4 :5 MINLEN :25. La qualité globale des séquences est vérifiée avec FastQC (v 0.11.3). L'asssemblage global est mené avec Trinity 2.1.1. Une étape de normalisation est conduite selon la couverture en kmer (*kmer de 25 nucléotides, couverture maximale de 30*). Les contigs inconsistants générés par Trinity sont retirés après le ré-alignement des lectures avec Bowtie (v 1.1.2), et l'estimation de l'abondance relative est réalisée avec RSEM (v 1.2.22) pour déterminer les valeurs de FPKM (pour « Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped ». Les deux logiciels sont lancés avec des scripts d'encapsulation *perl* fournis avec le paquetage Trinity. Enfin, seuls les transcrits ayant des valeurs de FPKM supérieures à 1 et dont les isoformes représentent plus de 1% au sein de l'unigène sont conservés.

5.3.4 Annotation des transcrits

Les annotations des contigs sont réalisées en utilisant le workflow Trinotate (http ://trinotate.github.io), selon [Haas *et al.*, 2013]. Les séquences sont alignées avec le logiciel BLAST contre la base de données NCBI nr (release 193) avec les paramètres suivants : *max BLAST hits 20, min Expect Value* 10^{-3} et contre la base de données du protéome humain Ensembl (release 82) (BLASTX). Seuls les résultats avec des E-values inférieures à 0,001 sont conservés. La prédiction de peptide est réalisée avec Transdecoder. La recherche de similarité (blastp des peptides prédits par Transcoder) est réalisée contre la base de données uniprot-swissprot (release 2015-05). La prédiction de peptide signal est réalisée avec signalP v4.1. La détection de peptides transmembranaires est réalisée avec TMHMM v2.0c. La recherche de domaines protéiques est réalisée avec hmmscan de la suite logicielle hmmer v.3.1b1 contre la base de donnée Pfam-A.

Enfin, l'annotation fonctionnelle du transcriptome est réalisée avec le workflow Trinotate. La classification Gene Ontology (GO) des protéines prédites est réalisée à partir des résultats BLASTX (*E-Value hit :* 10^{-6}*, annotation cut-off : 55, GO weight : 5*). L'annotation Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) des transcrits est basée sur les meilleurs résultats des recherches BLASTX et PFAM.

5.3.5 Analyse de l'expression différentielle

L'analyse de l'expression différentielle des gènes entre les régimes alimentaires est réalisée avec le logiciel R et le paquetage DESeq2.

Les analyses multiples sont prises en compte en contrôlant les FDR (« false discovery rate ») à 5% avec la procédure de Benjamini-Hochberg. Les ARN cibles avec des P-values ajustées inférieures à 0,2 et des différences d'expression d'un facteur $\geq$1,4 (FC) étaient considérés comme différentiellement exprimés pour l'intestin. Ces paramètres de filtrage sont conformes avec les autres études d'impact des régimes alimentaires sur l'expression différentielle de gènes de l'intestin [Król *et al.*, 2016]. Lors de nos travaux sur le foie, les conditions de filtrage étaient différentes ($p-adj < 0,1$ et $FC > |2|$). Ces seuils ont également été déterminés en ce basant sur les différents études nutritionnelles portant sur la régulation transcriptomique du foie. Le seuil de FC est usuellement fixé à 2. Les seuils filtrage des valeurs de p-adj différent, quant à eux, beaucoup en fonction des études nutritionnelles et se situent entre 0,001 et 0,2 [Martin *et al.*, 2010, Overturf *et al.*, 2012].

Afin d'étudier les annotations GO des gènes différentiellement exprimés dans le foie, une analyse d'enrichissement GO a été réalisée avec le paquetage GOseq du logiciel R [Young *et al.*, 2010]. Les catégories fonctionnelles avec une $P-value < 0,05$ ont été considérées comme significativement enrichies au sein des gènes différentiellement exprimés.

L'impact des régimes alimentaires contenant des hydrolysats de protéines sur les voies de signalisation est suivi avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis software (Qiagen, Hilden, Germany) avec les paramètres standards. Tous les gènes différentiellement exprimés annotés sont utilisés. Pour l'analyse sur le foie, seules les voies métaboliques ayant obtenues un z-score supérieur à |2| sont considérées comme régulées. Une valeur de z-score positive témoigne d'une activation et une valeur négative d'une inhibition de la voie métabolique.

6 Analyses statistiques des résultats

Pour la caractérisation structurale des hydrolysats, les valeurs d'iQuant et d'iQual sont exprimées comme la moyenne ± l'écart-type.

Pour les tests de conditionnement alimentaire, les résultats des analyses de poids, longueur standard, de facteur de condition K, du taux de croissance des poissons, ainsi que de la taille des *villi* intestinaux, du nombre de cellules caliciformes, de la composition proximale des régimes alimentaires, du taux de survie et d'émission des fèces, sont exprimés comme la moyenne ± l'erreur moyenne. Les données sont traitées par une analyse de la variance à un facteur suivie d'un test de Tukey. Les valeurs mesurées sont considérées comme statistiquement différentes si $P < 0{,}05$.

Pour l'analyse de la comparaison des termes GO avec le logiciel WeGO, un test de Pearson Chi-Square est réalisé pour déterminer les différences significatives entre les régimes alimentaires ($P < 0{,}05$) [Ye *et al.*, 2006].

Troisième partie

Caractérisation structurale des hydrolysats de protéines : développement d'un outil d'analyse de la diversité et de l'abondance en peptides de faible masse moléculaire

1 Introduction

Pour le développement de la pisciculture et d'une alimentation durable, la recherche de nouveaux ingrédients capables de remplacer les FP dans les aliments aquacoles est devenue un objectif majeur. Les hydrolysats de co-produits aquatiques sont d'excellents produits de substitution car ils présentent des taux élevés de protéines hautement digestibles. De nombreuses études ont démontrés qu'un apport alimentaire en hydrolysat de protéines apporte un bénéfice sur la croissance des poissons [1] ainsi que sur le statut sanitaire [2] des poissons carnivores.

La performance du procédé d'hydrolyse peut être influencée par de nombreux paramètres (température, enzyme, durée) résultant sur des modifications des profils moléculaires [3] des peptides et protéines. Ces changements pourront impacter les performances fonctionnelles des hydrolysats, celles-ci étant directement liées aux paramètres structuraux (quantité, diversité) des peptides hydrolytiques.

Si les hydrolysats de protéines sont généralement caractérisés par leur DH, ce paramètre n'apportera aucune information sur le profil de masse moléculaire et la diversité en peptides. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode standardisée et normée pour l'analyse fine du profil peptidique d'hydrolysats complexes d'origine agroalimentaire. Certaines techniques comme l'électrophorèse sur gel en condition dénaturante ou la chromatographie liquide d'exclusion stérique sont utilisées en laboratoire mais ne permettent pas d'avoir une image très précise de la composition en peptides des hydrolysats. Il est donc indispensable de développer des outils plus discriminants permettant de visualiser les différences structurales des hydrolysats dans le but de mieux contrôler la standardisation du process de fabrication des hydrolysats ainsi que de pouvoir relier les performances fonctionnelles de l'hydrolysat

1. Cf « Bénéfices nutritionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique », page 59.
2. Cf « Bénéfices fonctionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique », page 60.
3. Cf « L'hydrolyse des protéines », Figure 11 page 56.

de protéines au profil moléculaire des peptides.

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'outil méthodologique d'analyse des hydrolysats de protéines développés au cours de ces travaux de thèse. Cette méthodologie a pour but de permettre la comparaison des paramètres structuraux (abondance et diversité des peptides) d'hydrolysats de protéines de différentes origines (matière première) et ayant subi des process de fabrication différents.

2 Démarche expérimentale

2.1 Hydrolysats de protéines

Pour le développement de cette méthodologie, nous avons utilisé un large panel d'hydrolysats de protéines différant par :

- l'origine de la matière première : céphalothorax de crevettes (*Litopenaeus vannamei*), viscères de thon (*Katsuwonus pelamis*), têtes et arêtes de saumon (*Salmo salar*), ou de différentes espèces *Gadidae* ou de tilapia (*Oreochromis niloticus*), têtes et viscères de calmar (*Illex argentinus*), krills entiers (*Euphausia superba*).

- le procédé appliqué (spécifications et dose d'enzyme, traitement thermique) et par la forme galénique (poudre, liquide ou concentré).

2.2 Caractérisation structurale des hydrolysats de protéines

La première étape du développement de la méthodologie consiste en une **normalisation** des hydrolysats basée sur un dosage spectrophotométrie UV à 214 nm suivi d'une dilution à une unité d'absorbance (1 UA_{214nm}). En effet, la spectrométrie UV permet une quantification linéaire des échantillons. Elle se base sur la **loi de Beer-Lambert** (**Équation 2.1**).

$$A = \varepsilon \times L \times C \tag{2.1}$$

2.1 – Equation de Beer-Lambert. A : Absorbance. ε : Coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ L : Longueur du trajet optique en cm. C : Concentration en $mol.L^{-1}$.

Si la loi de Beer-Lambert est utilisée pour le dosage de solutions pures (ε unique), nous avons considéré que tous les hydrolysats dilués à 1 UA_{214nm} avaient le même coefficient d'extinction molaire.

Nous avons choisi de doser les peptides à une longueur d'onde de **214 nm** car elle correspond à l'absorbance maximale de la **liaison peptidique** et permet de s'affranchir de la composition en acides aminés des hydrolysats. A l'inverse, la méthode au bleu de Coomacie n'est pas indiquée pour le dosage des peptides de faible masse moléculaire. En effet, le bleu de Coomacie ne se fixe que sur les acides aminés aromatiques (F, H, W et Y). Ce dosage est donc plus indiqué pour le dosage des protéines totales car elles présentent moins de variation dans le ratio des AA aromatiques *versus* non aromatiques. Les hydrolysats dosés à 214 nm sont ensuite dilués à 1 UA. Un volume constant d'hydrolysat dilué est ensuite concentré sur SepPak C18 puis séché. Les quantités finales de peptides sont exprimées en équivalent X ml à 1 UA. Ainsi, tous les échantillons normalisés de 50 ml à 1 UA contiendront la **même quantité de peptides** indépendamment de leur conditionnement initial (poudre, liquide ou concentré).

Après cette étape de normalisation, deux analyses de caractérisation de la structure des hydrolysats de protéines sont menées : l'analyse de l'**abondance** en peptides par **chromatographie liquide haute performance d'exclusion stérique** (HPLSEC) et l'analyse de la **diversité** en peptides par **chromatographie liquide en phase inverse en tandem avec la spectrométrie de masse de type électrospray** (rpHPLC-ESI-MS).

L'analyse en HPLSEC permet d'analyser les profils peptidiques des hydrolysats en les séparant **en fonction de leur masse moléculaire**. Cette technique a été utilisée pour analyser les peptides et les hydrolysats depuis de nombreuses années [Guérard *et al.*, 2001, Irvine, 2003] toutefois la disponibilité de nombreuses colonnes d'exclusion stérique aux spécifications très différentes, rend difficile la comparaison inter-laboratoire des données. Le temps de rétention des peptides dans la colonne est inversement proportionnel au logarithme décimal de leur masse moléculaire.

La phase mobile dans une moindre mesure, le débit et la température influencent les temps de rétention des peptides. Il est donc nécessaire de déterminer la relation entre le temps de rétention et la masse moléculaire au moyen de calibrants de masses

moléculaires connues adaptés aux spécifications de la colonne d'exclusion stérique retenue pour l'analyse. La **Figure 29** présente les données de calibration utilisées.

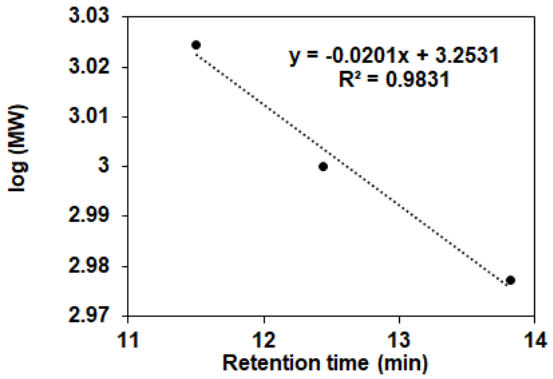


FIGURE 29 – Données de calibration de la colonne de HPLSEC utilisée.

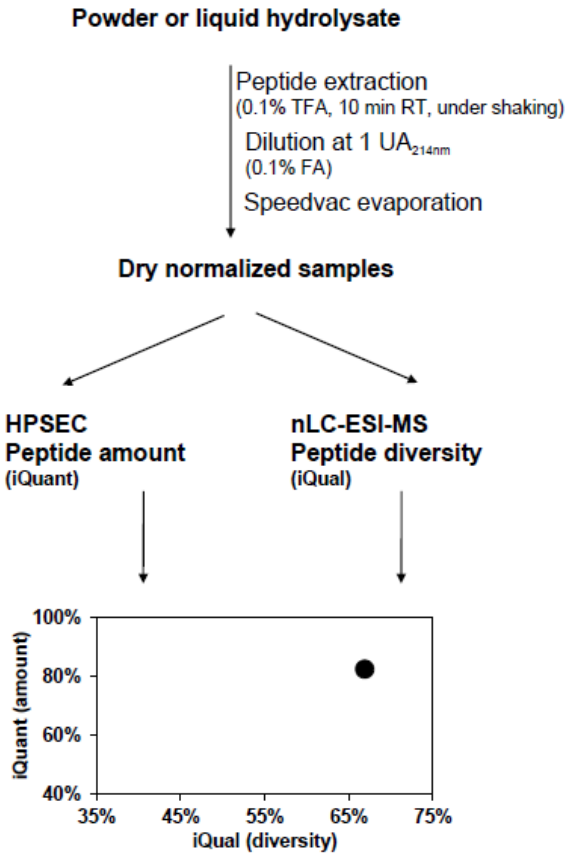
L'analyse de la diversité en peptides des hydrolysats de protéines par nLC-ESI-MS, une méthode de chromatographie liquide en tandem couplée à la spectrométrie de masse de type electrospray, est aujourd'hui utilisée pour identifier certaibs peptides dans les produits laitiers et céréaliers [Picariello *et al.*, 2012]. Mais à notre connaissance, elle n'a jamais été utilisée pour analyser des hydrolysats peptidiques complexes. L'analyse en nLC-ESI-MS est très sensible et permet de détecter peptides de masse moléculaire à partir de 100 Da à des quantités proches de la picomole [Arnott *et al.*, 1993].

2.3 Représentation des résultats de caractérisation structurale des hydrolysats de protéines

Pour représenter les résultats issus des analyses en HPLC et en spectrométrie de masse, nous avons choisi de les exprimer en fonction d'un seuil unique répondant à une question précise, plutôt qu'en classe de valeurs (gammes de masses pour la HPLSEC et gammes de m/z pour la spectrométrie de masse). Dans ces travaux de thèse, le choix a été fait de déterminer dans les hydrolysats de protéines, quelle était la proportion de peptides ayant une masse moléculaire inférieure à 1000 Da et quel était leur ratio dans la diversité. Cela permet d'obtenir un **score** en pourcentage du produit et de représenter graphiquement les résultats des hydrolysats dans un

diagramme à deux dimensions facilitant la comparaison des hydrolysats entre eux.

3 Résultats et discussion



La méthodologie développée pour la caractérisation structurale des hydrolysats de protéines a fait l'objet d'un article soumis dans *Food Chemistry* en 2018 intitulée : « A *standardized and efficient method to characterize the structure of aquatic protein hydrolysates* » .

Cet article présente la méthodologie de la normalisation des hydrolysats sous différents conditionnements (poudre/liquide/concentré), l'analyse structurale de la diversité en peptides par nLC-ESI-MS, l'abondance en peptide par HPLSEC ainsi que la représentation graphique bi-dimensionnelle des résultats permettant de comparer facilement les paramètres structuraux des hydrolysats. Les applications du développement de ce nouvel outil de caractérisation d'hydrolysats complexes de protéines sont :

- la vérification de la standardisation des produits fabriqués, d'un batch à l'autre,

- l'analyse et la compréhension des conséquences des modifications des conditions opératoires de l'hydrolyse sur les profils moléculaires des peptides générés,

- la corrélation des spécifications moléculaires des hydrolysats de protéines à la réponse des poissons lors de conditionnement alimentaire et de challenges environnementaux ou bactériens induits.

A standardized and efficient method to characterize the structure of aquatic protein hydrolysates

Alexandre LEDUC[a, b], Vincent FOURNIER[b] and **Joël HENRY[a]**

a: Normandy University, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 14032 Caen, France.
b: DianaAqua, Symrise Group, Elven, France.

Alexandre LEDUC: alexandre.leduc@unicean.fr

Vincent FOURNIER: vfournier@diana-aqua.com

Joël HENRY (Corresponding author): joel.henry@unicaen.fr

Highlights:
1) A method designed to characterize protein hydrolysate structure
2) Protein hydrolysates are characterized by peptide amounts and diversity
3) Protein hydrolysate structure is mapped in a 2D-diagram
4) The method can be used to improve product standardization
5) The method can be used to link hydrolysis processes and hydrolysate specifications

Abbreviations: ACN: acetonitrile, DH: degree of hydrolysis, ESI: electrospray ionization, FA: formic acid, HPLC: high performance liquid chromatography, HPSEC: high performance size exclusion chromatography, LMW: low molecular weight, MS: mass spectrometry, MW: molecular weight, n-LC: nano-liquid chromatography, SD: standard deviation, TFA: trifluoroacetic acid.

Abstract

We developed a fast and standardized method to characterize the profiles of low-molecular-weight peptides from manufactured protein hydrolysates. Standardization and performances of protein hydrolysates depend on peptide composition (amount, size, diversity) and strongly depend on raw materials and hydrolysis processes. The degree of hydrolysis permits to determine how the hydrolysis process is carried out, but it cannot be applied to manufactured hydrolysates.

Our method can characterize any kind of hydrolysate, whether solid or liquid, in terms of peptide amount and diversity by combining HPSEC and nLC-ESI-MS analytical tools. Low-molecular-weight peptide amounts and diversity are merged into 2D diagrams that allow for rapid comparisons among hydrolysates.

Keywords: Protein hydrolysate; hydrolysis process; peptide profile; HPSEC; nLC-ESI-MS/MS

1. Introduction

Interest for protein hydrolysates has been growing in the last decades. Whatever their origin (plants, marine animals, meat, milk, etc.), manufactured protein hydrolysates have demonstrated both nutritional and functional benefits for human food and animal feed (Shahidi & Janak Kamil, 2001). Hydrolysis of raw materials produces peptides with biological (antimicrobial, antioxidant, antihypertensive…) activity (Kim & Mendis, 2006). Protein hydrolysates of marine origin are the most represented hydrolysates on the food and feed markets. In aquaculture feeds, they are used for their palatability, nutrition, and health performances (Cahu, Zambonino Infante, Quazuguel, & Le Gall, 1999; Choi, Hur, Choi, Konno, & Park, 2009; Gisbert et al., 2012; S. Khosravi et al., 2015; Sanaz Khosravi et al., 2015, 2017; Refstie, Olli, & Standal, 2004).

Enzymatic hydrolysis of proteins yields a mixture of free amino acids, of di-, tri- and oligo-peptides, and increases the occurrence of polar groups and the solubility of hydrolysate compounds (Kristinsson & Rasco, 2000). In aquafeeds and other applications, the functional properties of protein hydrolysates directly result from their amino acid and peptide composition (Espe, Sveier, Hogoy, & Lied, 1999) and from peptide molecular weight (Liaset, Lied, & Espe, 2000). The advantage of applying a hydrolysis process is that different types of peptide mixtures may be produced from a same raw material. This variation depends on the process parameters (enzyme specifications, hydrolysis temperature and duration, raw material/water ratio, etc.), and results in end-products with different functional properties. As a result, the finished products have different functional properties.

The hydrolysis level of proteins is usually characterized by the degree of hydrolysis (DH), i.e. the number of cleaved peptide bonds relatively to the number of initial peptide bonds (Mullally, O'callaghan, Fitzgerald, Donnelly, & Dalton, 1995). The DH is determined during the hydrolysis process and cannot be applied to manufactured hydrolysates. To further characterize protein hydrolysates after the hydrolysis process, several methods can be applied to analyze peptide profiles: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Liceaga-Gesualdo & Li-Chan, 1999), high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) (Guérard, Dufossé, De La Broise, & Binet, 2001), or mass spectrometry (Robert et al., 2015). These methods alone are not sufficient to fully characterize protein hydrolysates and should be coupled to reach a better overview of their structure. Complex protein hydrolysates can contain more than 1,000 peptides of different sizes (Robert et al., 2014, 2015).

Peptide extraction from protein hydrolysates or animal tissues is well documented, and many protocols deal with the purification of different mass ranges or specific peptides (see (German et al., 2015) for a review). Nevertheless, it is difficult to compare quantitative results when peptide amounts in the hydrolysates vary or when raw materials are of different origins.

This study presents a fast and standardized method to characterize complex protein hydrolysates. We used different products of various origins containing different protein concentrations to validate a method based on the use of two indexes taking into account LMW peptide amounts and diversity.

2. Materials and methods

2.1 Hydrolysate sampling

We selected different raw material origins and different hydrolysis processes to have a wide panel of protein hydrolysates available for comparisons. The finished products were provided by DianaAqua (Symrise group, Elven, France). The protein hydrolysates were produced as follows: **A1** and **A2** from white shrimp (*Litopeneus vannamei)*, with additional enzymatic treatment for A2 as compared to A1; **B** from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); **C1** and **C2** from salmon (*Salmo salmar*) from 2 different production sites and different raw materials but using the same enzyme; **D1** and **D2** from tuna (*Thunnus sp.*) with a shorter hydrolysis time and different raw materials for D2 as compared to D1; **E** from argentine shortfin squid (*Illex argentinus*); **F** from cod (*Gadus morua*); **G1** and **G2** from antarctic krill (*Euphausia superba*), with additional thermal treatment for G2 as compared to G1. Hydrolysates were produced from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), from the frames of fish and squid from food processing plants, or from whole animals (krill).

2.2 Extraction of hydrolytic peptides and normalization of concentrations before analysis

The method is summarized in **Figure 1**. Peptides were extracted prior to mass spectrometry and liquid chromatography analyses. One gram of hydrolysate powder or 1 ml of liquid hydrolysate was homogenized in 10 ml of 0.1% HPLC-grade trifluoroacetic acid (TFA – Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) solution for 10 minutes and centrifuged 10 min at 20,000 × g. The supernatant was filtered on Whatman paper, then diluted to 1 absorbance unit (AU) at a wavelength of 214 nm in an HPLC-grade 0.1% formic acid (FA – Sigma-Aldrich) solution. Fifty ml of extract diluted to 1 AU were concentrated on a Sep-Pak C18ec classic cartridge (Waters, Milford, Massachusetts, USA), eluted by acetonitrile (Sigma-Aldrich)/water/FA (80/19.9/0.1, v/v/v), evaporated on a SpeedVac

concentrator, and kept at 4°C until mass spectrometry and HPSEC analyses.

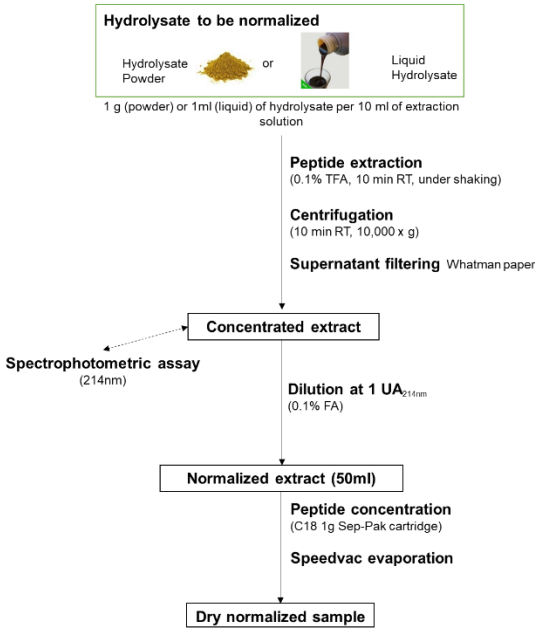


Figure 1: Method used to normalize hydrolysate samples before analysis. TFA: Trifluoroacetic acid; RT: Room temperature; FA: Formic acid; UA: Unit of absorbance.

2.3 Diversity of peptide in the hydrolysates

Peptide extracts were suspended in a 0.1% FA solution, and then chromatography was performed on an Ultimate 3000 nLC system (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Peptides were separated on a Pepmap C18 column (250 × 75 µm, 3 µm – Thermo Scientific). Mobile phases consisted of 0.1% FA, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% FA, 20% water in 79.9% ACN (v/v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nl/min, and the linear gradient was 0.96% of ACN per minute from 2% to 60%. ESI-MS analysis was performed on a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific) in the 200–2,000 m/z range.

2.4 Amounts of peptide in the hydrolysates

High-performance steric exclusion chromatography (HPSEC) characterization was performed on a VARIAN system equipped with a UV (214-nm wavelength) detector (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Elution was carried out on a 300 × 8 mm, 5 µm ReproSil 50 SEC column (AIT, Houilles, France) with acetonitrile/water/TFA (10/89.9/0.1, v/v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min. Each peptide extract was dissolved in 100 µl of HPSEC eluent, and 20 µl were injected. The HPSEC system was calibrated with three synthetic peptides: 949.59 Da (KKPLFGLF: 84.41% purity – Proteogenix, Schiltigheim, France), 1,000.13 Da (PRFQGNGKP: 98.89% purity – Genecust, Ellange, Luxembourg), and 1,058.71 Da (KKKKPLFGL: 91.25% purity – Proteogenix).

2.5 Determination of the quantitative index of the hydrolysates

The quantitative index of LMW peptides (iQuant) represented the abundance of peptides with molecular weights below 1,000 Da. Based on the integration of the area under the curve extracted from chromatogram data, iQuant was calculated as:

iQuant (%) = 100 x [area of peptides with a MW < 1,000 Da x total sample area^{-1}].

2.6 Determination of the qualitative index of the hydrolysates

The qualitative index of LMW peptides (iQual) represented the diversity of peptides with molecular weights below 1,000 Da in the hydrolysate. To determine this index, identical measured masses were removed from analysis (± 0.01 Da). Based on the peaklist data recorded from the nLC-ESI-MS analysis, iQual was calculated as:

iQual (%) = 100 x [number of peptides with a MW < 1,000 Da x total number of peptides $^{-1}$]

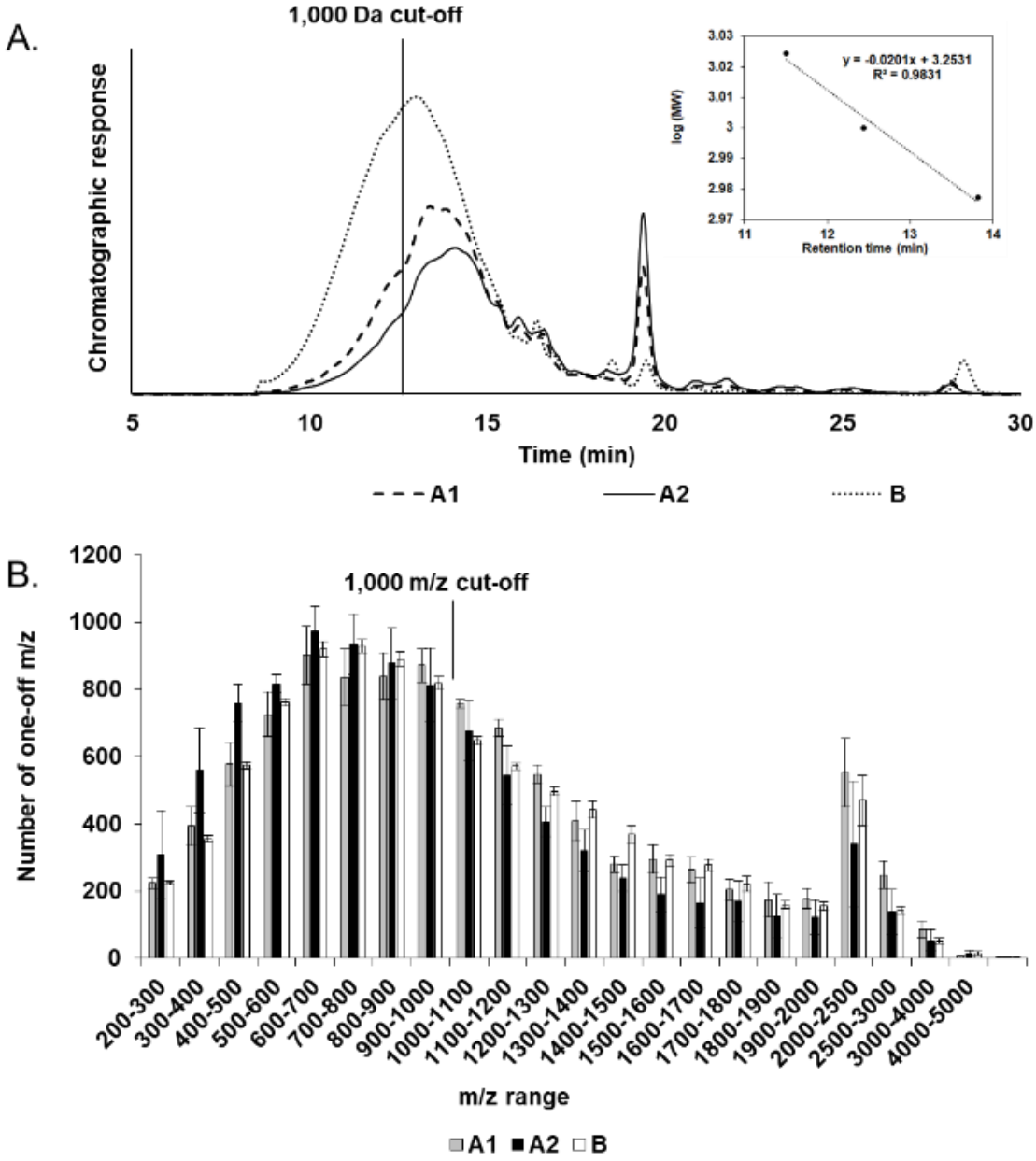
2.7 Statistical analyses

Extraction, normalization, HPSEC and nLC-ESI-MS analyses were performed in triplicate to assess the methods with 3 different hydrolysates: two shrimp hydrolysates (A1 and A2) and a Nile tilapia hydrolysate (B). iQuant and iQual were expressed as means ± Standard Deviation (SD).

3. Results and discussion

3.1 iQuant and iQual method validation

The reproducibility of the method was evaluated for peptide extraction and for HPSEC and nLC-ESI-MS assays. All experiments (extraction/normalization, iQuant and iQual assays) were performed in triplicate. Results are summarized in **Figure 2**. During method validation the highest iQuant (90.2%) and iQual (69.67%) values were observed for the shrimp hydrolysate A2. The lowest iQuant (68.43%) value was observed for the Nile tilapia hydrolysate B. The lowest iQual (57.78%) value was observed for the shrimp hydrolysate A1. Variability was very low for the three hydrolysates both by HPSEC and nLC-ESI-MS, especially by HPSEC (coefficient of variation < 1%). The liquid chromatography method analyzed the peptide profiles of the



C.

	A1	A2	B
iQuant±SD (CV)	84.87±0.39% (0.45%)	90.20±0.44% (0.48%)	68.43±0.44% (0.64%)
iQual±SD (CV)	57.78±3.95% (6.84%)	69.67±2.33% (3.34%)	61.18±2.08% (3.39%)

Figure 2: Figure 2. HPSEC and mass spectrometry profiles recorded during the validation step. **Hydrolysate list:** A1: shrimp, low degree of hydrolysis, A2: shrimp, high degree of hydrolysis, B: Nile tilapia. Values are means of 3 replicates ± standard deviations (SD). A. HPSEC chromatograms and calibatrion curve. B. nLC-ESI-MS peaklists. C. Determination of iQuant and iQual indices based on HPSEC and nLC-ESI-MS results, respectively. The quantitative index of LMW peptides (iQuant) represents the abundance of peptides with molecular weights below 1,000 Da in the hydrolysate. Based on the integration of the area under the curve extracted from chromatogram data. The qualitative index of LMW peptides (iQual) represents the diversity of peptides with molecular weights below 1,000 Da in the hydrolysate. To determine this index, identical measured masses were removed from analysis (±0.01 Da). Based on the peaklist data recorded from the nLC-ESI-MS analysis. Coefficients of variation (CV) are given for each sample.

hydrolysates by separating peptides according to their molecular weight. This technique has been used to analyze peptides and hydrolysates for 40 years (Guérard et al., 2001; Irvine, 2003). In addition, we measured peptide diversity using nLC-ESI-MS, a tandem liquid chromatography technique coupled with mass spectrometry. This technique is widely used for peptidomic analyses of food products (Picariello, Mamone, Addeo, & Ferranti, 2012), but to our knowledge it had never been used to analyze complex protein hydrolysates. nLC-ESI-MS is very sensitive, it measures peptide masses down to the picomole level (Arnott, Shabanowitz, & Hunt, 1993).

We chose a threshold of 1,000 Da, i.e. peptides containing less than ~ 10 amino acids. They make up the most commonly found fraction in marine protein hydrolysates and the most efficient one to supply palatability, nutrition and health benefits (Cahu, Zambonino Infante, Quazuguel, & Le Gall, 1999; Choi, Hur, Choi, Konno, & Park, 2009; Gisbert et al., 2012; S. Khosravi et al., 2015; Sanaz Khosravi et al., 2015, 2017; Refstie, Olli, & Standal, 2004) even if high contents of LMW peptides cause the feed to taste bitter (Adler-Nissen, 1984).

3.2 Determination of the iQuant and iQual indexes of the hydrolysates.

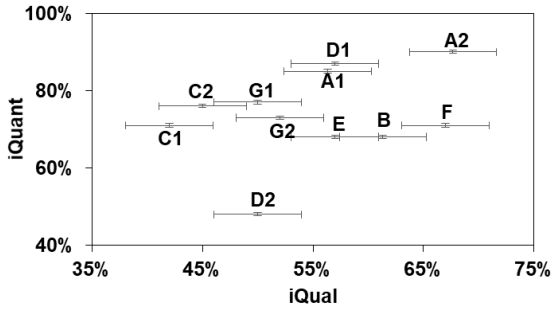


Figure 3: Graphical representation of peptide amounts and diversity. The quantitative index of LMW peptides (iQuant) represents the abundance of peptides with molecular weights below 1,000 Da in the hydrolysate. Based on the integration of the area under the curve extracted from chromatogram data. The qualitative index of LMW peptides (iQual) represents the diversity of peptides with molecular weights below 1,000 Da in the hydrolysate. To determine this index, identical measured masses were removed from analysis (±0.01 Da). Based on the peaklist data recorded from the nLC-ESI-MS analysis. Error bars correspond to the highest standard deviation values observed during the qualification step, i.e. 0.44% for iQuant and 3.95% for iQual.
Hydrolysate list: A1 (57.78;84.87): shrimp low hydrolysis, A2 (69.67;90.20): shrimp high hydrolysis, B (61.68;68.43): Nile tilapia, C1 (42.94;71.35): salmon production site 1, C2 (44.62;75.86): salmon production site 2, D1 (56.65;87.02): Tuna raw material 1, D2 (49.84;47.60): Tuna raw material 2, E (56.97;67.57): Argentina shortfin squid, F (66.53;71.35): cod, G1 (49.66;76.54): krill, G2 (52.38;73.33): G1 + thermal treatment.

Once the reproducibility of the method was validated, protein hydrolysates were analyzed and compared in single-shot analyses (1 extraction, 1 HPSEC run, 1 nLC-ESI-MS run). Results are presented in **Figure 3**. We conducted single analyses while assuming the highest SD values observed during qualification (0.44% for iQuant and 3.95% for iQual) to take into account the reproducibility of the method. HPSEC and nLC-ESI-MS results allowed us to draw graphical representations of iQuant and iQual and then compare hydrolysates in terms of peptide abundance and diversity. Thus we determined the effects of raw material origin and of the process on the final specifications of the hydrolysates. iQuant values ranged from 48% to 90%. The range of iQual values was narrower, from 42% to 69%. Shrimp hydrolysates **A1 (57.78;84.87)** & **A2 (69.67;90.20)** both had similar high iQuant values but well differentiated iQual values, indicating that the further hydrolysis process of A2 yielded more LMW peptides. Tilapia hydrolysate **B (61.18;68.43)** had an iQual value similar to the average value of the other protein hydrolysates, and one of the highest iQual values. Salmon hydrolysates **C1 (42.94;71.35)** & **C2 (44.62;75.86)** had iQuant values similar to those of the tilapia hydrolysates, but their iQual values were lower. These two hydrolysates were produced from different salmon raw materials and were processed in two different factories; this could explain the differences in peptide amounts (iQuant) observed between C1 and C2. Concerning peptide diversity, there were no significant differences between C1 and C2. Tuna hydrolysates **D1 (56.65;87.02)** & D2 **(49.84;47.60)** had different iQuant values corresponding to their different hydrolysis levels: the lower hydrolysis level of D2 resulted in a lower iQuant. To a lesser extent, D2 iQual value was impacted and was lower than D1 iQual value. Squid hydrolysate **E (56.97;67.57)** had average values both for iQuant and iQual. Cod hydrolysate **F (66.53;67.57)** had an average iQuant value and a very high iQual value, similar to that of the shrimp hydrolysate (A2), the most hydrolyzed product. Finally, krill hydrolysates **G1 (49.66;76.54)** & **G2 (52.38;73.33)** had relatively similar profiles despite the additional thermal process applied to G2. These results show that most of the hydrolysates contained an abundance (iQuant) of LMW peptides of ca. 70%, and that they were then distributed along the iQual axis. This observation highlights a high variability in peptide diversity among hydrolysates, while the proportions of LMW peptides were similar across the different products. This result

emphasizes that an analysis solely based on the amount of LMW peptides will only give a fragmentary view of the peptide composition of the hydrolysates. Similarly, the hydrolysates with the highest iQual values (A2 and F) had very different iQuant values. This is again evidence that both iQuant and iQual analyses are required to characterize protein hydrolysates of different origins and produced from different processes. The graphical method based on the 2 axes proved efficient to thoroughly characterize the structure of hydrolysates. Each axis compensated for the blind areas of the other and allowed for a full appreciation of the peptide composition of each hydrolysate.

Although the degree of hydrolysis (DH) has often been used to characterize protein hydrolysates, such an approach has downsides. It is not sufficient to characterize hydrolysates because several peptide profiles can be observed for a given DH and therefore for a same level of peptide bond cleavages depending on the cleavage site of the enzyme(s) used for hydrolysis. The abundance and diversity of LMW peptides produced at the end of the process are more relevant parameters to characterize and discriminate protein hydrolysates. This study demonstrates that combining HPSEC and nLC-ESI-MS is efficient to reach this objective. The experimental set-up we propose was suitable to analyze our samples (one-shot, 1,000 Da cut-off). Therefore it is obviously up to each user to define the number of replicates and the cut-off values to adapt the method and achieve their objectives.

The performance of a protein hydrolysate is tightly correlated to its peptide profile and structure (Espe, Sveier, Hogoy, & Lied, 1999; Liaset, Lied, & Espe, 2000), so it is critical to control the performance of the hydrolysis process and the specifications of the finished products. The method developed in this study offers an efficient tool for adapting hydrolysate processing parameters to specific targets. It could also be used to predict the zootechnical performances of newly developed hydrolysates by comparing their position in the 2D diagram with known protein hydrolysates, i.e. shrimp, tilapia or krill hydrolysates tested in *in vivo* trials (Bui, Khosravi, Fournier, Herault, & Lee, 2014).

Protein hydrolysates of aquatic by-products have demonstrated *in vitro* functional (antibacterial, antioxidant, immunostimulant) properties owing to the presence of bioactive peptides that could have applications in animal and human health (Kim & Mendis, 2006). It is essential to carry out functional tests on samples of different origins and galenic forms (liquid or powder) in standardized conditions to be able to compare performances among hydrolysates of different origins and/or produced from different processes. The normalization step described here is a key point of hydrolysate characterization. It could also help standardize samples to analyze the functional performances of hydrolysates using *in vitro* tests.

Our method significantly improves the deep characterization of complex protein hydrolysates. For the first time, it is possible to develop hydrolysates while better understanding the impact of processing modifications on their structural properties, with the perspective of correlating their characteristics to functional (*in vitro* and *in vivo*) properties in order to fine-tune hydrolysis to specific performances.

Funding: This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (grant number 2014/1274).

References

Adler-Nissen, J. (1984). Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, *34*(3), 215–222. http://doi.org/10.1002/jctb.280340311

Arnott, D., Shabanowitz, J., & Hunt, D. F. (1993). Mass spectrometry of proteins and peptides: Sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. *Clinical Chemistry*, *39*(9), 2005–2010.

Bui, H. T. D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., & Lee, K. J. (2014). Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (Pagrus major) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, *418–419*, 11–16. http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.046

Cahu, C. L., Zambonino Infante, J. L., Quazuguel, P., & Le Gall, M. M. (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass Dicentrarchus labrax larvae. *Aquaculture*, *171*(1–2), 109–119. http://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00428-1

Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K., & Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, *74*(1). http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00988.x

Espe, M., Sveier, H., Hogoy, I., & Lied, E. (1999). Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (Salmo salar L.) fed fish protein concentrate. *Aquaculture*, *174*(1–2), 119–137. http://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00502-X

German, J. B., Barile, D., Lebrilla, C. B., Dallas, D. C., Guerrero, A., Parker, E. A., … Lebrilla, C. B. (2015). Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics*, *15*(0), 1026–1038. http://doi.org/10.1002/pmic.201400310

Gisbert, E., Skalli, A., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Zambonino-Infante, J. L., & Fabregat, R. (2012). Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (Sparus aurata) larvae. *Aquaculture*, *338–341*, 96–104. http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.007

Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (Thunnus albacares) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, *11*(4–6), 1051–1059. http://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00031-X

Irvine, G. B. (2003). High-performance size-exclusion chromatography of peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *56*(1–3), 233–242. http://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00061-7

Khosravi, S., Bui, H. T. D., Herault, M., Fournier, V., Kim, K.-D., Lee, B.-J., … Lee, K.-J. (2017). Supplementation of Protein Hydrolysates to a Low-fishmeal Diet Improves Growth and Health Status of Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. http://doi.org/10.1111/jwas.12436

Khosravi, S., Bui, H. T. D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Jeong, J. B., & Lee, K.-J. (2015). Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (Paralichthys olivaceus) challenged with Edwardsiella tarda. *Aquaculture Nutrition*, *21*(3), 321–331. http://doi.org/10.1111/anu.12157

Khosravi, S., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Lee, C.-R., Dio Bui, H. T., … Lee, K.-J. (2015). Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream Pagrus major. *Fish & Shellfish Immunology*, *45*(2), 858–868. http://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.039

Kim, S. K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International*. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). *Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 40). http://doi.org/: 10.1080/10408690091189266

Liaset, B., Lied, E., & Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(5), 581–589. http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<581::AID-JSFA578>3.0.CO;2-I

Liceaga-Gesualdo, A., & Li-Chan, E. (1999). Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (Clupea harengus). *Journal of Food Science*, *64*(6), 1000–1004. http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12268.x

Mullally, M. M., O'callaghan, D. M., Fitzgerald, R. J., Donnelly, W. J., & Dalton, J. P. (1995). Zymogen Activation in Pancreatic Endoproteolytic Preparations and Influence on Some Whey Protein Hydrolysate Characteristics. *Journal of Food Science*, *60*(2), 227–233. http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05643.x

Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F., & Ferranti, P. (2012). Novel mass spectrometry-based applications of the "omic": Sciences in food technology and biotechnology. *Food Technology and Biotechnology*, *50*(3), 286–305.

Refstie, S., Olli, J. J., & Standal, H. (2004). Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, *239*(1–4), 331–349. http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015

Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., & Henry, J. (2014). Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (L. vannamei). *Journal of Biotechnology*, *186*, 30–37. http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.020

Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., & Henry, J. (2015). Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (Oreochromis niloticus) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochemistry*, *50*(3), 487–492. http://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.022

Shahidi, F., & Janak Kamil, Y. V. A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, *12*(12), 435–464. http://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00021-3

4 Analyse comparée de deux hydrolysats de krill issus de deux process de fabrication différents

En complément des travaux précédents, deux hydrolysats de krill (HC6v1 et HC6v2,) ont été soumis à des analyses plus poussées dans le but d'obtenir la couverture analytique de la gamme de masses moléculaires des peptides la plus large possible. Le produit HC6v2 diffère de HC6v1 par l'application d'un traitement thermique supplémentaire.

Ainsi, trois types d'analyses différentes à partir d'échantillons normalisés (équivalent 50ml à 1 UA_{214nm}) ont té réalisées :

- Une analyse directe des masses moléculaires avec un spectrophotomètre de masse de type MALDI-TOF-TOF (Abscience).
- Une analyse des masses moléculaires avec un spectromètre de masse de type MALDI-TOF-TOF (Abscience) après séparation successives sur électrophorèse de type OFFGEL et nano-LC suivie d'un dépôt sur cible MALDI 384 puits.
- Une analyse des masses moléculaires par chromatographie liquide en phase inverse C18 en tandem avec un spectromètre de masse de type électro-spray (nLC-ESI-orbiTRAP) pour la détection des peptides de tailles inférieures à 700 Da.

Tous les spectres de fragmentations générés ont ensuite été analysés avec le logiciel MASCOT. Ce logiciel a permis de déterminer à l'aide d'une base de données transcriptomique de krill, la séquence des peptides fragmentés à partir du spectre MS/MS de chaque peptide.

La **Figure 30** présente les peptides identifiés pour l'hydrolysat de krill ayant subi les conditions d'hydrolyse standard (HC6 v1). Chaque croix correspond à un peptide différent. Les peptides identifiés sont représentés par leur masse en dalton et par leur point iso-électrique théorique défini par leur séquence en acides aminés.

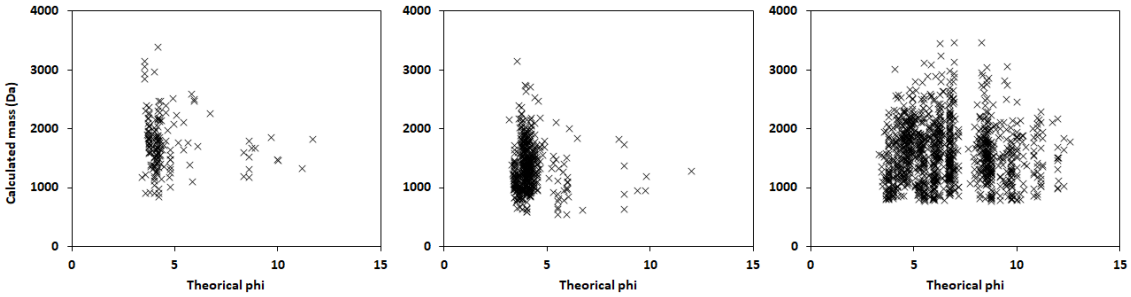


FIGURE 30 – Peptides identifiés dans l'hydrolysat de krill. Trois approches ont été employées : une mesure directe en MALDI-TOF-TOF (gauche), une mesure directe en LC-ESI-orbiTRAP (milieu) et une mesure après une séparation par OFFGEL 12 puits suivie de 12 nLC-MALDI-TOF-TOF (droite).

A l'issue des analyses, 1800 peptides ont pu être identifiés dans l'hydrolysat de krill ayant subi la condition d'hydrolyse standard (HC6v1) et 1600 dans l'hydrolysat ayant subi la condition d'hydrolyse prolongée (HC6v2). La comparaison des résultats a permis de mettre en évidence que la différence des conditions d'hydrolyse influence la composition peptidique et que seulement 220 peptides sont communs aux deux hydrolysats (**Tableau 20**), tandis que les paramètres iQuant et iQual sont relativement proches entre les deux produits. Ces résultats apportent un argument supplémentaire à l'importance de la caractérisation fine des hydrolysats pour une meilleure compréhension des procédés de fabrication et de la performance fonctionnelle des produits chez l'animal.

Le couplage de différentes techniques de préparation des échantillons et de mesure sur différents spectromètres de masse a permis de valider à nouveau le couplage séparation OFFGEL et MALDI-TOF-TOF comme méthode performante pour l'identification des peptides d'un hydrolysat complexe de protéines.

Tableau 20 – Résultats de l'identification des peptides des hydrolysats de krill.

	iQuant	iQual	Peptides identifiés	Peptides spécifiques
HC6 v1	76,54%	49,66%	1756	1536
HC6 v2	73,33%	52,38%	1310	1090

5 Conclusion

Le développement d'outils d'analyse, de normalisation et de caractérisation constitue une étape importante et indispensable pour l'étude des propriétés fonctionnelles des hydrolysats de protéines. La disponibilité d'une méthodologie éprouvée et performante offre de nouvelles perspectives dans le développement et l'optimisation des procédés d'hydrolyse enzymatique pour la fabrication des hydrolysats de protéines. Elle permettra d'évaluer, de comprendre et probablement d'anticiper les paramètres permettant de piloter le process (choix et dosage du cocktail d'enzymes, température et durée de la réaction d'hydrolyse, température et durée du palier de pasteurisation). La maitrise des différents paramètres et la meilleure compréhension de leurs conséquences sur les spécifications du produit fini permettront de produire une gamme plus élaborée d'hydrolysats de protéines, de plus en plus aptes à répondre à des demandes ciblées sur le plan fonctionnel.

La disponibilité de cette méthodologie analytique constitue une avancée importante dans le cadre de la démarche de standardisation des produits. Il est en effet très important pour un industriel de disposer d'outils analytiques permettant de vérifier que le produit répond aux standards de fabrication prédéfinis.

Enfin, ces résultats représentent une première étape franchie dans le projet de corrélation des performances fonctionnelles des hydrolysats de protéines chez l'animal et à la concentration de certaines classes de peptides. En effet, il est à présent possible de classer les hydrolysats en fonction de paramètres structuraux et de mesurer l'impact de la diversité ou de la quantité de peptides dans un hydrolysat sur l'efficacité alimentaire d'une formulation, la régulation métabolique et les performances de croissance des poissons.

Toutefois, lors de l'identification des peptides constitutifs des hydrolysats de krill, nous avons montré que ces deux hydrolysats, malgré une matière première de départ identique, étaient constitués de peptides très différents même s'ils présentent des valeurs d'iQual (diversité) et d'iQuant (quantité) relativement proches. Ces résultats montrent qu'il pourrait être nécessaire d'aller encore plus loin dans l'analyse des hydrolysats de protéines notamment lorsque ces derniers sont issus de procédés mettant en œuvre des enzymes ou cocktails d'enzymes ayant des sites de clivages non spécifiques.

Le développement de tests fonctionnels permettant d'évaluer les performances des hydrolysats de protéines constitue le deuxième volet incontournable de la phase de caractérisation. En effet, la connaissance du profil moléculaire d'un hydrolysat n'est à l'heure actuelle pas suffisante pour prédire l'impact de ces derniers sur les performances de croissance, sur le métabolisme et sur la santé des poissons ni d'ailleurs pour déterminer leurs propriétés fonctionnelles.

La caractérisation fonctionnelle des hydrolysats passe par le développement d'outils fonctionnels *in vitro* de mesure de la performance. La détermination des propriétés fonctionnelles tels que le pouvoir antioxydant, les propriétés antimicrobiennes ou myotropes nécessite de réaliser des réplicats rigoureux d'échantillon pour mener à bien les tests, afin de pouvoir avoir recours à une analyse statistique des résultats et ainsi attribuer des niveaux de fonctionnalité aux différents hydrolysats. La normalisation des échantillons, décrite dans ce chapitre, est donc un pré-requis indispensable pour la caractérisation fonctionnelle *in vitro* des hydrolysats.

La méthodologie décrite dans l'article « A *standardized and efficient method to characterize the structure of aquatic protein hydrolysates* » page 132 a été appliquée lors des expériences *in vitro* décrites dans le prochain chapitre de ce manuscrit et ayant abouti à l'identification d'un peptide myotrope dans l'hydrolysat de crevette.

Quatrième partie

Caractérisation fonctionnelle des hydrolysats de protéines : détermination des activités myotropes des hydrolysats de protéines et application potentielle en l'aquaculture

1 Introduction

1.1 Importance du transit digestif chez les poissons

Le **temps de transit** des aliments dans l'appareil digestif du poisson est un paramètre important à prendre en compte en pisciculture car il influence le taux d'alimentation [Jobling, 1980] et, *in fine*, les performances de croissance des poissons [Riche *et al.*, 2004]. En effet, les poissons d'aquaculture ne sont pas alimentés en continu mais la ration est répartie sur plusieurs nourrissages. Un **rationnement alimentaire** optimisé des poissons permet donc à la fois de **diminuer les coûts** de production en limitant le gaspillage des aliments mais également d'assurer une **prise de poids** optimale aux poissons.

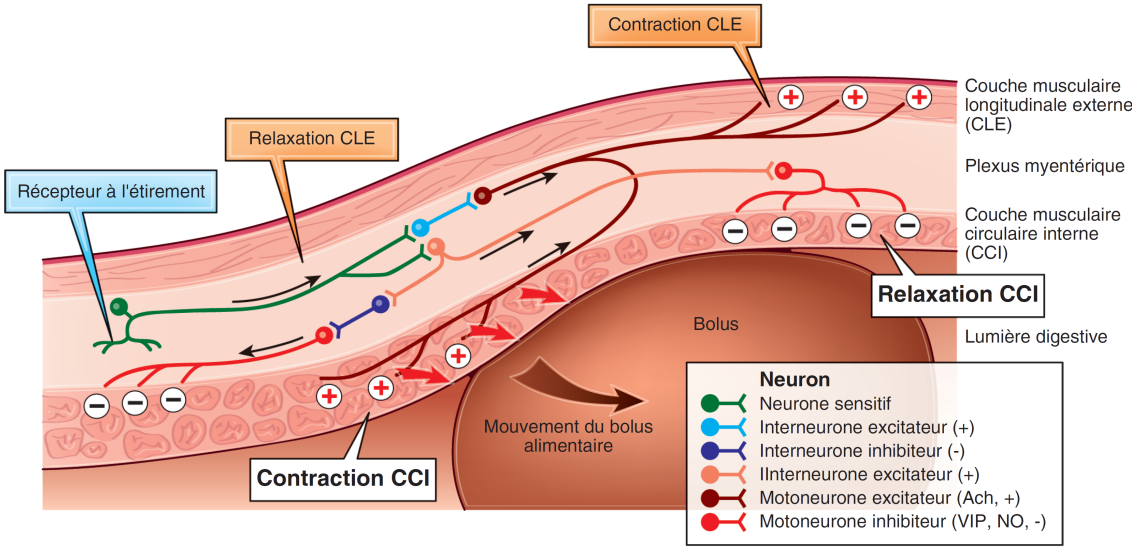
Chez les poissons, le temps de transit alimentaire dans l'appareil digestif est affecté par de nombreux facteurs tels que l'**environnement** (température, salinité), la **physiologie** du poisson (espèce, stade de développement) mais également la **formulation et le process de fabrication des aliments** [Adamidou *et al.*, 2009]. Ce dernier point est notamment très important lors de la mise au point d'ingrédients alternatifs pour remplacer les FP. En effet, chez les poissons carnivores, les régimes contenant des FV augmentent le **temps de rétention** de la nourriture dans l'intestin en raison de leurs fortes teneurs en fibres et en sucres complexes [Storebakken *et al.*, 1999]. Cela peut se traduire par une baisse de l'**utilisation alimentaire** ainsi que par une détérioration de la **physiologie intestinale** notamment en raison de la fermentation des sucres dans l'intestin. Inversement, il semblerait que les matières premières d'origine marine présentent des propriétés fonctionnelles influençant la motilité intestinale avec pour conséquence un transit optimisé.

1.2 Mécanisme du transit alimentaire

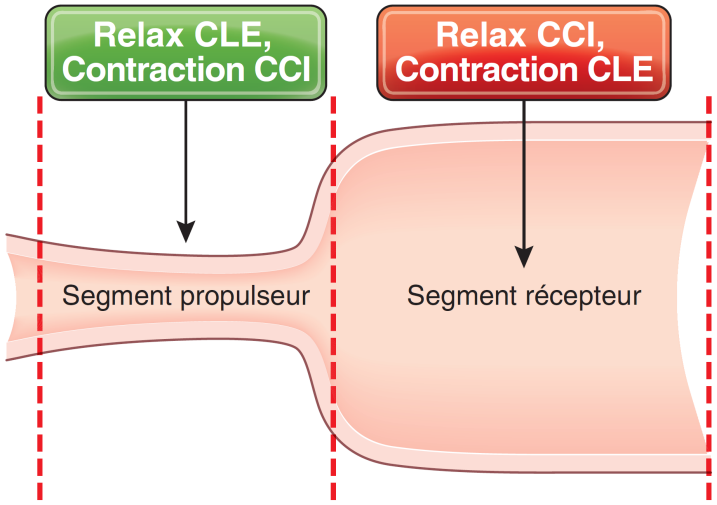
La description du transit alimentaire dans l'estomac ne sera pas abordée dans ce manuscrit et se focalisera sur celle de l'intestin. Le transit alimentaire intestinal est un processus ordonné assuré par la **musculeuse de l'intestin** [1]. Celle-ci est composée de cellules musculaires lisses disposées en couches circulaires internes et couches longitudinales externes. Le muscle lisse digestif se comporte donc comme un syncytium fonctionnel car toutes les cellules musculaires se contractent de manière **synchronisée**. Il se contracte de façon lente et soutenue en réponse à une stimulation, se relâche sous l'influence de neurones inhibiteurs (**Figure 31a**).

Les neurones sensitifs sont reliés à différents types de récepteurs localisés dans la paroi digestive : mécanorécepteurs, chémorécepteurs et thermorécepteurs, récepteurs polymodaux. Les **motoneurones** sont de deux types : **excitateurs** et **inhibiteurs**. Les motoneurones excitateurs libèrent de l'acétylcholine au contact de la membrane des cellules musculaires lisses, provoquant une **dépolarisation** membranaire et la survenue de potentiels d'action induisant une **contraction** musculaire. Les motoneurones inhibiteurs libèrent des médiateurs différents (vasoactive intestinal peptide (VIP) et monoxyde d'azote notamment) qui entraînent une **hyperpolarisation** membranaire, et donc une **relaxation** de la fibre musculaire lisse. De très nombreux interneurones intègrent les signaux sensitifs et organisent les réponses excitatrices ou inhibitrices, rendant possibles les réflexes entériques tels que le **réflexe péristaltique** (**Figure 31b**) [CDU-HGE, 2014].

1. Cf « Coupe histologique d'un intestin de bar européen **Figure 20** page 74



(a) Réflexe péristaltique.



(b) Péristaltisme digestif.

FIGURE 31 – **(a)** Réflexe péristaltique. Le point de départ est la stimulation d'un mécanorécepteur de la paroi par le passage du bol alimentaire. L'activation du neurone sensitif va déclencher une réponse motrice faite en amont d'une contraction de la couche circulaire interne et une relaxation de la couche longitudinale, ce qui entraîne un rétrécissement de la lumière digestive et une augmentation de pression, et en aval d'une contraction de la couche longitudinale et une relaxation de la couche circulaire avec comme conséquence un raccourcissement du segment digestif et une diminution de pression. Il se forme ainsi un segment d'amont propulsif et un segment d'aval réceptif qui permet la progression du bol alimentaire, le phénomène se reproduisant de proche en proche dans le sens oral-aboral. **(b)** Péristaltisme digestif : alternance coordonnée et propagée de contraction/relaxation des deux couches musculaires digestives. Abbréviations : CCI : couche musculaire circulaire interne, CLE : couche musculaire longitudinale externe. Illustration : Carole Fumat [CDU-HGE, 2014].

1.3 Régulation de la prise alimentaire chez les poissons

La prise alimentaire chez les poissons téléostéens est affectée par des facteurs externes tels que la température et la photopériode, le stress, les prédateurs et la disponibilité de la nourriture, ainsi que par des facteurs internes tels que la génétique, le stade de développement, le remplissage de l'intestin et l'énergie stockée. La régulation de la prise alimentaire est majoritairement contrôlée par le système endocrinien (pour revue Rønnestad, 2017). Le système endocrinien régule la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus mais également le long du tube digestif (**Figure 32**).

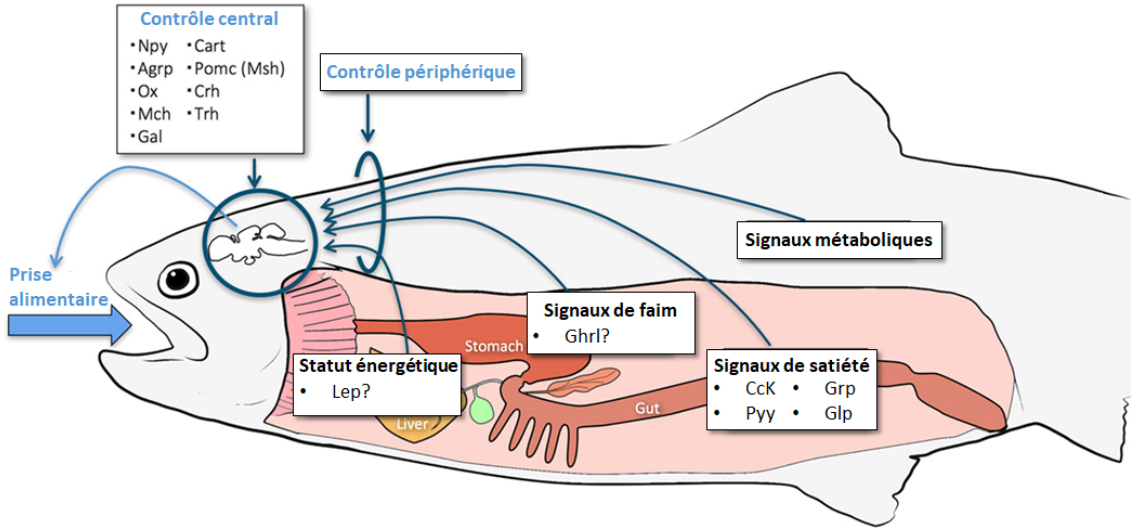


FIGURE 32 – Principales voies de régulation de la prise alimentaire chez les poissons. L'hypothalamus contrôle l'appétit et l'équilibre énergétique. Il intègre les signaux périphériques liés à la prise alimentaire, à la digestion, au métabolisme et au stockage de l'énergie. Ceux-ci comprennent non seulement les signaux endocriniens, mais également d'autres signaux tels que des systèmes centraux de détection des niveaux des nutriments et la présence ou l'absence d'aliments dans le tractus gastro-intestinal via des afférences vagales se projetant vers le cerveau [Rønnestad *et al.*, 2017].

1.4 Régulation de la motilité intestinale chez les poissons

De nombreux acteurs sont impliqués dans la régulation de la motilité intestinale : peptides, dérivées d'AA et de nucléotides ou molécules inorganiques (**Figure 33**). Il existe également beaucoup d'inconnues sur les mécanismes d'actions de régulation de la motilité intestinale : effets directs ou indirect, propagation ou non des contractions ou effet de rétro-peristaltisme [Holmgren et Olsson, 2009]. Dans ce chapitre, seuls les acteurs peptidiques de la régulation du transit intestinal chez les poissons seront décrits.

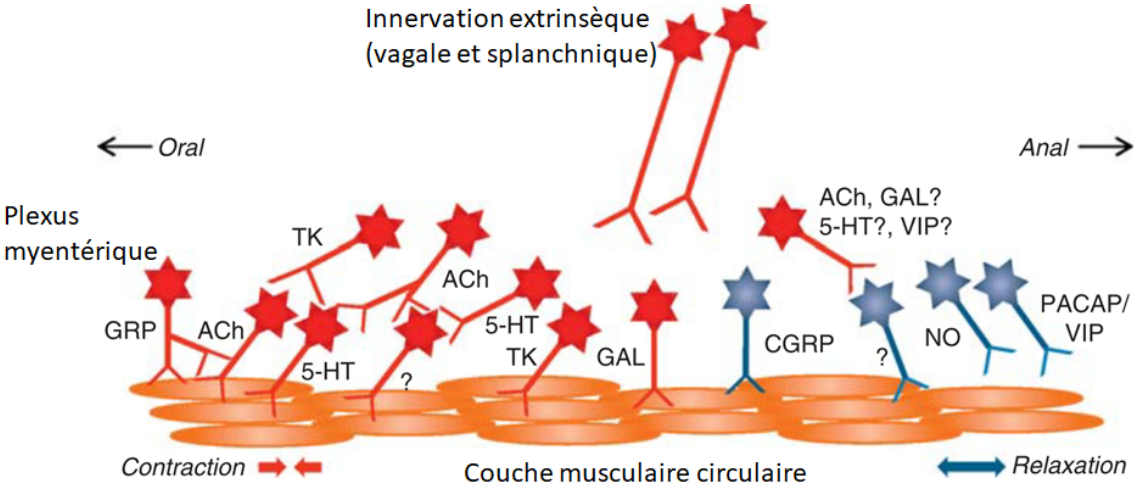


FIGURE 33 – Composés agissants sur les neurones controlant la contraction de la musculeuse intestinale des poissons. Certains composés agissent directement sur les neurones réponsables de la contraction des fibres musculaires et d'autres par l'intermédiaire des récepteurs neuronnaux cholinérgiques ou seroténiques. En rouge figurent les régulateurs myotropes et en bleu les régulateurs myosuppresseurs. De nombreux mécanismes ne sont pas encore élucidés. Ils sont figurés par des (?). Abréviations : 5-HT, 5-hydroxytryptamine (sérotonine) ; ACh, acetylcholine ; CGRP, calcitonin gene-related peptide ; GAL, galanine ; GRP, gastrin-releasing peptide ; NO, monoxyde d'azote ; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ; TK, tachykinines ; VIP, vasoactive intestinal polypeptide. Modifié d'après Holmgren et Olson (2009).

Chez les poissons, de nombreux **peptides myotropes** ont été identifiés : les tachykinines (TK), la cholécystokinine (CCK), la galanine, la ghréline (GRL), le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP), le neuropeptide Y (NPY) et quelques autres [Holmgren et Olsson, 2009]. Ils participent à la mobilité du bol alimentaire et à l'émission des excréments. Ils sont également impliqués dans la vidange gastrique

qui est à l'origine du **retour de l'appétit** du poisson [Riche *et al.*, 2004].

Il existe deux grandes catégories de peptides myotropes intestinaux ceux qui **stimulent** la contraction (**myotrope)** et ceux qui **inhibent** la contraction (**myosuppresseurs**). Seuls les peptides agissant sur les terminaisons nerveuses seront abordés dans les paragraphes suivant.

Les TK stimulent la contraction de l'intestin chez la raie épineuse (*Amblyraja radiata*), le dipneuste américain (*Lepidosiren paradoxa*), le polyptère du Sénégal (*Polypterus senegalensis*) et la truite arc-en-ciel mais pas chez les myxines (*Myxinidae*) et la lamproie de rivière (*Lampetra fluviatilis*) [Jensen *et al.*, 1991].

Elles stimulent également la motilité dans l'estomac et l'intestin de la morue [Jensen et Holmgren, 1985, Jensen *et al.*, 1987, Jensen *et al.*, 1993]. Les TK peuvent agir directement sur le muscle de l'intestin des poissons ou via les neurones cholinérgiques [Kitazawa *et al.*, 1986, Jensen *et al.*, 1991] ou sérotoninérgiques [Jensen et Holmgren, 1985, Jensen *et al.*, 1991]. Pour le moment, la signification physiologique de ces trois modes d'action différents n'a pas été élucidée. La GRL qui est produite dans l'estomac, provoque *in vitro* une augmentation faible mais significative du tonus basal intestinal chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) [Olsson *et al.*, 2008]. Bosi et al. (2007) suggèrent, en se basant sur les travaux portant sur l'action de la galadine dans l'estomac, que cette dernière jouerait un rôle de modulation de l'activité cholinergique dans l'intestin des poissons. Le NPY induit la contraction *in vitro* de l'intestin de morue, mais seulement à forte concentration [Shahbazi *et al.*, 2002].

Certains peptides ont des effets myosuppresseurs sur l'intestin des poissons. Le VIP et le PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating peptide) ont un effet principalement inhibiteur sur le muscle lisse de l'intestin [Holmgren et Olsson, 2009]. VIP inhibe l'activité des contractions du rectum chez le requin épineux (*Squalus acanthias*) [Lundin *et al.*, 1984]. Le PACAP réduit les contractions intestinales spontanées *in vitro* chez la morue et la truite arc-en-ciel [Holmgren et Olsson, 2009]. De même, le PACAP inhibe l'activité de l'intestin chez le poisson zèbre et du rectum chez l'astragale japonaise (*Uranoscopus japonicus*) [Matsuda *et al.*, 2000, Holmberg, 2004]. Le CGRP inhibe les contractions spontanées de l'intestin chez la morue *in vitro* via un effet direct sur les muscles lisses [Shahbazi *et al.*, 1998]. Dans

l'intestin chez la morue, une relaxation initiale après exposition à la somatostatine est parfois suivie d'une contraction [Jensen et Holmgren, 1985].

Certains peptides montrent des effets plus variables. La CCK diminue l'amplitude des contractions spontanées dans l'intestin tout en augmentant la tension au repos [Olsson *et al.*, 1999]. En revanche, la CCK possède un effet stimulant *in vitro* chez la morue [Jönsson *et al.*, 1987]. La CCK et les peptides apparentés ont également un effet excitateur sur l'intestin chez les rajidés et le requin épineux, mais les réponses sont faibles et irrégulières [Andrews et Young, 1988, Aldman *et al.*, 1989].

Tout ces travaux montrent que l'intestin est la cible de nombreux peptides myotropes aux mécanismes d'actions complexes, qui, physiologiquement agissent généralement ensemble.

1.5 Etude de l'activité myotrope d'hydrolysats de protéines

Les hydrolysats de protéines étudiés sont majoritairement composés de peptides de faible masse moléculaire et ont déjà montré des propriétés fonctionnelles[2]. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux chez le poisson portant sur les effets myotropes des matières premières d'origine marine ou d'hydrolysats de protéines. Au cours de cette thèse nous avons donc étudié les propriétés des hydrolysats sur la contraction de l'intestin de bar *in vitro* et l'effet induit sur le transit intestinal en conditions *in vivo*.

Les résultats de ces essais ont fait, en partie, l'objet de la soumission d'une publication « *Shrimp by-product hydrolysate induces intestinal myotropic activity in European seabass (Dicentrarchus labrax)* » dans la revue *Aquaculture*. Les chapitres suivants compilent la démarche expérimentale, les protocoles et les résultats, complétés par certains résultats non publiés dans l'article.

2. Cf « Bénéfices fonctionnels des hydrolysats de co-produits d'origine aquatique », page 60.

2 Démarche expérimentale

Les études de conditionnement alimentaire chez le poisson sont souvent longues et coûteuses. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé un outil d'analyse *in vitro* rapide à mettre en œuvre permettant de classer les hydrolysats de protéines selon leurs propriétés myotropes ou myosuppressives. Ce test *in vitro* intervient en amont ou en parallèle des tests *in vivo* de conditionnement alimentaire chez le poisson. Il s'agit d'un test fonctionnel basé sur la mesure de la contraction de la partie proximale de l'intestin de bar fixée dans une cuve de perfusion et suspendu à un capteur de force (**Figure 34**). Les variations du tonus sont enregistrées en temps réel au moyen d'un système développé au sein du laboratoire BOREA [1]. L'analyse des propriétés myotropes a ainsi été mesurée sur les 11 hydrolysats de protéines d'origine aquatique fournis par Diana Aqua [2]. Des expériences dose-réponse sont réalisées afin de déterminer les seuils d'activités des hydrolysats.

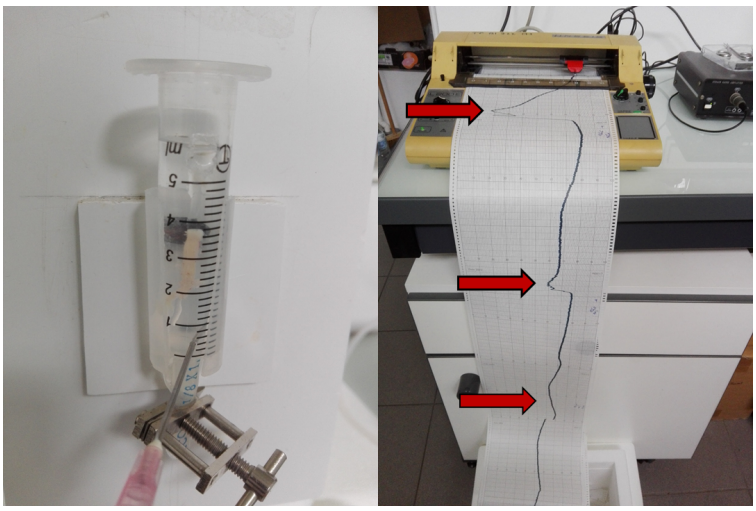


FIGURE 34 – Cuve de perfusion et enregistreur à rouleau. Les flèches correspondent à des injections de concentrations croissantes en hydrolysat de co-produits de crevette.

1. Cf « Système d'enregistrement des contractions de l'intestin *in vitro* », **Figure 28** page 112.
2. Voir liste des hydrolysats page 93.

Une étude de conditionnement alimentaire a également été menée chez le bar en station expérimentale de l'Ifremer de Brest. Les poissons sont nourris avec des aliments contenant deux hydrolysats de protéines (hydrolysat de crevette et hydrolysat de *Gadidae*) ayant des propriétés myotropes différentes dans le but de déterminer si les différences observées *in vitro* se manifestent également *in vivo* par une modification de la cinétique d'émission des fèces [3].

3. Cf « Conditionnement alimentaire de l'IFREMER (Brest) », page 107.

3 Résultats et discussion

Les résultats des activités myotropes mesurées *in vitro* sont groupés par origine des co-produits : crustacés, poissons et calmar (**Figure 35**). Il est intéressant de noter que le classement par origine est corrélé avec le type d'effet observé. Les hydrolysats de crustacés montrent des activités myotropes importantes. Les hydrolysats de poissons montrent des performances myotropes et myosuppressives execptés l'hydrolysat de tilapia qui présente une activité exclusivement myotrope. L'hydrolysat de calmar est quant à lui myosuppresseur.

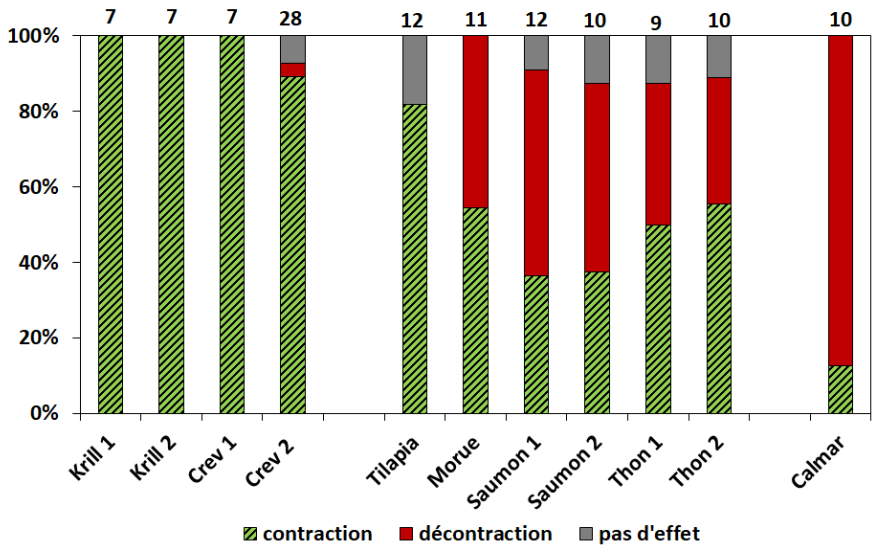


FIGURE 35 – Effet des hydrolysats sur l'intestin de bar. Le chiffre au dessus de l'histogramme correspond au nombre de répétitions effectuées. Les quantités d'hydrolysats testées correspondent à des extraits peptidiques secs de 15ml à 10 UA_{214nm}.

Le **Tableau 21** montre les seuils d'activitiés des hydrolysats de protéines étudiés. La majorité des hydrolysats (8 sur 11) ont un seuil d'activité inférieur à 0,1 UA_{214nm}. En revanche, le seuil d'activité de l'hydrolysat de tilapia est le plus élevé avec une quantité comprise entre 10 et 100 UA_{214nm}. Cette notion de seuil d'activité est importante car elle pourrait conditionner, à l'avenir, la quantité d'hydrolysat à inclure lors de la formulation des aliments pour obtenir un effet activateur (myotrope).

Tableau 21 – Seuils d'activité myotrope des hydrolysats testés. Les analyses ont été effectuées avec des concentration croissantes d'hydrolysats (15 ml) allant de 0,1 à 100 UA_{214nm}. Les échantillons avaient préalablement été séchés puis repris dans 1 ml de solution de perfusion.

	seuil de réponse (UA_{214nm})	masse correspondante	volume correspondant
Crevette 1	<0,1	<18,1 µg	-
Crevette 2	<0,1	<21,3 µg	-
Krill 1	<0,1	<28,9 µg	-
Krill 2	0,1-1	22,6 -226 µg	-
Tilapia	10-100	-	1,51 - 15,1 ml
Morue	<0,1	<18,4µg	-
Saumon 1	<0,1	-	<52,3 µl
Saumon 2	<0,1	-	<32,7 µl
Thon 1	<0,1	-	<72,9 µl
Thon 2	<0,1	<62,6 µg	-
Calmar	1-10	-	1,53 -15,3 ml

L'analyse *in vitro* des propriétés myotropes des hydrolysats de protéines a été une première étape dans leur caractérisation fonctionnelle. Pour confirmer ces résultats, il est important de poursuivre l'analyse avec des tests de conditionnement alimentaire *in vivo* pour mettre en évidence l'effet myotrope à l'échelle de l'organisme.

3.1 Détermination des activités myotropes *in vivo* de deux hydrolysats de protéines chez le bar européen

Les travaux suivant ont étudié l'effet de régimes alimentaires contenant deux des hydrolysats de co-produits précédemment testés (l'hydrolysat de crevette et l'hydrolysat de *Gadidae*) sur la modulation du transit alimentaire chez le bar européen. Ces hydrolysats ont été choisis car : i) ils présentent des activités myotropes différentes,

ii) leurs seuils d'activité sont comparables lorsqu'il y a une activité myotrope, iii) il était industriellement possible de les inclure à des teneurs élevées dans les régimes alimentaires. Ces hydrolysats ont été incorporés à hauteur de 1%, 5% et 10% dans une formule alimentaire contenant 5% de farine de poisson, et comparés à une formule plus riche en farine de poisson (20%). La cinétique d'émission des fèces est déterminée lors d'un test de conditionnement alimentaire en station expérimentale (IFREMER, Brest) d'une durée de 46 jours. Des juvéniles de bar sont conditionnés (repas unique) pendant 32 jours et la croissance des animaux enregistrée. Les fèces sont récoltés en fin d'essai sur deux périodes de 5 jours consécutifs.

3.1.1 Propriétés myotropes *in vivo* de l'hydrolysat de *Gadidae*

L'analyse des performances de croissance avec l'hydrolysat de *Gadidae* révèle qu'une inclusion à hauteur de 1% a permis de compenser la diminution de FP de 15 à 5% dans le régime (**Figure 36**). L'inclusion de 5 ou 10% d'hydrolysat de *Gadidae* ne permet pas d'avoir un taux spécifique de croissance supérieur à celui observé avec les régimes alimentaires contenant 5% FM + 1% hydrolysat de *Gadidae* et 20% de FP.

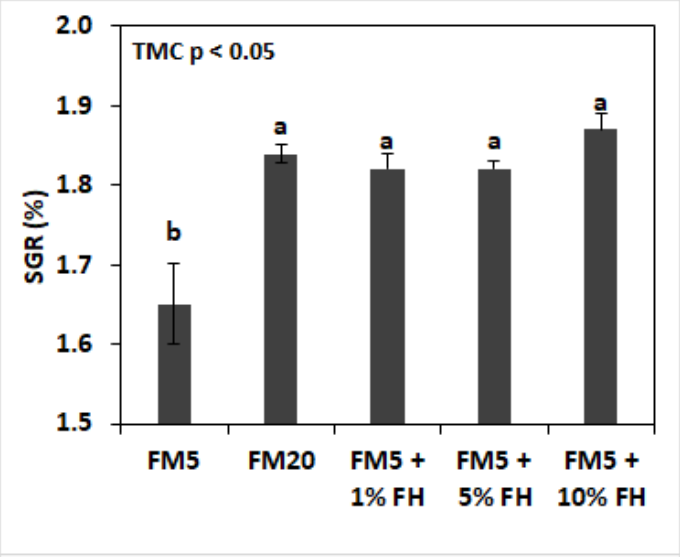


FIGURE 36 – Taux spécifiques de croissance obtenus avec l'hydrolysat de *Gadidae*. Les conditions avec des lettres identiques ne présentent pas de différence significative (P>0.05). Abréviations : FH, hydrolysat de poisson (*Gadidae*), FM : farine de poisson.

La **Figure 37** présente les résultats de cinétique d'émission des fèces obtenus avec l'hydrolysat de *Gadidae*. La diminution de 15% de farine dans le régime alimentaire n'influence pas significativement la vitesse du transit. Les résultats obtenus avec l'hydrolysat de *Gadidae* montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'incorporation de l'hydrolysat à 1% et 5% dans l'aliment en comparaison aux aliments contenant 5% (FM5) et 20% (FM20) de FP. Onze heures après le nourrissage, la quantité de fèces émis par les poissons nourris avec le régime contenant 10% d'hydrolysat de *Gadidae* est significativement plus élevée que celle des poissons nourris avec les régimes FM5 et FM20 ($P<0.05$). La diminution sensible ($P>0.05$) de la quantité de fèces émis sept heures après le nourrissage laisse supposer un léger effet myosuppresseur de l'hydrolysat de *Gadidae* uniquement observé à de forts taux d'incorporation dans l'aliment.

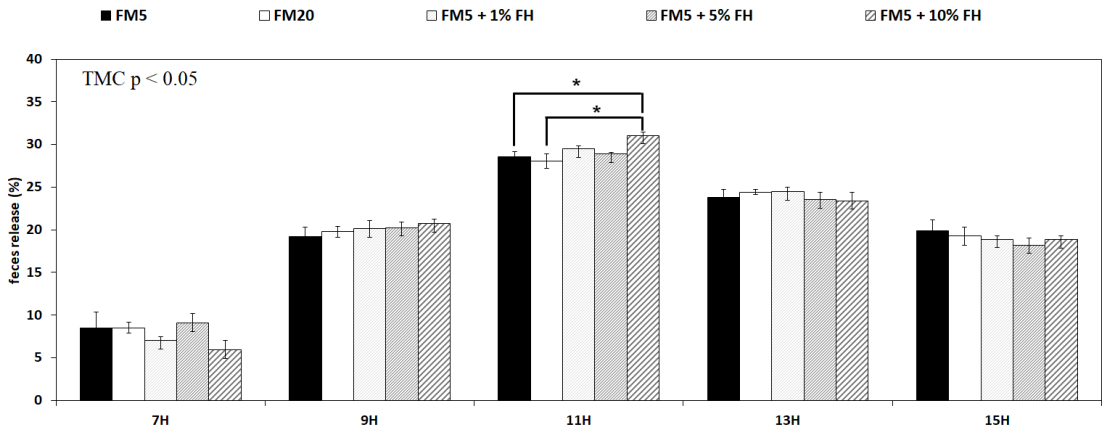


FIGURE 37 – Cinétiques d'émission des fèces obtenues avec l'hydrolysat de *Gadidae*. Les conditions signalées avec une étoile correspondent à des différences significatives ($P< 0.05$). Abréviations : FH, hydrolysat de poisson (*Gadidae*), FM : farine de poisson.

3.1.2 Identification d'un peptide myotrope dans l'hydrolysat de crevette et implication potentielle dans la performance de croissance du bar européen



L'étude des propriétés myotropes de l'hydrolysat de crevette a fait l'objet d'un article en révision dans la revue *Aquaculture* en 2018 : « *Shrimp by-product hydrolysate induces intestinal myotropic activity in European seabass (Dicentrarchus labrax)* ». Ces travaux font mention de :

- la capacité de l'hydrolysat de crevette à accélérer la vitesse de transit intestinal de régime alimentaire contenant de fortes teneurs en FV.

- du maintien et de l'amélioration des performances de croissance par rapport au témoin riche en FP lorsque l'hydrolysat de crevette est inclu à hauteur de 5 et 10% respectivement.

- de la découverte d'un peptide myotrope (KNPEQ) issu du clivage de l'hémocyanine par le couplage de tests fonctionnels *in vitro*, la purification des peptides par rpHPLC et l'identification du peptide lui-même par dégradation d'Edman et LC-ESI-orbiTRAP.

- des propriétés myotropes réversibles jusqu'à 10µM et durable à partir de 100 µM du peptide synthétique KNPEQ.

Aquaculture 497 (2018) 380–388

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Shrimp by-product hydrolysate induces intestinal myotropic activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*)

A. Leduc[a,b], M. Hervy[a,b], J. Rangama[c], R. Delépée[d], V. Fournier[a,b], J. Henry[a,b,*]

[a] Normandy University, UMR BOREA (MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207), UFR des Sciences, Caen, France
[b] Diana Aqua, Symrise Group, Elven, France
[c] Normandy University, CIMAP, UMP 6252 (CEA/CNRS/ENSICAEN/Normandy University), Caen, France
[d] Normandy University, ABTE, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Hydrolysate
By-product
Dicentrarchus labrax
Intestine
Nutrition
Bioactive peptide

ABSTRACT

The transit time of feed through the digestive tract of fish is very important in fish culture because it can impact fish feeding rates and growth rates, and feed utilization. We identified a myotropic peptide in a shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hydrolysate used in aquaculture fish feeds. It is a new pentapeptide (KNPEQ) cleaved from crustacean hemocyanin, that does not share sequence homology with peptides known to have myotropic activity in fish. We monitored the effect of this hydrolysate in European seabass (*Dicentrarchus labrax*), (i) *in vivo* during a feeding trial with low fish meal diets including shrimp hydrolysate, and (ii) *in vitro* on isolated intestine perfused with hydrolysate extracts. The dietary shrimp hydrolysate accelerated feces emission and led to contractions in perfused intestine. Different steps of purification of shrimp hydrolysate by reverse phase high performance liquid chromatography coupled with intestine *in vitro* assay were applied in order to purify the myotropic peptide. The sequence of the peptide was determined using both Edman degradation and mass spectrometry fragmentation. We confirmed then *in vitro* that the KNPEQ-mimetic peptide stimulated the contraction of the intestine in a transient manner at concentrations of 1 and 10 µM, and for > 10 h at a concentration of 100 µM.

1. Introduction

In fish, the feed transit time through the digestive tract is affected by many factors such as the environment (temperature, salinity), physiology, as well as feed ingredients or the processing method (Adamidou et al., 2009; Honorato et al., 2014). The feed transit time is an important parameter to take into account when formulating fish feeds because it influences the feeding rate (Jobling, 1980) and fish growth performances (Riche et al., 2004). These two parameters are monitored very precisely in aquaculture. These parameters are also very important for managing feed efficiency.

Many myotropic peptides have been identified in fish: tachykinins (TK), cholecystokinin (CCK), galanin, ghrelin, the calcitonin-gene-related peptide, neuropeptide Y (NPY), and a few others (Susanne Holmgren and Olsson, 2009). They participate in bolus mobility and feces emission. They are also involved in gastric emptying, which is linked to the return of fish appetite (Riche et al., 2004). However, their mechanism of action is still quite difficult to elucidate. Tachykinins can stimulate gut contraction, but differently in different fish species (Jensen et al., 1991). Ghrelin is produced in the stomach, and slightly but significantly increases intestinal basal tension *in vitro* in zebrafish (Catharina Olsson et al., 2008). Bosi et al. (2007) elucidated the mechanism of action of galanin in the stomach, and suggested that it played a role in modulating cholinergic activity in fish gut. NPY induced *in vitro* contraction of cod gut, but only at high concentrations (Shahbazi et al., 2002). Myotropic peptides also had various effects. CCK decreased the amplitude of spontaneous contractions in the intestine while increasing basal tonus (Olsson et al., 1999). In contrast, it had a stimulating effect in Atlantic cod (Jönsson et al., 1987). Cholecystokinin and related peptides also had an excitatory effect on the intestine of *Rajidae* and dogfish, but responses were weak and inconsistent (Andrews and Young, 1988; Aldman et al., 1989).

With the development of sustainable aquaculture, a major effort is being made to reduce the use of fishmeal (FM) for ecological and economic concerns (Duarte et al., 2009). Many studies are focused on the replacement of FM by other sources of proteins such as plant-based

* Corresponding author at: UMR BOREA (MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207), UFR des Sciences - Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix CS 14032, 14032 CAEN cedex 5, France.
E-mail address: joel.henry@unicaen.fr (J. Henry).

https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.009
Received 6 April 2018; Received in revised form 3 August 2018; Accepted 4 August 2018
Available online 06 August 2018
0044-8486/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

meal (PBM). Nevertheless, PBM could contain anti-nutritive factors and could not be adapted to the diet of carnivorous fish such as European seabass (*Dicentrarchus labrax)* (Francis et al., 2001; Krogdahl et al., 2005).

The incorporation of PBM in carnivorous fish feed could slow down the feed transit time in the gut and delay feces emission in the intestine due to their high fiber and sugar contents (Storebakken et al., 1999). On the other hand, PBM could also accelerate feces emission by causing diarrhea for the same reasons (Krogdahl et al., 2010). The consequences could be a decline of feed utilization as well as deterioration of gut health. In addition, the amino acid composition of PBM is not well balanced to meet the requirements of carnivorous fish species. Consequently, such feeds including high levels of PBM have to be supplemented with essential free amino acids to avoid nutrient deficiency (Médale and Kaushik, 2009). Moreover, the low palatability of PBM is also an issue that requires supplementation with attractants to stimulate the feeding behavior of carnivorous fish fed diets formulated with such raw materials.

Protein hydrolysates manufactured from fisheries and aquaculture co-products have been studied more and more these last years as promising alternative ingredients to FM. The low-molecular-mass peptides that are found at high level in protein hydrolysates manufactured from fish and crustacean co-products have very high protein digestibility and palatability, and could also improve fish health (Refstie et al., 2004; Cahu et al., 1999; Choi et al., 2009; Gisbert et al., 2012; Khosravi et al., 2015a; Khosravi et al., 2017; Khosravi et al., 2015c).

In a previous study, Robert et al. (2014) demonstrated that the main protein found in a commercial shrimp hydrolysate (Actipal HP1™) was hemocyanin (Robert et al., 2014), a well-documented protein able to generate functional hydrolytic peptides (Robert et al., 2014; Zanjani et al., 2016; Arancibia et al., 2014; Moltedo et al., 2006; Coates and Decker, 2017). In line with these data, we investigated the myotropic properties of dietary shrimp hydrolysate as well as the fish growth performances through a nutritional trial conducted in European seabass. We also carried out *in vitro* trials on isolated intestine sampled from European seabass to evaluate the myotropic activity of shrimp hydrolysate and its peptidic fractions. Finally, we set up peptidomic tools to identify and characterize the peptide involved in the myotropic activity.

2. Materials and methods

2.1. Diets

Five diets were formulated by Diana Aqua (Symrise group, Elven, France) (Table 1): 2 diets containing FM at 5% and 20% of dry matter (diets FM5 and FM20), and 3 diets containing graded levels of a commercial shrimp protein hydrolysate (SH, commercial name Actipal HP1™), included at 1, 5, and 10% of dry matter in the FM5 diet. Shrimp protein hydrolysate was produced from fresh cephalothorax of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by Diana Aqua. Briefly, shrimp heads were ground (10 mm), and then hydrolysis was conducted in a closed reactor after addition of an exogenous protease. At the end of the hydrolysis process, the enzyme was inactivated and the liquid hydrolysate pasteurized at 95 °C for 30 min. At the end of the hydrolysis process, solid wastes (shell) were separated by centrifugation, and the liquid fraction was spray-dried to reach the following specifications: dry matter 95%, crude protein 68.2%, crude fat 8.6%, ash 12.2%, soluble protein 92% of total proteins. All the diets were formulated by Diana Aqua (Symrise group, Elven, France) and the manufacturing was subcontracted to a technical center for extrusion. Briefly, raw materials were ground at 1 mm and then extruded through a twin-screw extruder according to the following parameters: water addition 24%; screw speed 350 rpm; extrusion temperature 125 °C; die plate temperature 110 °C; dryer 115 °C. Konjac powder was added at 1% of the diet for all the dietary treatments to get more cohesive feces and to make their collection more accurate. All the diets were balanced for deficient amino acids according to the requirements determined for European seabass (Wilson, 2002). All the diets were isoproteic (45.5 ± 0.2% of crude protein), isolipidic (15.7 ± 0.4% of crude fat) and isoenergetic (5.0 ± 0.0 Kcal/kg).

Table 1
Formulation and proximate composition of the experimental diets.

	FM20	FM5	FM5 + 1% SH	FM5 + 5% SH	FM5 + 10% SH
Raw materials					
FM prime (67% CP)	9.7	0.0	0.0	0.0	0.0
FM standard (65% CP)	10.3	5.0	5.0	5.0	5.0
Shrimp hydrolysate	0.0	0.0	1.0	5.0	10.0
Corn gluten	11.5	16.6	16.0	15.2	14.1
Wheat gluten	14.5	21.0	20.2	19.1	17.8
Rapeseed	9.5	10.5	10.1	9.6	9.0
Soya cake	12.7	15.0	14.4	13.7	12.8
Wheat, dehulled	12.2	9.7	11.4	11.0	10.4
Methionine	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
Lysine	1.0	1.6	1.5	1.5	1.4
MCP	1.7	2.6	2.5	2.4	2.2
Fish oil (inclusion)	14.6	15.3	15.2	15.0	14.7
Premix	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Konjac meal	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Proximate composition[a]					
Dry matter (%)	91.9	91.3	91.8	91.2	90.6
Crude protein (%)	45.7	45.2	45.3	45.7	45.5
Crude fat (%)	15.5	15.3	15.6	15.5	16.5
Ash (%)	6.6	6.3	6.3	6.5	6.5
Energy (Kcal/g)	5.1	5.0	5.0	5.0	4.9
Starch (%)	9.9	9.6	9.6	9.1	9.0
Fiber (%)	9.1	9.7	9.3	9.1	9.0

Abbreviations: FM: Fish meal, SH: shrimp hydrolysate, CP: crude protein, MCP: Mono calcium phosphate.

[a] Analysis performed by Up Sciences laboratory (Saint Nolff, France): Dry matter (EU N°152/2009, Desiccation 103 °C, 4 h), crude protein (ISO 16634-1, Dumas method), fat (EU N°152/2009, solvent extraction after acid hydrolysis), ash (Incineration 550 °C, 8 h), energy (EU N°152/2009), fiber (AOAC 985.29), starch (enzymatic method NF V18-121).

2.2. Animals and feeding trial

The trial was conducted on European seabass in the experimental flow-through facilities of the IFREMER (centre de Brest, France) for 46 days. Seawater (salinity: 35 g/L) was filtered through a high-pressure sand filter, and thermoregulated at a temperature of 20 ± 1 °C. Triplicate groups of 40 European seabass juveniles (initial mean body weight: 10.3 ± 0.0 g), from Aquastream farm (Ploemeur, France), were reared in 15 tanks of 80 L capacity (flow rate: 3 L/min; photoperiod: 12 h light; 12 h dark; light on at 2:00 am, light off at 2:00 pm). Three tanks were randomly allotted to each diet. The fish were fed with an automatic feeder (Arvotec, Finland) at a feed ration of 3% of their biomass *per* day and feed waste collected at the end of feed distribution. Daily feeding rate adjustments were managed by the feeder software program, with a food conversion ratio set at 1.0 throughout the trial. The trial took place in two steps. Firstly, the fish were conditioned with the different diets for 32 days. They were fed once a day (at 3:00 am) for 60 min. Secondly, the release of feces by fish was monitored over two 5-day periods. Feces were collected for 15 h post-feeding using a sieve placed under the water outlet, pooled, weighed, and frozen (one bucket *per* tank) then dried (105 °C, 24 h) at the end of the trial to calculate the

relative amounts of feces emission. During handling and weighing, the fish were anesthetized with 50 mg/L of MS-222 (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). At the end of the trial, the fish were euthanized with an overdose of MS-222 (100 mg/mL).

2.3. In vitro myotropic assay

European seabass (body weight: 3 ± 0.0 g) were purchased from Aquastream farm (Ploemeur, France) and maintained in 300-L raceways at 15 ± 1 °C at the Marine Station of Luc-sur-Mer (University of Caen-Normandy, France) (sand-filtered seawater; flow rate: 50 L/min; natural photoperiod). The fish were fed a 1-mm commercial feed (BN-nature pre-grower, Le Gouessant, Lamballe, France) according to the feeding table. They were fasted for 24 h prior to tissue sampling. On the sampling day, they were euthanized with an overdose of MS-222 (100 mg/mL). The myotropic assay was immediately performed using the anterior section of freshly isolated seabass intestines. Each organ was suspended on a dynamometer (UF1 force sensor, LCM Systems, Newport, Isle of Wight, United Kingdom) with a nylon thread (0.12-mm diameter) initially calibrated at a tension of 1 V, in a 5-mL muscle chamber. The signal was transmitted by an amplifier (TB4 M, World Precision Instrument, Sarasota, Finland), and contractions were displayed on an L200E printer (Linseis, Trenton, NJ, USA) or with a homemade digital voltmeter based on Arduino technology (https://www.arduino.cc) coupled to the Qt application programming interface (https://www.qt.io). The muscle chamber was continuously perfused at a flow rate of 0.5 mL.min^{-1} with a fresh 340 mOsm perfusion solution at pH 8.9 (1 mM glucose, Sigma Aldrich; 9.945 g.L^{-1} of salt for artificial sea water, Instant Ocean - Aquarium system, Sarrebourg, France) without any recirculation. All the trials were carried out in a thermo-regulated room at 18 °C. The perfusion solution and system were balanced at 18 °C prior to starting the trials to avoid any thermal shock and degassing trouble. HPLC fractions of shrimp hydrolysate and synthetic peptide were injected in the perfusing flow using a three-way valve to avoid mechanical stress. All the fractions obtained by rpHPLC were assayed, and each analysis was performed in triplicate.

2.4. Ethics statements

The present work was performed in accordance with French and European policies and the guidelines of the French Animal Care Committee (Agreement number: APAFIS#3087) and the regional ethical committee (Comité d'Ethique Normandie en Matière d'Expérimentation Animale, CENOMEXA; agreement number 54).

2.5. Peptide extraction from shrimp hydrolysate

One gram of shrimp hydrolysate was diluted in 10 mL of 0.1% HPLC-grade trifluoroacetic acid (TFA – Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) solution overnight at 4 °C, and centrifuged 10 min at 20,000 ×*g*. The supernatant was Whatman-paper filtered, and diluted to 1 absorbance unit (AU) at a wavelength of 214 nm in 0.1% TFA solution. Each diluted extract was concentrated on a Sep-Pak C18ec classic cartridge (Waters, Milford, Massachusetts, USA), eluted by water/acetonitrile/TFA (89.9/10/0.1, *v*/v/v), evaporated on a SpeedVac concentrator, and kept at 4 °C until use. HPLC-grade acetonitrile (ACN) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA).

2.6. rpHPLC

Reverse-phase high-performance liquid chromatography (rpHPLC) separation was performed on a UFLC Shimadzu system composed of an LC-202A pump, a DGU-20A3R degassing unit, a CTO-10ASVP oven, a CBM-20A communication bus, a SPD-20A UV-VIS spectrometer detector, and an FRC-10A fraction collector (Shimadzu, Kyoto, Japan). Elution was carried out on an EC 250/4 Nucleodur 100-10 C18-ec column (ref 760003.40, Macherey-Nagel, Hoerdt, France) with ACN/water/TFA (80/19.9/0.1, *v*/v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The ACN gradient was performed from 10% to 17% in 14 min for the first separation step, and from 0% to 8% in 55 min for the second separation step. All the fractions were collected throughout the ACN gradient, evaporated on a speedvac concentrator, and kept at 4 °C until use. Dried peptide extracts and fractions were dissolved in 600 µL of 0.1% TFA solution, and 50 µL were injected.

2.7. rpHPLC-ESI–Q3 MS^2

Reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry (rpHPLC-ESI–Q3 MS^2) was performed at the PRISM platform (Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse, Caen, Lower Normandy, France). Analyses were carried out with a UHPLC Nexera X2 system consisting of two binary pumps with an auto-sampler and a column oven (Shimadzu, Kyoto, Japan). The UHPLC system was interfaced with an electrospray interface to a triple quadrupole mass spectrometer (LCMS 8030Plus; Shimadzu). Elution was carried out on a 5-µm EC 250/2 Nucleodur C18 Gravity column (ref 760,101.20, Macherey-Nagel) with ACN/water/TFA (80/19.9/0.1, *v*/v/v) solution at a flow rate of 0.5 mL/min. The acetonitrile gradient was performed from 0 to 20% in 20 min. Dried fractions were dissolved in 500 µL of 0.1% TFA solution, and 50 µL were injected. Fragmentation energy levels were −15 and −35 eV.

2.8. Edman degradation

Peptide sequences were determined using a Procise Protein Sequencing System, Model 494 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) coupled to a Model 140 PTH amino acid analyzer (Perkin Elmer - Applied Biosystems, Foster City, California, USA) with the routine protocol.

2.9. Peptide identification

The peptide sequences obtained by Edman degradation were confirmed by comparing the fragmentation profiles based on the occurrence of y, b, and a ions from the rpHPLC-ESI–Q3 MS^2 with the theoretical fragmentation table of KNPEQ using Protein Prospector (http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct). Then *in silico* analysis was conducted to identify KNPEQ. Peptraq software (Zatylny-Gaudin et al., 2016) was used to search for the KNPEQ pattern in an annotated *Litopenaeus vannamei* transcriptomic database (Robert et al., 2014).

2.10. Statistical analysis

Growth rate and feces release data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. Differences among treatments were considered significant at $p < .05$. Statically differences ($P < .05$) in contraction duration were analyzed by Student *t*-test. Results are expressed as means ± SEM.

3. Results

3.1. In vivo feeding trial

The results of the feeding trial are presented in Table 2. The specific growth rate (SGR) was significantly increased, both by the level of FM (FM5 *vs.* FM20) and the level of shrimp hydrolysate included in FM5 ($P < .05$). The fish fed the FM5 + 10% SH diet showed the highest growth performance. Supplementation of the FM5 diet with 5% shrimp hydrolysate allowed them to reach a similar growth performance as the positive control (FM20). Supplementation with 1% of shrimp

Table 2
Total feed intake, specific growth rate and feed conversion ratio of European seabass fed the five experimental diets.

Diets	FM20	FM5	FM5 + 1% SH	FM5 + 5% SH	FM5 + 10% SH
Total feed intake (g)	620.6 ± 31.8^{ab}	543.7 ± 41.5^{bc}	572.4 ± 36.9^{b}	640.2 ± 18.4^{a}	674.6 ± 2.3^{a}
SGR (%)	1.84 ± 0.02^{b}	1.65 ± 0.09^{c}	1.69 ± 0.05^{c}	1.83 ± 0.03^{b}	1.93 ± 0.01^{a}
Feed conversion ratio	1.15 ± 0.04^{ab}	1.28 ± 0.09^{bc}	1.23 ± 0.08^{b}	1.12 ± 0.02^{a}	1.07 ± 0.00^{a}

Abbreviations: FM: Fish meal, SH: shrimp hydrolysate, SGR: specific growth rate. Values are means of triplicate groups and presented as mean ± SD. Values with different superscripts in the same line are significantly different ($P < .05$).

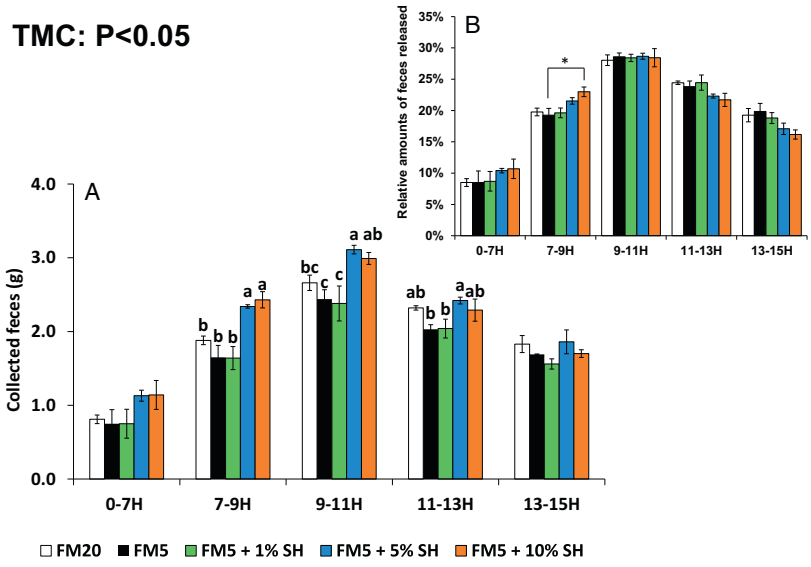


Fig. 1. Results of the *in vivo* feeding trial with shrimp hydrolysate. Triplicate groups of 40 European seabass juveniles were randomly allotted in 80 L tanks to each diet. A. Specific Growth Rate (SGR, %) of fish at the end of the trial. Bars (SEM) with different superscript letters indicate significant differences according to Tukey's multiple comparison test. B. Time-course of feces release expressed in relative amounts. Error bars represent SEM; (*) represents a significant difference according to Tukey's multiple comparison test. Abbreviations: FM5, 5% fish meal diet; FM20, 20% fish meal diet; SH, shrimp hydrolysate diet; SGR, specific growth rate.

hydrolysate (FM5 + 1% SH) did not significantly improve the fish growth rate as compared to the negative control (FM5). There was no statistical difference between FM5 and FM20 in total feed intake and FCR. Total feed intake increased with graded inclusion levels of shrimp hydrolysate in the diets, but significant differences were only observed for 5 and 10% of shrimp hydrolysate inclusion as compared to FM5.

The feces released by the fish were monitored for 15 h (corresponding to the period of maximum feces release) after feeding for all dietary treatments (Fig. 1). No significant difference was observed between the negative (FM5) and positive (FM20) controls ($P > .05$). Nine hours after feeding, the amount of feces release was significantly higher for FM5 + 5 and 10% SH as compared to the other diets. Then, between 9 and 13 h, 5% and 10% shrimp hydrolysate inclusion in the FM5 diet resulted in significant differences only when compared to FM5. Regarding relative values of feces emission (Fig. 1), a significant difference was observed 9 h post-feeding between the fish fed the diet containing the highest amount of shrimp hydrolysate (FM5 + 10% SH) ($P < .05$). Beyond 9 h post-feeding, no significant difference was observed anymore until the end of feces collection, even if feces release tended to be lower in fish fed diets including 5% and 10% of shrimp hydrolysate.

3.2. Peptide purification from shrimp hydrolysate

First, the myotropic properties of the whole shrimp hydrolysate were investigated. For that purpose, raw shrimp hydrolysate was tested on perfused anterior intestines of european seabass. Shrimp hydrolysate induced the contraction of the intestine (Fig. 2A). The purification of the myotropic peptide required 2 successive rpHPLC separation steps. The chromatogram of the second step is presented in Fig. 2B. The injection of purified fraction 12 into perfused seabass intestine induced very quickly an increase of the tonus, followed by a cyclic contraction of the intestine that lasted at least 12 h (corresponding to the end of the acquisition time) (Fig. 2C).

3.3. Peptide identification from shrimp hydrolysate

The above-mentioned fraction 12 was analyzed by Edman degradation. The main component of this fraction 12 was a pentapeptide whose putative sequence was Gly/Lys-Asn-Pro-Glu-Gln. Fraction 12 was also analyzed by nLC-ESI-MS/MS. The mass of the main component was 615 Da. The fragmentation spectrum of the main component of fraction 12 is presented Fig. 3A. By comparing it with the theoretical fragmentation peak list of Gly/Lys-Asn-Pro-Glu-Gln, we confirmed that Lys-Asn-Pro-Glu-Gln (KNPEQ) was the primary sequence. Then, the KNPEQ pattern was looked for in a home-made *Litopenaeus vannamei* protein database using a home-made software program called peptraq. Only one protein showed the KNPEQ pattern, and it was annotated as hemocyanin. The corresponding protein was identical to L. *vannamei* hemocyanin CAA57880.1 (Genbank). The position of KNPEQ is presented in Fig. 3B. Alignment of *L.vannamei* hemocyanin with hemocyanins from 5 other species is presented in Fig. 3C. Hemocyanin is a conserved protein among some *Arthropoda* and *Mollusca,* but the KNPEQ pattern is only found in the C chain of hemocyanin from lobster (*Panulirus interruptus)* and L. *vannamei*.

3.4. Contractile activity of the synthetic KNPEQ peptide

Edman degradation experiments led to the sequencing of 3 other peptides eluted in the fraction 12 (2 dipeptides and 1 tripeptide) also containing KNPEQ. The contractible activity of the synthesized peptides was investigated on continuously perfused seabass anterior intestine.

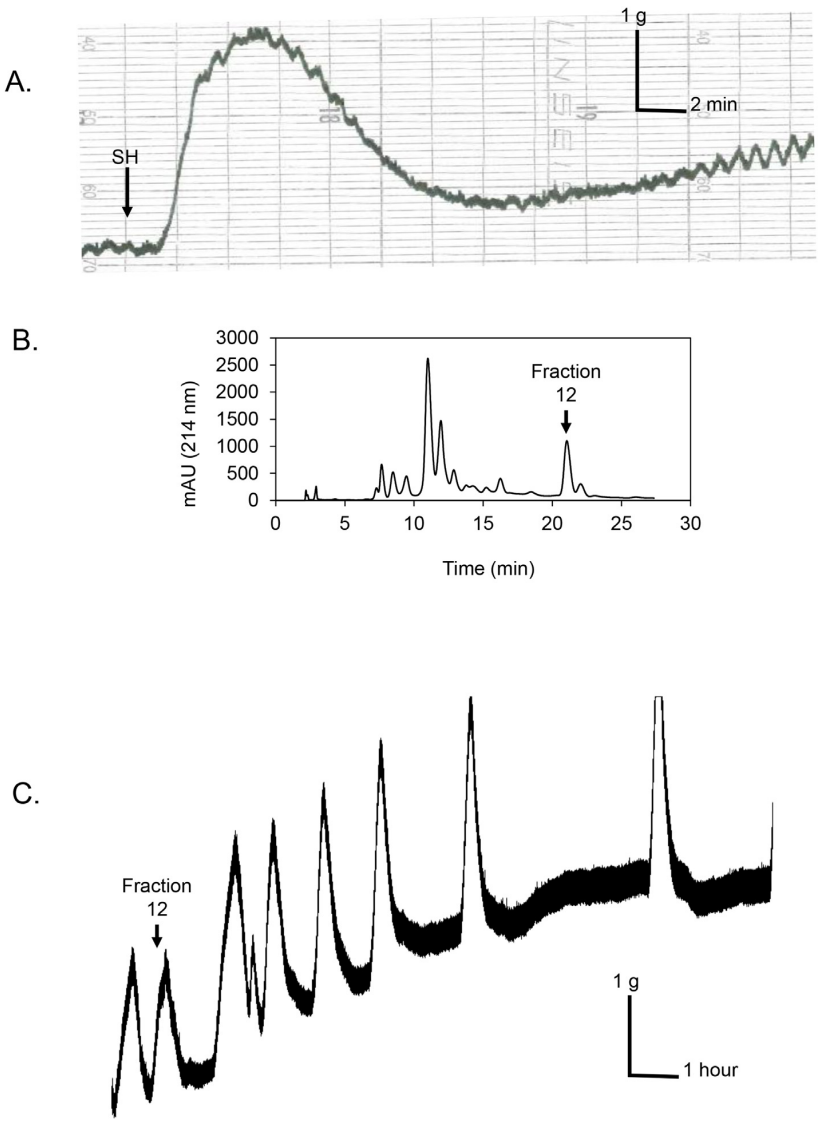


Fig. 2. Purification of the myotropic peptide from shrimp hydrolysate. A. Myotropic effect of shrimp hydrolysate before the purification steps (n = 28 different fish). B. Second purification step by reverse-phase high-performance liquid chromatography (n = 4). Arrow: myotropic fraction. C. Myotropic effect of fraction 12 (n = 3 different fish).

All the peptides identified (KNPEQ and the 3 others) were tested alone and mixed together. Only KNPEQ induced *in vitro* gut contraction. Increasing doses of KNPEQ (1, 10, and 100 µM) were successively injected into the same intestine, waiting for the intestine to return to a normal contraction pattern between injections. At 1 µM, KNPEQ injection induced a sharp contraction and a slight increase of the intestine tonus for 10 min (Fig. 4A). At 10 µM, KNPEQ injection induced a new sharp contraction and a slight tonus increase of the intestine for 16 min (Fig. 4B). At 100 µm, the effect of KNPEQ on the intestine was very different: only a slight increase of the tonus after the injection was observed, but a prolonged effect on the amplitude of contractions was monitored for 10 h (Fig. 4C). Contraction durations were significantly different ($P < .05$) *i.e.* 2.3 ± 0.4 and 6.7 ± 1.6 times longer with 10 µM and 100 µM respectively compared to the duration obtained with the injection of 1 µM of KNPEQ mimetic peptide.

4. Discussion

In a context of sustainable development of aquaculture, great efforts are made to reduce FM utilization. The large availability of marine and aquaculture by-products could allow for partial replacement of wild-fish-derived FM (Hardy and Tacon, 2002; Naylor et al., 2009). However, these by-products deserve to be well processed to enhance their nutritional value and bring new functionalities to the end products. In this perspective, enzymatic hydrolysis of proteins is a very efficient way to improve aquafeed palatability, nutritional quality, and functional properties (Gildberg, 1994; Chalamaiah et al., 2012; Kim, 2013). Some aquatic protein hydrolysates are known to promote fish growth performances but also health (Kotzamanis et al., 2007; Khosravi et al., 2015a, 2015b, 2015c; Khosravi et al., 2017), and shrimp hydrolysate improved gut cell organization by increasing intestinal villi height (Leduc et al., 2018). In fish, the feed gastrointestinal transit time could

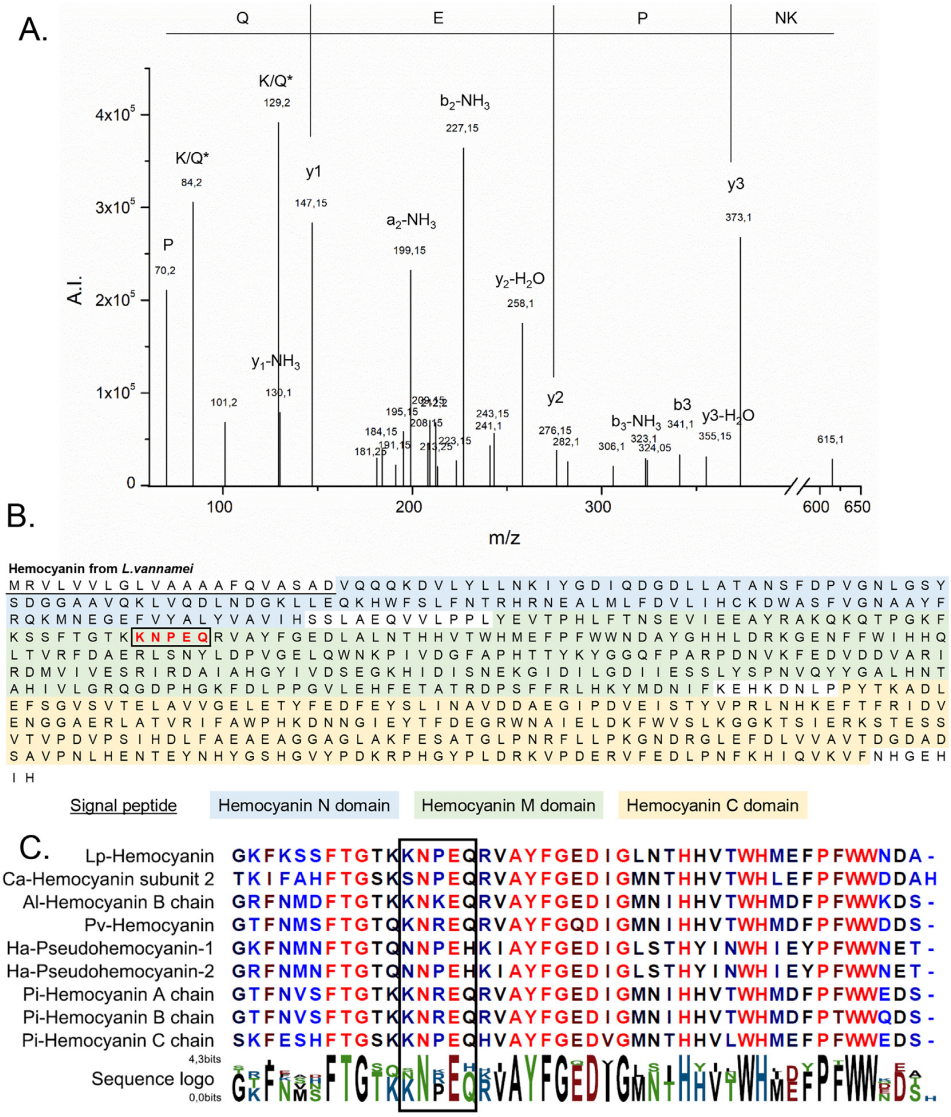


Fig. 3. Peptide identification. A. MS/MS spectrum of natural KNPEQ. K/Q is dued to the ESI-MS/MS accuracy. B. KNPEQ localization in hemocyanin from *Litopenaeus vannamei* (CAA57880.1); red: KNPEQ sequence C. Multiple hemocyanin-related sequence alignment centered on the position of KNPEQ (squared). *Lv*-hemocyanin: hemocyanin from *Litopenaeus vannamei* (CAA57880.1); *Al*-hemocyanin B chain: B chain of hemocyanin from *Astacus leptodactylus* (P83180.1); *Ha*-Pseudohemocyanin 2: Pseudohemocyanin-2 from *Homarus americanus* (Q6KF81.1); *Ca*-hemocyanin: subunit 2 of Hemocyanin from *Carcinus aestuarii* (P84293.1); *Pv*-hemocyanin: Hemocyanin from *Palinurus vulgaris* (P80888.2); *Pi*-hemocyanin A, B, and C: A, B, and C chains of hemocyanin from *Panulirus interruptus* (P10787.1, P04254.2, P80096.1). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

be impacted by many parameters such as fish physiology, environmental factors, but also feed composition (Adamidou et al., 2009) and processing parameters (Honorato et al., 2014). The feed gastrointestinal transit time is an important parameter to monitor when testing new raw materials and feeds in fish (Dias et al., 1998). Differences in feed transit time could impact feeding rates (Jobling, 1980), feed nutrient digestibility (Storebakken et al., 1999), and the return of appetite (Riche et al., 2004). In our study, the replacement of fishmeal in the FM5 diet was compensated for by a combination of plant-based meal, but this did not affect the gastrointestinal transit time of the FM5 diet. This could be explained by the fact that we used a combination of transformed plant-based proteins (gluten and oilcake) containing low levels of fiber, starch, and antinutritional factors. The use of a mixture of plant-based meals is known to counter-balance negative effect of PBM (AA profile and antinutritional factor) observed on carnivorous fish fed with a single origin of dietary PBM (Gómez-Requeni et al., 2004; Liti et al., 2006; Lund et al., 2011; Hansen et al., 2011; Valente et al., 2016). More precisely concerning intestinal transit time, Hansen et al. (2006) did not observed any modification on gastric evacuation rates or in the time spent in the upper intestine of Atlantic cod fed a mixture of wheat gluten meal and soy protein concentrate.

However, feed utilization and growth rates were negatively influenced by FM replacement, providing evidence for lower performances of the FM5 diet despite the combination of different sources of PBM and the supplementation of essential amino acids. These results confirm the lower performance of such low FM feeds observed in other studies

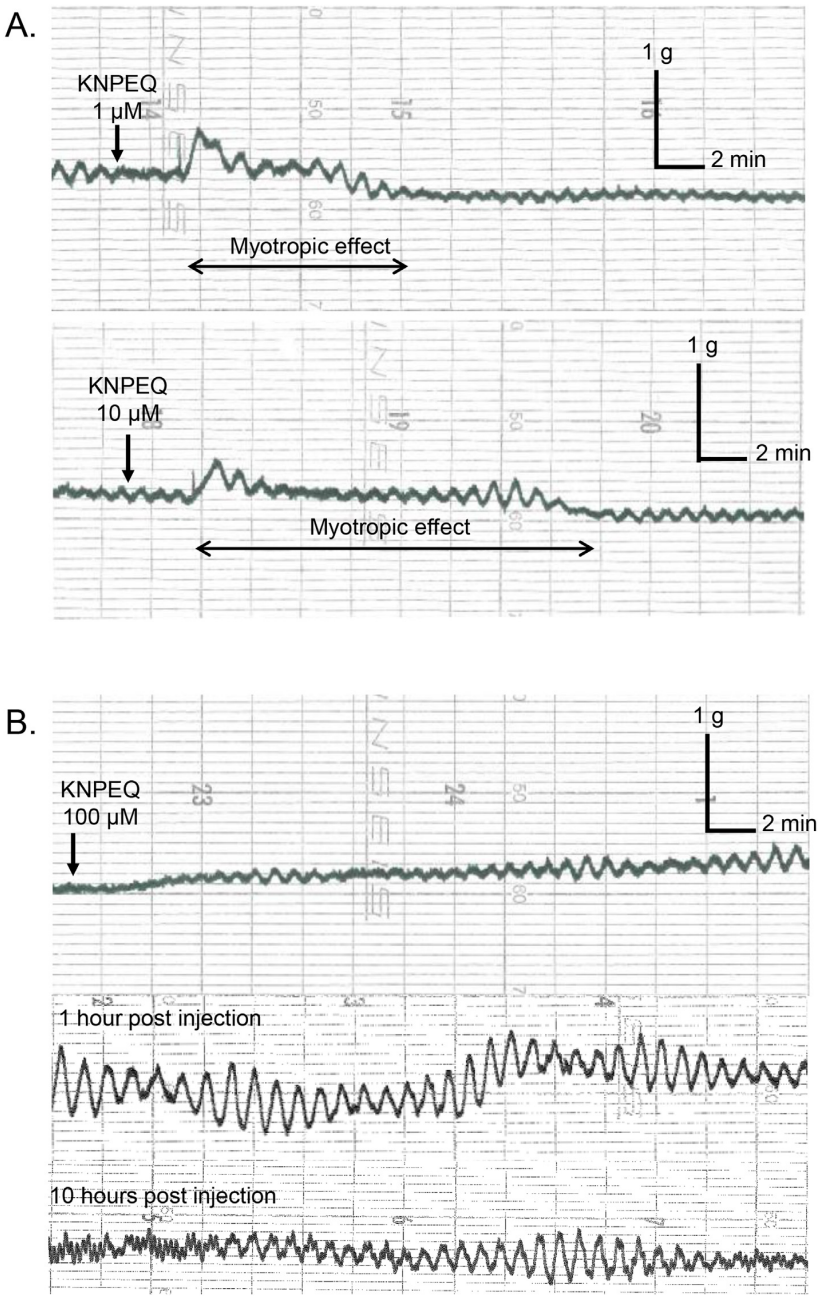


Fig. 4. Dose-dependent myotropic activity of the synthetic KNPEQ peptide. All experiments were conducted in triplicate with different fish. A. The effect of synthetic KNPEQ at 1 and 10 µM was clear and transient. B. The effect of synthetic KNPEQ at 100 µM was slight and prolonged.

conducted in carnivorous fish species (Estévez et al., 2011; Francis et al., 2001; Ribeiro et al., 2014; Santigosa et al., 2011). In this study, the supplementation of the FM5 diet with shrimp hydrolysate restored growth performances as well as feed utilization from 5% dietary inclusion, indicating the return to a good palatability and nutritional balance of the feed. The better feed intake recorded in fish fed dietary shrimp hydrolysate confirmed the good attractiveness and palatability performances of protein hydrolysate already observed in salmon (Refstie et al., 2004). In addition, the improvement of feed utilization, when shrimp hydrolysate is included in feed formulae, gives new evidence for the good nutritional value of protein hydrolysate and confirms data recorded in Asian seabass (Srichanun et al., 2014). More generally, these results with dietary protein hydrolysates included in low FM diets are consistent with other studies conducted in other carnivorous fish species (Khosravi et al., 2017; Khosravi et al., 2015a, 2015b, 2015c).

Our study showed that the speed of feces release by European seabass was influenced by the graded level of dietary shrimp hydrolysate. Interestingly, the speed of feces release by European seabass was influenced by the graded level of dietary shrimp hydrolysate, confirming

the dose-response effect of myotropic peptide KNPEQ on intestine motility observed *in vitro*.

The present study investigates the myotropic activity of shrimp hydrolytic peptides. Different analytical methods were associated, *i.e.* peptide separation by chromatography, peptide characterization by mass spectrometry, Edman sequencing, and *in vitro* myotropic assays based on fish gut electrophysiology. Taken together, they allowed us to purify and identify a peptide fraction from shrimp hydrolysate responsible for myotropic activity in fish intestine. This peptide (KNPEQ) is cleaved from hemocyanin, namely the main protein identified to date in the raw material (shrimp head) used to manufacture the shrimp hydrolysate (Robert et al., 2014). Peptides derived from hemocyanin have already demonstrated antibacterial (Robert et al., 2014), anti-cancer (Zanjani et al., 2016; Arancibia et al., 2014; Moltedo et al., 2006), and immunostimulatory properties (Coates and Decker, 2017). To our knowledge, this is the first time, that such myotropic activity has been demonstrated in a peptide derived from hemocyanin. The peptide KNPEQ does not share any sequence homology with myotropic peptides already identified in fish (Holmgren and Olsson, 2009), which makes it a new class of myotropic peptide.

The synthetic KNPEQ peptide showed myotropic activity at a very low concentration (1 μM) and a more prolonged effect at 100 μM only. Interestingly, the *in vitro* myotropic assay on perfused dissected intestine did not reflect the natural KNPEQ activity cut-off. This high concentration of peptides required to induce *in vitro* contraction was also observed with NPY in cod (Shahbazi et al., 2002). Therefore, KNPEQ could have an effect at a lower concentration on the whole intestine. Moreover, it could work within a combination of peptides, as described for antibacterial peptides from protein hydrolysate (Robert et al., 2014). The mechanism of action of KNPEQ is still to be identified to understand if the peptide acts directly on gut muscular fiber or indirectly *via* cholinergic or serotoninergic neurons such as TK (Holmgren et al., 1985; Takio et al., 1988; Jensen and Holmgren, 1991). The KNPEQ peptide may also demonstrate myotropic activity on other seabass organs. For example, galanin showed myotropic activity on both the stomach and gut of flatfish (Bosi et al., 2007). Moreover, it would be interesting to check if such myotropic activity of the KNPEQ peptide is confirmed in other fish and terrestrial vertebrates, as the literature shows that the responses of myotropic compounds may sometimes show high intra-species variability (Andrews and Young, 1988; Aldman et al., 1989).

Finally, it would be interesting to quantify the level of peptide KNPEQ in shrimp hydrolysate and to compare the effect of dietary KNPEQ peptide and whole shrimp hydrolysate on the feed gastrointestinal transit time in European seabass. That would also allow checking if this peptide is working alone or in combination with other peptides composing the shrimp hydrolysate.

To conclude, this study demonstrated that shrimp protein hydrolysate contains a peptide KNPEQ showing myotropic activity on European seabass intestine *in vitro*. This functional effect of shrimp hydrolysate was confirmed from a nutritional trial conducted in seabass. We observed a stimulation of intestine motility resulting in accelerated feed gastrointestinal transit time, along with improved growth performances and feed utilization. These results offer feed nutritionists and formulators a new solution to manage feed gastrointestinal transit time in fish and to formulate performing low-fish-meal feed for carnivorous species. Finally, the *in vitro* myotropic assay on perfused intestine developed in this study could be a fast and performing tool to investigate the response of fish intestine to a new raw materials intended to be used in fish feed formulae.

Funding

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (grant number 2014/1274) and Diana Aqua (Symrise Group, Elven, France).

References

Adamidou, Styliani, Nengas, Ioannis, Alexis, Maria, Foundoulaki, Eleni, Nikolopoulou, Dimitra, Campbell, Patrick, Karacostas, Ioannis, Rigos, George, Bell, Gordon J., Jauncey, Kim, 2009. Apparent nutrient digestibility and gastrointestinal evacuation time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing different levels of legumes. Aquaculture 289 (1–2), 106–112. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.015.

Aldman, Göran, Jönsson, Ann Cathrine, Jensen, Jörgen, Holmgren, Susanne, 1989. Gastrin/CCK-like peptides in the spiny dogfish, *Squalus acanthias*; concentrations and actions in the gut. Compar. Biochem. Physiol. C 92 (1), 103–108. https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90210-7.

Andrews, P.L.R., Young, J.Z., 1988. The effect of peptides on the motility of the stomach, intestine and rectum in the skate (Raja). Compar. Biochem. Physiol. C 89 (2), 343–348. https://doi.org/10.1016/0742-8413(88)90235-6.

Arancibia, Sergio, Espinoza, Cecilia, Salazar, Fabián, Del Campo, Miguel, Tampe, Ricardo, Zhong, Ta Ying, De Ioannes, Pablo, et al., 2014. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. PLoS One 9 (1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087240.

Bosi, G., Bermùdez, R., Domeneghini, C., 2007. The galaninergic enteric nervous system of pleuronectiformes (Pisces, Osteichthyes): an immunohistochemical and confocal laser scanning immunofluorescence study. Gen. Comp. Endocrinol. 152 (1), 22–29. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.02.007.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171 (1–2), 109–119. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00428-1.

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food Chem. 135 (4), 3020–3038. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100. Elsevier Ltd.

Choi, Yeung Joon, Hur, Sungik, Choi, Byeong Dae, Konno, Kunihiko, Park, Jae W., 2009. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. J. Food Sci. 74 (1). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00988.x.

Coates, Christopher J., Decker, Heinz, 2017. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. Cell. Mol. Life Sci. 74 (2), 293–317. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2326-7. Springer.

Dias, Jorge, Huelvan, Christine, Dinis, Maria T., Métailler, Robert, 1998. Influence of dietary bulk agents (silica, cellulose and a natural zeolite) on protein digestibility, growth, feed intake and feed transit time in european seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquat. Living Resour. 11, 219–226. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(98)89004-9.

Duarte, Carlos M., Holmer, Marianne, Olsen, Yngvar, Soto, Doris, Marbà, Núria, Guiu, Joana, Black, Kenny, Karakassis, Ioannis, 2009. Will the oceans help feed humanity? Bioscience 59 (11), 967–976. https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.8.

Estévez, A., Treviño, L., Kotzamanis, Y., Karacostas, I., Tort, L., Gisbert, E., 2011. Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. Aquac. Nutr. 17 (2). https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00798.x.

Francis, George, Makkar, Harinder P.S., Becker, Klaus, 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9.

Gildberg, Asbjorn, 1994. Enzymic Processing of Marine Raw Materials. Process Biochem. https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80030-8.

Gisbert, Enric, Skalli, Ali, Fernández, Ignacio, Kotzamanis, Yannis, Zambonino-Infante, Jose Luis, Fabregat, Rogelio, 2012. Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture 338–341, 96–104. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.007. Elsevier B.V.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. 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 232 (1), 493–510. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5.

Hansen, Ann Cecilie, Rosenlund, Grethe, Karlsen, Ørjan, Olsvik, Pål A., Hemre, Gro Ingunn, 2006. The inclusion of plant protein in cod diets, its effects on macronutrient digestibility, gut and liver histology and heat shock protein transcription. Aquac. Res. 37 (8), 773–784. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01490.x.

Hansen, A.C., Hemre, G.I., Karlsen, W. Koppe, Rosenlund, G., 2011. Do plant-based diets for atlantic cod (*Gadus morhua* L.) need additions of crystalline lysine or methionine? Aquacult. Nutr. 17 (2). https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00770.x.

Hardy, R.W., Tacon, A.G.J., 2002. Fishmeal: historical uses, production trends and future outlook for supplies. In: Responsible Marine Aquaculture. CABI, Wallingford, pp. 311–325. https://doi.org/10.1079/9780851996042.0311.

Holmgren, Susanne, Olsson, Catharina, 2009. Chapter 10 the neuronal and endocrine regulation of gut function. In: Fish Physiology, 1st ed. vol. 28 Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S1546-5098(09)28010-1.

Holmgren, S., Grove, D.J., Nilsson, S., 1985. Substance P acts by releasing 5-hydroxytryptamine from enteric neurons in the stomach of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Neuroscience 14 (2), 683–693. https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90319-7.

Honorato, Claucia Aparecida, de Almeida, Luciana Cristina, da Silva Nunes, Cleujosí, Carrilho, Elma Neide Vasconcelos Martins, Moraes, Gilberto, 2014. Gastrointestinal transit of extruded or pelletized diets in pacu fed distinct inclusion levels of lipid and

carbohydrate. Pesq. Agrop. Brasileira 49 (11), 829–835. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014001100001.
Jensen, Jörgen, Holmgren, Susanne, 1991. Tachykinins and intestinal motility in different fish groups. Gen. Comp. Endocrinol. 83 (3), 388–396. https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90144-U.
Jensen, J., Axelsson, M., Holmgren, S., 1991. Effects of substance-P and vasoactive intestinal polypeptide on gastrointestinal blood-flow in the atlantic cod *Gadus morhua*. J. Exp. Biol. 156, 361–373.
Jobling, M., 1980. Gastric Evacuation in Plaice, Pleuronectes Plutessa L.: Effects of Dietary Energy Level and Food Composition. pp. 187–196.
Jönsson, Ann Catherine, Holmgren, Susanne, Holstein, Björn, 1987. Gastrin/CCK-like immunoreactivity in endocrine cells and nerves in the gastrointestinal tract of the cod, *Gadus morhua*, and the effect of peptides of the gastrin/CCK family on cod gastrointestinal smooth muscle. Gen. Comp. Endocrinol. 66 (2), 190–202. https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90267-X.
Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Jeong, J.B., Lee, K.-J., 2015a. Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (Paralichthys *olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. Aquac. Nutr. 21 (3), 321–331. https://doi.org/10.1111/anu.12157.
Khosravi, Sanaz, Bui, Hien Thi Dieu, Rahimnejad, Samad, Herault, Mikaël, Fournier, Vincent, Kim, Sung-Sam, Jeong, Joon-Bum, Lee, Kyeong-Jun, 2015b. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 435 (October), 371–376. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.019.
Khosravi, Sanaz, Rahimnejad, Samad, Herault, Mikaël, Fournier, Vincent, Lee, Cho-Rong, Bui, Hien Thi Dio, Jeong, Jun-Bum, Lee, Kyeong-Jun, 2015c. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. Fish Shellfish Immunol. 45 (2), 858–868. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.039.
Khosravi, Sanaz, Bui, Hien Thi Dieu, Herault, Mikal, Fournier, Vincent, Kim, Kyoung-Duck, Lee, Bong-Joo, Kim, Kang-Woong, Lee, Kyeong-Jun, 2017. Supplementation of protein hydrolysates to a low-fishmeal diet improves growth and health status of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. World Aquacult. Soc. https://doi.org/10.1111/jwas.12436.
Kim, Se Kwon, 2013. Seafood processing by-products: trends and applications. In: *Seafood Processing By-products: Trends and Applications*, no. March 2014, pp. 1–597. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9590-1.
Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C., 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. Compar. Biochem. Physiol. 147 (1), 205–214. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.037.
Krogdahl, A., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. Aquac. Nutr. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x.
Krogdahl, Åshild, Penn, Michael, Thorsen, Jim, Refstie, Ståle, Bakke, Anne Marie, 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. Aquac. Res. 41 (3), 333–344. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x.
Leduc, Alexandre, Zatylny-Gaudin, Céline, Robert, Marie, Corre, Erwan, Le Corguille, Gildas, Castel, Hélène, Lefevre-scelles, Antoine, et al., 2018. Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets. BMC Genomics 19 (396), 1–20.
Liti, David M., Waidbacher, Herwig, Straif, Michael, Mbaluka, Raphael K., Munguti, Jonathan M., Kyenze, Mark M., 2006. Effects of partial and complete replacement of freshwater shrimp meal (*Caridinea Niloticus Roux*) with a mixture of plant protein sources on growth performance of nile tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) in fertilized ponds. Aquac. Res. 37 (5), 477–483. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01450.x.
Lund, Ivar, Dalsgaard, Johanne, Rasmussen, Hanne Tolderlund, Holm, Jørgen, Jokumsen, Alfred, 2011. Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. Aquaculture 321 (3–4), 259–266. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.028.
Médale, Françoise, Kaushik, Sadasivam, 2009. Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. Cahiers Agricult. 18 (2), 103–111. https://doi.org/10.1684/agr.2009.0279.
Moltedo, Bruno, Faunes, Fernando, Haussmann, Denise, De Ioannes, Pablo, De Ioannes, Alfredo E., Puente, Javier, Becker, María Inés, 2006. Immunotherapeutic effect of concholepas hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. J. Urol. 176 (6), 2690–2695. https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.07.136.
Naylor, R.L., Hardy, Ronald W., Bureau, Dominique P., Chiu, Alice, Elliott, Matthew, Farrell, Anthony P., Forster, Ian, et al., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (36), 15103–15110. https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106.
Olsson, C., Aldman, G., Larsson, A., Holmgren, S., 1999. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 202 (Pt 2), 161–170. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851905.
Olsson, Catharina, Holbrook, Joanna D., Bompadre, Giulia, Jönsson, Elisabeth, Hoyle, Charles H.V., Sanger, Gareth J., Holmgren, Susanne, Andrews, Paul L.R., 2008. Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio Rerio*) by ghrelin and motilin. Gen. Comp. Endocrinol. 155 (1), 217–226. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.05.016.
Refstie, Ståle, Olli, Jan J., Standal, Håkon, 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. Aquaculture 239 (1–4), 331–349. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015.
Ribeiro, Laura, Moura, João, Santos, Marta, Colen, Rita, Rodrigues, Vera, Bandarra, Narcisa, Soares, Florbela, et al., 2014. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). Aquaculture 447, 116–128. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.017. Elsevier B.V.
Riche, M., Haley, D.I., Oetker, M., Garbrecht, S., Garling, D.L., 2004. Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in Tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture 234 (1–4), 657–673. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.012.
Robert, Marie, Zatylny-Gaudin, Céline, Fournier, Vincent, Corre, Erwan, Le Corguillé, Gildas, Bernay, Benoît, Henry, Joël, 2014. Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the White Shrimp (*L. vannamei*). J. Biotechnol. 186, 30–37. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.020.
Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentin, J.M., Pérez-Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Gallardo, M.A., 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 (1–4), 146–154. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.026.
Shahbazi, Fatemeh, Holmgren, Susanne, Larhammar, Dan, Jensen, Jörgen, 2002. Neuropeptide Y effects on vasorelaxation and intestinal contraction in the atlantic cod *Gadus morhua*. Am. J. Physiol. 282 (5), R1414–R1421. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00434.2001.
Srichanun, Manee, Tantikitti, Chutima, Kortner, Trond M., Krogdahl, Åshild, Chotikachinda, Rutchanee, 2014. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. Aquaculture 428–429, 195–202. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.004. Elsevier B.V.
Storebakken, T., Kvien, I.S., Shearer, K.D., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., 1999. Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. Aquaculture 172 (3–4), 291–299. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00501-8.
Takio, Kitazawa, Naoki, Miyashita, Akihito, Chugun, Kyosuke, Temma, Hiroshi, Kondo, 1988. Antagonist like action of synthetic α2-adrenoceptor agonists on contractile response to catecholamines in smooth muscle strips isolated from rainbow trout stomach (*Salmo gairdneri*). Compar. Biochem. Physiol. 91 (2), 585–588. https://doi.org/10.1016/0742-8413(88)90082-5.
Valente, Luisa M.P., Cabral, Eduarda M., Sousa, Vera, Cunha, Luis M., Fernandes, Jorge M.O., 2016. Plant protein blends in diets for senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. Aquaculture 453, 77–85. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.034.
Wilson, Robert P., 2002. Amino acids and protein. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, 3rd Ed. Academic Press, San Diego, pp. 143–179.
Zanjani, Talaei, Negar, Monica Miranda-saksena, Valtchev, Peter, Diefenbach, Russell J., Hueston, Linda, Diefenbach, Eve, Sairi, Fareed, et al., 2016. Abalone hemocyanin blocks the entry of herpes simplex virus 1 into cells : a potential new antiviral strategy. Antimicrob. Agents Chemother. 60 (2), 1003–1012. https://doi.org/10.1128/AAC.01738-15.Address.
Zatylny-Gaudin, Céline, Cornet, Valérie, Leduc, Alexandre, Zanuttini, Bruno, Corre, Erwan, Le Corguillé, Gildas, Bernay, Benoît, et al., 2016. Neuropeptidome of the cephalopod *Sepia officinalis*: identification, tissue mapping, and expression pattern of neuropeptides and neurohormones during egg laying. J. Proteome Res. 15 (1), 48–67. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00463.

4 Conclusions

Le temps de transit alimentaire dans le système digestif du poisson est un paramètre déterminant dans l'évaluation des performances d'un aliment. Il influencera la quantité d'aliment ingéré, l'efficacité alimentaire et les rejets azotés, parmi les paramètres les plus importants. Le développement de la méthode d'analyse des activités myotropes *in vitro* représente un outil fiable et précis qui devrait permettre à terme de sélectionner des ingrédients pour leurs propriétés myotropes avant de réaliser les tests chez le poisson.

Les analyses réalisées lors de ces travaux ont montré que les propriétés myotropes des hydrolysats de protéines dépendent directement de l'origine de la matière première qui compose l'hydrolysat. Il apparait que les hydrolysats de crustacés sont majoritairement myotropes tandis que ceux issus de co-produits de poissons présentent à la fois des effets myotropes et des effets myosuppresseurs. Enfin, l'hydrolysat de calmar est le seul véritable hydrolysat présentant une activité myosuppressive.

Lors de la réalisation des essais de conditionnement alimentaire chez le bar européen, il est apparu que les deux hydrolysats amélioraient les performances de croissance des bars nourris sur aliment à faible teneur en FP (5%). Toutefois, les deux produits ne sont pas égaux en terme de dose d'incorporation avec un effet dose clair pour l'hydrolysat de crevettes inversement à l'hydrolysat de *Gadidae*, confirmant l'importance de l'origine de la matière première et du profil peptidique dans la performance du produit. De même, seul l'hydrolysat de crevette a permis d'accélérer la vitesse du transit selon une réponse effet-dose en début et fin de mesure de la cinétique d'émission des fèces (par phénomène de compensation). Il est aussi important de noter que les effets observés sur l'intestin de bar ne peuvent être considérés comme établis pour d'autres espèces de poissons d'élevage.

L'analyse des propriétés myotropes de l'hydrolysat de crevette a permis d'aboutir à la purification d'un peptide myotrope dont les performances contractiles ont été confirmées. Pour poursuivre les investigations sur ce peptide, il serait intéressant de tester sa supplémentation dans des régimes alimentaires et déterminer si ce peptide est à même de modifier à lui seul la vitesse du transit ou s'il agit en synergie avec d'autres composés de l'hydrolysat de crevette. D'un point de vue fondamental, il serait également intéressant d'analyser le mécanisme d'action (direct ou indirect) et ses caractéristiques de contraction (stimulant ou propageant) de ce pentapeptide qui ne présente pas d'homologie structurale avec un peptide myotrope connu. Si les hydrolysats de protéines de poisson sont déjà utilisés en agro-alimentaire comme compléments alimentaires pour leur forte digestibilité notamment (nutrition infantile, nutrition sénior, nutrition sportive), leur propriété anti-stress ou antioxydante, c'est la première fois qu'un peptide myotrope est identifié dans un hydrolysat de protéines. Ce peptide KNPEQ a fait l'objet d'un brevet pour une application en aquaculture.

Ce chapitre vient clôturer la première partie de ce travail de thèse qui a consisté à caractériser la structure (richesse et diversité en peptides) et les propriétés fonctionnelles (activités myotropes) des hydrolysats de protéines d'origine aquatique. La seconde partie des travaux s'est concentré sur la compréhension des mécanismes d'actions des hydrolysats de protéines chez le poisson. En effet, si de nombreux travaux ont montré les effets positifs (appétence, nutrition, santé) de l'incorporation d'hydrolysats dans les formules alimentaires destinés aux poissons carnivores, peu de travaux ne sont penchés sur leurs effets sur le métabolisme de l'animal. Ainsi, le prochain chapitre : « *Caractérisation fonctionnelle : identification de marqueurs transcriptomiques pour la mesure de la performance des hydrolysats* » présentera les travaux menés sur la réponse des transcriptomes intestinaux et hépatiques chez le bar nourri avec des aliments incorporant deux hydrolysats de protéines : un hydrolysat de tilapia et un hydrolysat de crevette.

Cinquième partie

Caractérisation fonctionnelle : Identification de marqueurs transcriptomiques pour la mesure de la performance des hydrolysats

1 Introduction

Les progrès récents des technologies de séquençage à **haut débit**, en particulier les puces à ADN et le séquençage de l'ARN (RNA-seq) via les ADNc, ont révolutionné la discipline et permis l'étude des transcrits et de leur expression par la construction de **transcriptomes**. Ce dernier représente à l'ensemble des transcrits d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme présentes à un instant t. Contrairement au génome qui apparait comme relativement stable, le transcriptome varie en fonction du stade de développement, de la condition physiologique et de l'environnement externe. Une complexité accrue provient de la présence d'isoformes d'épissage et de transcrits issus de la fusion de gènes. L'analyse à grande échelle du transcriptome (communément appelée **transcriptomique**) est devenue un outil puissant pour comprendre les interactions complexes entre le génotype et le phénotype, donnant un aperçu des mécanismes moléculaires qui contrôlent le devenir, le développement et la fonction cellulaire. La transcriptomique est également essentielle pour guider et interpréter les analyses subséquentes par protéomique, métabolomique et autres technologies émergentes.

L'approche transcriptomique par RNA-seq a beaucoup progressé ces dernières années avec en parallèle une **diminution des coûts** (réactifs, séquençage et analyse) et une **augmentation de la puissance de calcul** (pour revue voir Martin et al., 2016). C'est la raison pour laquelle cette approche technique tend à supplanter progressivement la technique des puces à ADN [1].

1. Pour une comparaison entre RNA-seq et puce à ADN voir la revue de Qian et al., 2014.

1.1 La transcriptomique

L'objectif global de la transcriptomique n'est pas seulement d'identifier quelques gènes régulés, mais de s'intéresser aux **voies métaboliques** et aux **voies de signalisation** régulées dans une approche plus holistique.

Le RNA-seq est une technologie à haut débit qui permet de mesurer le **niveau d'expression** de milliers de transcrits pour comprendre les **réponses physiologiques** des organismes vivants à des conditions expérimentales différentes.

Une fois les tissus prélevés et les ARNm extraits, trois étapes principales composent une étude transcriptomique : la contruction des banques d'ADNc, le séquençage et l'analyse bioinformatique, cette dernière étape étant la plus coûteuse en temps et en matériel. En effet, elle requiert notamment des serveurs informatiques capables de gérer plusieurs Gigaoctets de données. La **Figure 38** (page 177) présente un condensé de ces étapes. Qian et al. (2014) ont réalisé une revue explicative sur le RNA-seq et les différents types d'études réalisées chez les poissons.

Les analyses transcriptomiques peuvent générer de longues listes de gènes différentiellement exprimés (DE) et l'analyse bioinformatique permet de déterminer la ou les fonctions de ces gènes pour réaliser une interprétation biologique de l'étude. En effet, si les listes de gènes ne sont pas en elles-mêmes très informatives, la force de l'approche transcriptomique est de permettre un **classement des gènes** sur la base de critères spécifiques et de les associer à des **annotations fonctionnelles** comme par exemple celles du projet « Gene Ontology » qui structure la description des gènes en processus biologiques, fonctions moléculaires et localisations cellulaires. Lorsque les gènes sont ainsi associés à des groupes fonctionnels, des analyses statistiques permettent de comparer les annotations. Les approches les plus communes sont les analyses d'enrichissement en annotation GO et en voie de signalisation KEGG. Différents programmes informatiques permettent de réaliser de telles analyses tels que DAVID, STRING ou Ingenuity Pathway Analysis.

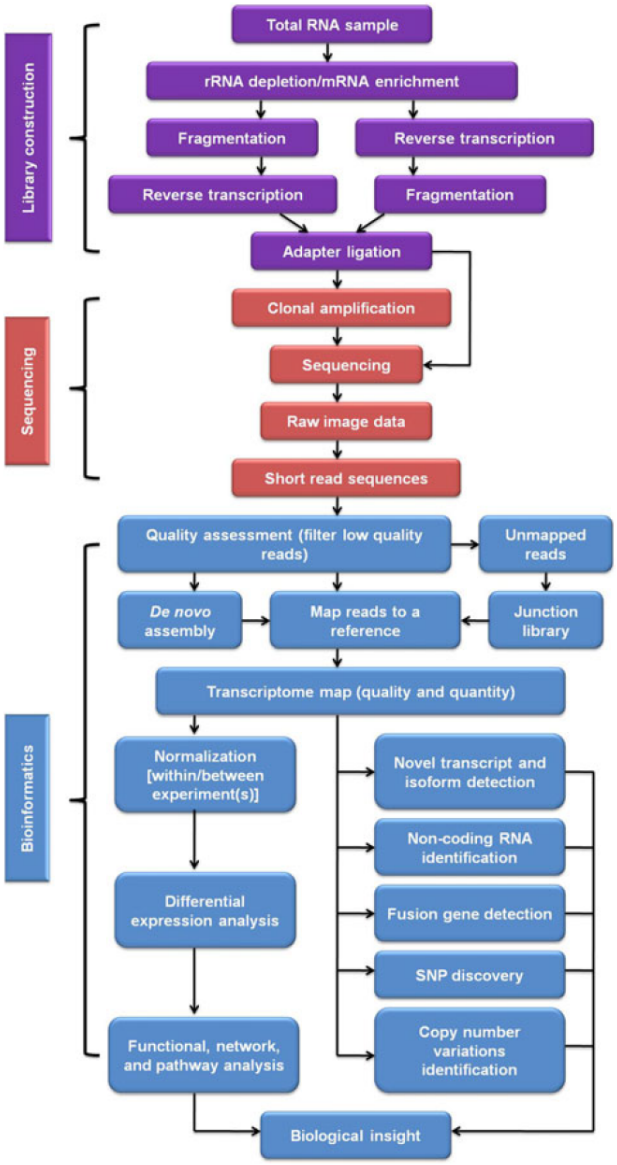


FIGURE 38 – Workflow d'une analyse réalisée en RNA-seq *de novo*. Trois grandes étapes sont nécessaires. La construction des banques d'ADNc à partir des échantillons d'ARN est présentée en violet. Pour des expériences d'expression différentielles (comparaison des niveaux d'expression entre 2 conditions), une « banque d'ADNc » est générée à partir de chaque réplicat biologique après purification des ARNm par capture des ARNm par sélection polyA. L'ADNc est ensuite fragmenté en fragments de quelques centaines de paires de bases et des adaptateurs sont ligaturés aux extrémités de l'ADNc. Ces adaptateurs ont des « codes à barres » spécifiques qui permettent de trier les séquences provenant de différents échantillons issus d'un même cycle de séquençage. L'étape de fragmentation peut être réalisée avant ou après la transcription inversée. Le séquençage commence par une réaction de polymérisation en chaine (PCR) des ADNc et se termine par le démultiplexage des séquences. Ces étapes sont présentées en rouge. Enfin, l'analyse bioinformatique commence par l'estimation de la qualité du séquençage jusqu'à l'interprétation biologique à l'aide de nombreux logiciels spécifiques. Ces étapes sont présentées en bleu. De nombreuses étapes de nettoyage et de vérification sont réalisées tout au long de l'analyse [Qian *et al.*, 2014].

Néanmoins, malgré le nombre croissant d'outils bioinformatiques disponibles, l'identification de groupes fonctionnels pertinents pour expliquer les régulations physiologiques reste difficile. Il faut de plus rester prudent lors de l'interprétation des résultats des études transcriptomiques car les différences observées dans l'expression d'un gène ne sont pas systématiquement retrouvées au niveau protéique. En effet, en moyenne, environ 40% de la variation de la concentration protéique peut être expliquée par les niveaux d'ARNm, tandis que les 60% restants sont attribués à la régulation post-transcriptionnelle et aux erreurs de mesure [Vogel et Marcotte, 2012]. Le résultat des études transcriptomiques dépend également fortement de la disponibilité des séquences dans les bases de données, des méthodes de calcul pour l'annotation des gènes et de l'enrichissement des ensembles de gènes.

1.2 Etudes transcriptomiques réalisées chez le poisson

Récemment, le développement des méthodes d'analyses transcriptomiques RNA-seq a permis de mener de nombreuses études chez le poisson qui portent principalement sur la nutrition et l'immunité. Des études transcriptomiques ont en particulier été réalisées sur l'impact du remplacement des farines et huiles de poisson par des composés d'origine végétale. Ces études se sont focalisées sur les performances de croissance mais également sur l'amélioration des défenses face aux pathogènes. En effet, l'alimentation est indissociable de la santé et les organes comme l'intestin et le foie qui jouent un rôle majeur dans la nutrition et la réponse immunitaire chez les poissons sont particulièrement étudiés [Qian *et al.*, 2014, De Santis *et al.*, 2015, Martin *et al.*, 2016, Sudhagar *et al.*, 2018].

1.2.1 Études transcriptomiques réalisées sur l'intestin

L'intestin est un organe complexe impliqué dans l'assimilation des produits terminaux de la digestion extracellulaire[2] mais joue également un rôle dans la santé chez les poissons car il participe aux défenses immunitaires au niveau du GALT[3].

2. Cf Mécanismes d'absorption **Figure 21** page 77.
3. Cf GALT **Figure 24** page 81.

La plupart des études sur la régulation transcriptomique de l'intestin par les régimes alimentaires riches en FV ont été menées chez le saumon. Le **Tableau 22** présente les études réalisées ainsi que les technologies utilisées.

Tableau 22 – Études utilisant le profilage haut débit pour caractériser les réponses transcriptomiques de l'intestin par les régimes alimentaires riches en farines et huiles végétales, modifié d'après Martin et al., 2016.

Espèce	Régimes	Comparaisons	Tissus analysés	Approche	Références
Protéines d'origine végétale					
Salmo salar	2 régimes avec 20% de farine de soja (FS) et de farine de poisson (FP)	Poissons nourris avec le régime FS vs FM (1, 2, 3, 5 et 7 jours)	Intestin distal	Microarray	Sahlmann et al., 2013
Salmo salar	4 régimes avec 0, 10, 20 et 30% de FS	Poissons nourris avec les régimes 10, 20 et 30% de FS vs 0% FS (12 semaines)	Multiple, dont l'intestin distal	Microarra	De Santis et al., 2015b
Salmo salar	6 régimes contenant des farines d'origine végétale (FV) dont des FS et un régime contenant des FP	Poissons nourris avec les régimes FV vs FP (56 jours)	Intestin distal	Microarray	Krol et al., 2016
Salmo salar	2 régimes avec des protéines concentrées de soja (PCS) et des FP	Poissons nourris avec le régime PCS vs FP (77 jours)	Multiple, dont l'intestin moyen	Microarra	Tacchi et al., 2012
Salmo salar	5 régimes de FV supplémentés avec de la soyasaponine et 5 régimes de FV sans supplémentation	Poissons nourris avec les régimes supplémentés vs non supplémentés (80 jours)	Intestin distal	Microarray	Kortner et al., 2012
Salmo salar	2 régimes contenant du maïs génétiquement modifié (MGM) ou naturel	Poissons nourris avec le régime MGM vs maïs naturel (82 jours)	Multiple, dont l'intestin distal	Microarra	Sissener et al., 2011
Danio rerio	2 régimes avec des teneurs basses et élevées en farine de grande gravette (*Alitta virens*)	Poissons nourris avec le régime riche vs appauvri (21 jours post-fécondation)	Intestin	RNA-seq Illumina	Rurangwa et al., 2015
Huile d'origine végétale					
Salmo salar	2 régimes contenant de l'huile d'origine végétale (HV) et de l'huile de poisson (HP)	Poissons maigres et gras nourris avec le régime HV vs HP (55 semaines)	*Caeca* pyloriques	Microarray	Morais et al., 2012a
Gadus morhua	2 régimes contenant de l'HV et de l'HP	Poissons nourris avec le régine HV vs HP (12 semaines)	Intestin moyen	Microarra	Morais et al., 2012b
Salmo salar	3 régimes avec de l'HP, de l'HV de cameline sauvage (HC) et de l'huile de cameline génétiquement modifiée (HCGM)	Poissons nourris avec le régime HP vs HC vs HCGM (7 semaines)	*Caeca* pylorique	Microarray	Betancor et al., 2015b

Il ressort des nombreuses études réalisées chez le saumon que les régimes riches en farine de soja (complète ou extraite au solvant) conduisent à l'apparition d'entérites. Ces dernières se traduisent par une modification des paramètres morphométriques de l'intestin : une diminution de la taille des *villi*, une infiltration de la *lamina propria* par des cellules inflammatoires, une augmentation du nombre de

cellules caliciformes et une réduction du nombre des vacuoles dans les entérocytes [Baeverfjord et Krogdahl, 1996, Krogdahl *et al.*, 2000, Bakke-McKellep *et al.*, 2007]. Au niveau moléculaire, on observe une surexpression des gènes liés à l'immunité de la famille des GTPase IMAP, des gènes liés au NF-κB et des gènes de régulation des cellules de type B et T. Dans le même temps, il a été observé une inhibition des gènes liés à l'endocytose, l'exocytose, la détoxification, au transport cellulaire et aux processus métaboliques [Król *et al.*, 2016].

Enfin, les composés antinutritionnels de la farine de soja seraient responsables d'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale qui ne jouerait plus son rôle de barrière vis-à-vis des bactéries et des virus pathogènes à l'origine des entérites [Knudsen *et al.*, 2008, Penn *et al.*, 2011, Chikwati *et al.*, 2012, Krogdahl *et al.*, 2015].

Ainsi, les études les plus récentes accréditent l'idée d'une translocation microbienne facilitée par les farines de soja. En effet, des voies de signalisation impliquées dans la barrière intestinale sont profondément perturbées, comme par exemple celles liées au remodelage des jonctions d'adhésion épithéliale [Król *et al.*, 2016].

Les études sur les mélanges de FV ont montré qu'il était possible d'améliorer la composition brute des poissons (augmentation des protéines et des lipides) suggérant un lien potentiel entre l'amplitude de la variation des profils d'expression des gènes et les performances zootechniques. Le profil d'expression des gènes de l'intestin constitue donc un indicateur fiable et efficace pour tester les performances des sources alternatives de protéines en aquaculture et pour élaborer des régimes alimentaires limitant l'impact des FAN sur la santé des poissons [Martin *et al.*, 2016].

Remplacement de l'huile de poisson. Bien que ce ne soit pas le sujet de ce travail de thèse, voici un bref aperçu des études transcriptomiques qui ont été réalisées au cours de ces dernières années sur l'impact de la diminution des huiles de poissons dans les régimes alimentaires.

L'obstacle majeur au remplacement des huiles de poissons par des huiles d'origine végétale (HV) est le maintient de l'équilibre des profils en acides gras et particulièrement en acides gras oméga-3 polyinsaturés tels que l'acide eicosapentaenoïque (EPA) et docosahexaenoïque (DHA) [Hixson *et al.*, 2014]. Un déséquilibre en acides gras

oméga-3 se retrouve chez les saumon de l'Atlantique nourris avec les HV et les performances zootechniques sont directement impactées [Torstensen *et al.*, 2008]. Au niveau transcriptomique, l'inclusion d'HV se traduit par une modification du profil d'expression des gènes de l'intestin des poissons et notamment des gènes D5fad, D6fad, elovl5b et elovl2. De plus, l'huile végétale stimule la lipogénèse des poissons rationnés tandis que la β-oxydation lipidique ne semble pas être affectée bien que les transcrits des acteurs de la respiration mitochondriale ou la chaine de transport d'électrons soient réprimés. On observe également de hauts niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme xénobiotique (CYP1A and EPHX2), des défenses antioxydantes (CAT, HPX et PRDX1) et l'apoptose (Casp3B), probablement en raison de la présence de contaminants tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'HV [Martin *et al.*, 2016].

Récemment, Betancor et al. (2015) ont publié une étude portant sur la transformation génétique de la cameline (*Camelina sativa*) avec des gènes provenant de microalgues. Cet organisme génétiquement modifié est capable de synthétiser 20% d'EPA dans les lipides de ses graines. L'HV issu des graines est utilisé comme substitut à l'huile de poisson dans les aliments chez le saumon. A l'issue de l'essai nutritionnel, les résultats montrent que de hauts niveaux d'EPA ont été maintenus dans le cerveau, le foie et les intestins (*caeca* pyloriques), et que les niveaux d'acide docosapentaénoïque (DPA) et DHA étaient plus élevés dans le foie et l'intestin de poisson ayant été nourris avec l'huile de cameline transgénique par rapport aux poissons nourris avec de l'huile de cameline sauvage. Ces résultats pourraient être expliqués par une sur expression des gènes de la biosynthèse d'acides gras poly-insaturés à longue chaine.

Les développements d'alternatives aux huiles de poissons s'orientent aujourd'hui vers l'utilisation d'extraits de micro-algues ou de plantes génétiquement modifiées.

1.2.2 Études réalisées sur le foie

Très peu d'études sont disponibles sur la réponse du transcriptome hépatique lors du remplacement de la FP par une autre source de protéine.

Geay al. (2011) ont publié une étude réalisée chez le bar européen, portant sur le remplacement de la farine et de l'huile de poisson dans les aliments. Ils ont mis

en évidence que la substitution entraine une diminution de l'expression des gènes associés aux fonctions immunitaires et à la communication cellulaire. En revanche, l'expression des gènes des métabolismes lipidique, glucidique, protéique et des acides aminés, ainsi que ceux liés au transport des lipides et à la coagulation sanguine étaient surexprimés.

Quelques études sur la modulation transcriptomique hépatique lors d'infections induites sont disponibles. Une étude menée sur *Tor putitora* infecté par *A. hydrophila* met en évidence que les principales voies de signalisation DE sont liées aux recepteurs de surface, à la différentiation lymphocytaire TH1 et TH2, à la reconnaissance des pathogènes ainsi qu'aux réponses du système immunitaire et particulièrement la cascade du complément [Kumar *et al.*, 2017].

L'infection de *Larimichthys crocea* par le parasite *Cryptocaryon irritans* entraine une régulation des gènes impliqués dans la cascade de la coagulation et du complément, de la voie Toll-like, de l'apoptose, de la présentation des antigènes, des chimiokines et de la cytotoxycité médiée par les natural killers [Wang *et al.*, 2016].

1.2.3 Etudes transcriptomiques sur l'intestin et le foie

Récemment des études portant à la fois sur le transcriptome hépatique et intestinal ont été menées.

Wu et al. (2016) ont récemment publié une étude sur l'interaction entre l'intestin et le foie chez le tilapia en condition d'homéostasie mais également lors d'épisodes inflammatoires. Ils ont ainsi comparé les niveaux d'expression des transcrits entre les deux organes et ont mis en évidence une plus grande diversité des transcrits surexprimés dans l'intestin, centrés sur la réponse adaptative et la reconnaissance des antigènes en condition d'homéostasie. Dans le foie, les transcrits surexprimés sont majoritairement liés quant à eux à la réponse innée (système du complément). De manière très intéressante, lors de l'épisode inflammatoire, l'écart d'expression entre l'intestin et le foie diminue. Il ont ainsi émis l'hypothèse d'une synchronisation des réponses médiée par la bile produite par le foie vers le mucus intestinal.

Santis et al. (2015) ont mené une étude sur le foie et la partie distale de l'intestin chez le saumon lors de l'installation d'une entérite induite par l'utilisation de la farine de soja.

Le remplacement de la FP par la farine de soja entraine principalement une régulation des gènes intestinaux impliqués dans le métabolisme (lipide, acide aminé et énergie), la digestion, l'absorption, l'immunité et le système endocrinien. D'autres processus cellulaires sont également impactés comme la synthèse des protéines.

Dans le foie, ils ont observé une surexpression des gènes impliqués dans la digestion des protéines, le métabolisme énergétique et les fonctions immunitaires. Les gènes des voies métaboliques anaboliques étaient quant à eux généralement réprimés. Ils estiment que les régulations hépatique sont surtout liées au stress nutritionnel plutôt qu'au déclenchement d'une réponse immunitaire face à l'entérite [De Santis *et al.*, 2015].

Ces articles mettent en lumière le lien existant entre les régulations intestinales et hépatiques et toute la complexité à appréhender les mécanismes sous-jaccents à leur régulation et à leur communication. A ce jour, aucune étude transcriptomique n'a été menée sur la réponse des gènes du foie et de l'intestin de bars européens nourris avec un aliment contenant une forte proportion de matières premières alternatives aux farines de poisson.

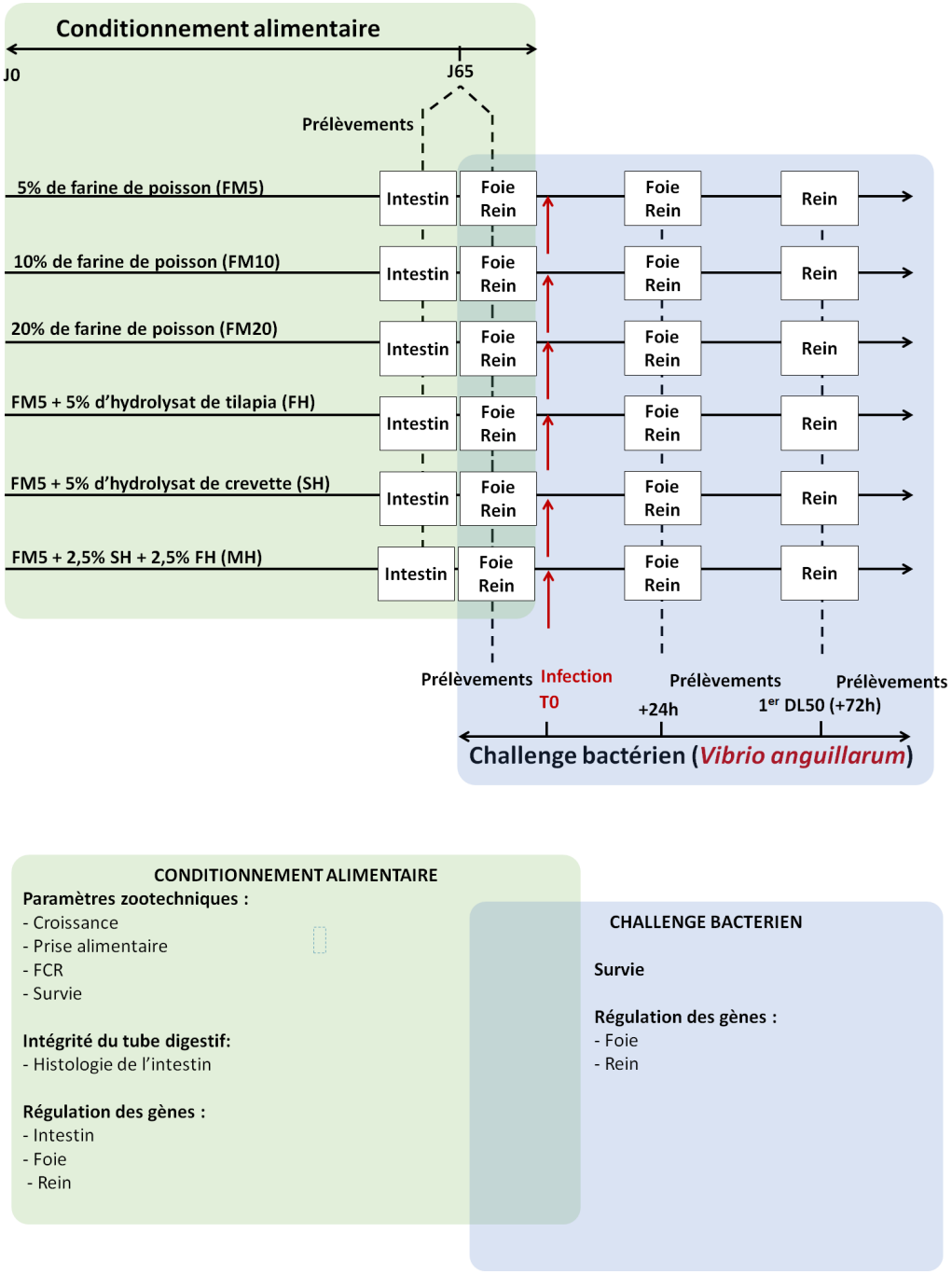


FIGURE 39 – Échantillonnage réalisé lors du test à l'IRTA. La première partie de l'expérience correspond à un test de conditionnement alimentaire. Il s'agit de la partie en vert. A l'issue du condionnement alimentaire, les poissons ont été infectés par *V. anguillarum*. La partie concernant l'infection bactérienne induite est figurée en bleu. Une partie des échantillons a servi à la fois pour le conditionnement alimentaire et pour l'infection bactérienne. Pour chaque mesure, l'intestin, le foie et le rein provenaient du même poisson. Le nombre total de poissons sacrifié est de 324. Abréviations : FM : farine de poisson, FH : hydrolysat de poisson, SH : hydrolysat de crevette, MH : mélange d'hydrolysats, FCR : taux de conversion alimentaire.

2 Démarche expérimentale

Dans le but d'étudier l'effet de la supplémentation alimentaire en hydrolysats de protéines d'origine aquatique sur la régulation transcriptomique de différents tissus chez le bar, un essai zootechnique a été mis en œuvre dans les installations expérimentales de l'IRTA (San Carles de la Rapita, Espagne). Selon le protocole mentionné dans le § 3.2.1 page 103, des juvéniles de bars sont nourris avec deux régimes contenant deux taux de FP (5 ou 20%) et trois régimes contenant 5% de FP et 5% d'hydrolysat de crevette, 5% d'hydrolysat de tilapia et 5% d'un hydrolysat composé d'un mélange des deux produits mentionnés précédemment au ratio 50/50. L'essai zootechnique s'est déroulé en 2 phases (**Figure 39**) ci-contre.

Une première phase de 65 jours d'essai correspond au conditionnement alimentaire. Un suivi des paramètres de croissance des poissons et d'efficacité alimentaire a été réalisé. A l'issue de cette phase de conditionnement alimentaire, un premier prélèvement d'intestin proximal a été opéré pour réaliser l'analyse des paramètres morphométriques de l'épithélium intestinal. Enfin, d'autres prélèvements d'intestin proximal, de foie et de rein ont été réalisés pour l'analyse des variations d'expression des gènes en fonction des différents régimes alimentaires.

A l'issue de l'essai nutritionnel, un challenge bactérien a été réalisé par injection (*V. anguillarum*, 2x10^6 UFC.mL^{-1}) et la cinétique de mortalité suivie jusqu'à ce que la mortalité atteigne 50% de l'effectif dans l'un des bassins. Les poissons vivants ont été comptabilisés 24 heures après l'infection et à la fin du challenge bactérien. Des échantillons de foie et de rein puis uniquement de rein ont été prélevés 24 heures après le début du challenge et au moment de l'observation de la première DL50 (premier bassin à atteindre 50% de mortalité), respectivement, pour l'analyse de la réponse transcriptomique.

2.1 Collaborations sur le projet

Ce projet n'a été possible que grâce à la collaboration de nombreuses personnes extérieures au laboratoire BOREA et à DianaAqua :

- l'équipe Catalane de l'IRTA (San Carles de la Rapita, Espagne) lors du test en bassin, du prélèvement des échantillons et de l'histologie de l'intestin.
- l'équipe Caennaise de la plateforme Sésame du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse pour le séquençage des échantillons.
- l'équipe Bretonne du service de bioinformatique ABiMS de la station biologique de Roscoff (FR2424) pour l'assemblage, la validation des transcriptomes, les comptages et l'annotation.
- l'équipe Rouennaise du Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, (U1239) lors de l'analyse des voies de signalisation.

Au sein de l'UMR BOREA nous avons construit les 108 banques d'ADNc pour le séquençage et analysé les données générées. Compte tenu du grand nombre d'échantillons et du volume de données générées par l'analyse RNA-seq à traiter (108 transcriptomes), l'exploitation des résultats de ce projet a été scindée en trois volets :

1. L'impact des régimes alimentaires sur l'intégrité et la régulation transcriptomique de l'intestin avant challenge bactérien.
2. L'impact des régimes alimentaires sur la régulation transcriptomique du foie avant challenge bactérien.
3. L'impact des régimes alimentaires sur la régulation du foie et du rein lors de l'infection bactérienne induite.

Les deux premiers volets de ce projet sont présentés dans les chapitres suivants. Le troisième volet ne sera pas traité dans ce manuscrit même si les analyses transcriptomiques concernant le foie sont terminées. L'analyse transcriptomique du rein étant toujours en cours, nous avons choisi d'exploiter les résultats de l'infection bactérienne à l'issue de l'analyse et de l'interprétation des régulations intervenant dans le foie et le rein.

3 Résultats et discussion

3.1 Impact des hydrolysats de protéines sur la régulation transcriptomique de la muqueuse intestinale chez le bar



Les travaux de caractérisation menés sur l'hydrolysat de crevette, *L. vannamei* et du tilapia (*O. niloticus*), ont fait l'objet d'un article publié dans BMC Genomics, en 2018, intitulé : « *Dietary aquaculture by-product hydrolysates : impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (Dicentrarchus labrax) fed low fish meal diets* ». Ces travaux présentent les résultats de performance zootechnique à l'issue des 65 jours, d'analyse histologique et d'analyse transcriptomique de la partie proximale de l'intestin par RNA-seq Illumina.

L'influence des hydrolysats de protéines sur les paramètres morphométriques de l'intestin proximal a quant a elle été dépendante de l'origine de l'hydrolysat testé. L'inclusion de l'hydrolysat de crevette dans l'aliment à faible teneur en FP a ainsi permis d'augmenter significativement de la taille des *villi* ainsi que le nombre de cellules caliciformes, deux paramètres qui avait été négativement impacté par le remplacement de FP. Si l'utilisation d'hydrolysat de tilapia a également permis d'améliorer significativement ces deux indicateurs de la santé intestinale, il n'a pas

permis de restaurer les valeurs mesurées chez les poissons nourris avec le contrôle positif (FM20). Le mélange d'hydrolysat a montré des résultats intermédiaires.

L'analyse transcriptomique de l'intestin proximal a montré que la réduction de FP dans l'aliment impactait significativement l'expression de nombreux gènes. L'inclusion des hydrolysats de protéines a permis de restaurer un profil d'expression des gènes intestinaux très proche de celui du contrôle positif. Cependant, par rapport au régime pauvre en FP (FM5), l'ajout des différents hydrolysats ne module pas l'expression des gènes de manière identique en fonction de leur origine. En effet, l'inclusion d'hydrolysat de crevette dans le régime alimentaire module davantage les voies de signalisation liées à l'immunité, tandis que le métabolisme nutritionnel est plus influencé par l'hydrolysat de tilapia. Fait intéressant, la combinaison des deux hydrolysats dans le régime alimentaire module un nombre de gènes et de voies métaboliques beaucoup importants que chaque hydrolysat testé indépendamment.

Ces résultats montrent pour la première fois des données zootechniques, histologiques et transcriptomiques chez le bar européen nourri avec un aliment pauvre en FP et supplémenté en différents hydrolysats de protéines. Ces travaux démontrent l'importance de l'origine de l'hydrolysat dans la performance du produit notamment sur ses effets sur les voies métaboliques du bar. Il serait intéressant de reproduire cet essai sur une durée plus longue pour mettre en évidence d'éventuelles conséquences phénotypiques des modulations d'expression des gènes observées chez les poissons nourris avec des aliments enrichis en hydrolysats de protéines.

Leduc *et al. BMC Genomics* (2018) 19:396
https://doi.org/10.1186/s12864-018-4780-0

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets

Alexandre Leduc[1,4], Céline Zatylny-Gaudin[1], Marie Robert[1], Erwan Corre[2], Gildas Le Corguille[2], Hélène Castel[3], Antoine Lefevre-Scelles[3], Vincent Fournier[4], Enric Gisbert[5], Karl B. Andree[5] and Joël Henry[1*]

Abstract

Background: Aquaculture production is expected to double by 2030, and demands for aquafeeds and raw materials are expected to increase accordingly. Sustainable growth of aquaculture will require the development of highly nutritive and functional raw materials to efficiently replace fish meal. Enzymatic hydrolysis of marine and aquaculture raw materials could bring new functionalities to finished products. The aim of this study was to determine the zootechnical and transcriptomic performances of protein hydrolysates of different origins (tilapia, shrimp, and a combination of the two) in European seabass (*Dicentrarchux labrax*) fed a low fish meal diet (5%), for 65 days.

Results: Results were compared to a positive control fed with 20% of fish meal. Growth performances, anterior intestine histological organization and transcriptomic responses were monitored and analyzed. Dietary inclusion of protein hydrolysates in the low fish meal diet restored similar growth performances to those of the positive control. Inclusion of dietary shrimp hydrolysate resulted in larger villi and more goblet cells, even better than the positive control. Transcriptomic analysis of the anterior intestine showed that dietary hydrolysate inclusion restored a pattern of intestinal gene expression very close to the pattern of the positive control. However, as compared to the low fish meal diet and depending on their origin, the different hydrolysates did not modulate metabolic pathways in the same way. Dietary shrimp hydrolysate inclusion modulated more metabolic pathways related to immunity, while nutritional metabolism was more impacted by dietary tilapia hydrolysate. Interestingly, the combination of the two hydrolysates enhanced the benefits of hydrolysate inclusion in diets: more genes and metabolic pathways were regulated by the combined hydrolysates than by each hydrolysate tested independently.

Conclusions: Protein hydrolysates manufactured from aquaculture by-products are promising candidates to help replace fish meal in aquaculture feeds without disrupting animal metabolism and performances.

Keywords: Hydrolysate, Fishmeal replacement, By-products, Aquaculture, Aquafeed, European seabass, Illumina RNA-sequencing, Intestinal organization, Metabolic pathways

* Correspondence: joel.henry@unicaen.fr
[1]Normandie University, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Université de Caen Normandie, Caen 14032, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Fish captures have been stabilizing since the 1980's, and in most parts of the world seafood production is now supplied by the aquaculture industry [1]. Aquaculture production is expected to double by 2030 to meet customer demand, so demands for aquafeeds and raw materials will increase accordingly [2]. Originally, fish meals (FM) manufactured from wild fish were primarily used for growing carnivorous fish species. This kind of raw material is an excellent source of highly digestible protein and fat, is well balanced in essential amino acids, and has good palatability properties [3]. However, FM availability from wild fish is limited, its price is volatile, and its inclusion at high levels in aquafeeds is not sustainable; according to Duarte et al., FM and fish oil will be depleted by 2040 [4]. Consequently, sustainable growth of aquaculture will require the development of highly nutritive and functional raw materials to replace FM efficiently. Many studies have been conducted on carnivorous species to evaluate the performance of plant-based meal (PBM) diets to efficiently replace dietary FM; many of them were remarkably efficient, with partial or total substitution of FM by PBM [5–8]. However, replacing FM by high levels of PBM may also reduce feed palatability and fish growth [9, 10]. Imbalanced amino acid composition of PBM leads to nutritional deficiency, and feed formulae incorporating high levels of such raw materials have to be supplemented in essential free amino acids [11]. It is also now well-documented that plants contain endogenous anti-nutritive compounds and complex carbohydrates that could affect nutrient digestibility and thereby negatively impact nutritional performances [12, 13]. Moreover, high dietary inclusion of PBM in feeds for carnivorous species leads to enteritis [14, 15], as well as depressed immunity [16, 17]. Trials had been conducted about FM replacement by PBM on European seabass and it had been shown in different trials that it was possible to replace up to 50% of dietary FM by plant based meal without modifying fish growth performances (for review Kousoulaki et al., 2015) [18].

The large availability of marine and aquaculture by-products could allow for partial replacement of wild fish-derived FM [19, 20]. By-products from the processing of fishery and aquaculture animals are more and more considered as a potential source of raw materials for sustainable FM production [21–23]. However, the quality of the processes applied to raw materials is critical to enhance their nutritional value. In this sense, enzymatic hydrolysis could improve the palatability, nutritional quality and functional properties of the finished product [24–26]. Enzymatic hydrolysis of fish proteins results in the formation of a mixture of free amino acids, di-, tri- and oligo-peptides, and enhances the occurrence of polar groups and the solubility of hydrolysate compounds [27]. Because low-molecular-weight nitrogenous compounds are important for the feeding behavior [28], nutrition [29–31] and health [32, 33] of aquaculture species, protein hydrolysates could be good candidates for high FM substitution in aquafeeds. However, protein hydrolysate performances could be highly dependent on the methods used for their production: their nutritional and functional properties are closely related to their characteristics and composition, including the abundance and diversity of different oligo-peptides [34, 35].

Dietary shrimp hydrolysates stimulate growth performances in fish, and also possess antimicrobial properties against aquaculture pathogens [36–39]. Similarly, tilapia hydrolysates as well as other fish hydrolysates have been evaluated; functional properties have been evidenced, such as antioxidant [24] and antimicrobial [40] activities. In particular, Khosravi et al. showed that high levels of FM could be replaced by low levels of protein hydrolysate combined with PBM in aquafeeds [38]. In addition, health benefits (i.e. immunity and gut cellular organization) of dietary protein hydrolysates have been reported in different fish species under challenging conditions [32, 38, 39, 41].

The European seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) is a marine fish widely reared in the Mediterranean sea, with more than 156,449 tons produced in 2014 [1]. It is a strictly carnivorous species [42] that requires a high level of animal proteins in its diet. For instance, the natural diet of wild European seabass contains ca. 43–50% of animal proteins [43], whereas aquafeeds for this species generally contain at least 20% of FM to support good fish performances [44]. Thus, replacing FM in European seabass aquafeed is still a major objective for the aquaculture industry. Although the complete replacement of FM by PBM has been reported as possible for European seabass, feed formulation required palatability enhancers to improve feed intake, as well as amino acid supplementation to avoid nutritional deficiency linked to PBM [6]. Trials recently conducted in European seabass showed that 5% inclusion of shrimp- and tilapia-based protein hydrolysates associated with a combination of PBM successfully replaced 15% FM without affecting growth or health performances [45].

The intestine is involved not only in digestion and feed absorption, but also in water and electrolyte balance, nutrient sensing, and immunity. This functional diversity is gradually being elucidated in fish, as different histological and molecular approaches provide new items of knowledge regarding the many vital functions conducted along the gastrointestinal tract [46, 47]. In this view, the numbers of transcriptomic studies in aquaculture have increased, mostly in the field of nutrition and immunity.

Many of them have focused on understanding how specific diets and functional ingredients could modulate metabolic pathways and regulate specific tissue expression [48–50]. But the effect of dietary protein hydrolysates on the regulation of fish metabolism has never been investigated so far.

We evaluated the effects of protein hydrolysates of different origins on European seabass fed a low FM diet. In addition to growth performances, we also studied the cellular organization and gene responses of the intestinal mucosa to investigate the effects of dietary protein hydrolysates on fish metabolism.

Methods

Diets

Five diets were formulated as follows: 2 diets containing FM at 5 and 20% of dry matter (diets FM5 and FM20) and 3 more diets containing 3 protein hydrolysates, shrimp-based hydrolysate (SH), tilapia hydrolysate (TH) and a 50/50 mixture of the two (MH), included at 5% of dry matter in the FM5 diet (Additional file 1). Both protein hydrolysates were provided by Aquativ (Diana Aqua, Symrise group, Elven, France). They were produced from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) carcasses obtained from commercial food processing plants. These two protein hydrolysates have very different peptide profiles [37, 40]. All the diets were balanced for deficient amino acids according to the requirements determined for European seabass [51]. Diets manufactured by BIOMAR (Tech Centre, Brande, Denmark) were extruded with 2 different pellet diameters– 1.5 and 2.5 mm– for them to be adapted to the size of the fish during the trial. Diets were isoproteic (42.7 ± 1.1% of crude protein), isolipidic (19.3 ± 0.5% of crude fat) and isoenergetic (5.2 ± 0.1 kJ/kg).

Animals and feeding trial

The feeding trial was conducted at the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA, Sant Carles de la Rapita, Spain). European seabass (body weight, BW = 2.0 ± 0.2 g) were obtained from Piscicultura Marina Mediterránea SL (Andromeda Group, Burriana, Valencia, Spain). They were fed a commercial feed (OptibassL-2, Skretting, Spain; 48.5% of proteins, 16% of lipids, 3.7% of fibers, 6.4% of ashes) for 2 weeks for them to acclimate to the experimental facilities. Then they were randomly distributed into twenty 500-L fiberglass circular tanks (5 diets, 4 replicates *per* diet) at an initial density of 0.4 kg/m^3 (100 fish *per* tank). Before the feeding trial, sea bass were individually weighed for BW and measured for standard length (SL) (BW = 2.2 ± 0.01 g; SL = 5.1 ± 0.04 cm). During the study, average water temperature and pH (pH meter 507; Crison Instruments), salinity (MASTER-20 T; ATAGO Co. Ltd) and dissolved O_2 (OXI330; Crison Instruments) were 23.2 ± 0.5 °C, 7.5 ± 0.2, 35.8 ± 0.3 ppm and 6.2 ± 1.2 mg/L, respectively. The water flow rate in the experimental tanks was maintained at approximately 9.0 L/min by means of a recirculation system (IRTAmar®) that maintained adequate water quality (ammonia: 0.08 ± 0.04 ppm, nitrites: 0.032 ± 0.02 ppm) through UV, biological and mechanical filtration. The photoperiod followed seasonal changes (February–April; latitude 40°37'41'N). Sea bass were fed in excess 6 times a day with automatic feeders (ARVO-TEC T Drum 2000™, Arvotec, Huutokoski, Finland) at a ration rate of 4.5%/day for 65 days. On day 31, the BW of 50 fish *per* tank was recorded to adjust the daily feed ration.

At the end of the trial, we measured the BW and SL of all sea bass from each tank (the fish were fasted for 24 h prior to sampling). Specific Growth Rates (SGR), Fulton's condition factors (K), feed conversion ratio (FCR) and Survival Rates (SR) were calculated as follows: SGR (% BW/day) = 100 x [ln final BW - ln initial BW]/duration of the trial (days); $K = [BW/SL^3] \times 100$; FCR = [kg diet consumed]/[kg final biomass – kg initial biomass + kg sampled fish + mortalities]; SR (%) = [number of fish at the end of the trial/initial number of fish] × 100.

Ethics statement

All experimental procedures involving sea bass were conducted in compliance with the experimental research protocol approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the IRTA, the Departament Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (permit number 7962) and in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU) for the use of laboratory animals.

Sample collection

During handling and weighing, sea bass were anesthetized with 50 mg/L of MS-222 (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). At the end of the trial, they were sacrificed with an overdose of MS-222 (100 mg/mL) to collect the different tissues for analytical purposes. Sea bass were sampled on a cold plate (0–4 °C), and the intestines from 15 individuals *per* diet were dissected and preserved in a 10% phosphate-formaldehyde buffer (pH = 7.2) for histological purposes. In addition, the anterior intestine from nine fish *per* dietary treatment was sampled and immediately flash-frozen in liquid nitrogen for transcriptomic analysis. These samples were kept at – 80 °C until RNA extraction.

Histological organization of the intestine

After fixation, samples were dehydrated in a graded series of ethanol, cleared with xylene, embedded in

paraffin (Histolab ZX-60 Myr, Medical Specialties MYR SL, Tarragona, Spain) and cut into serial sections (2–3 μm thick) (HM Microm, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Sections were stained with Hematoxin-Eosin for general histological descriptions, whereas slides were stained with Periodic Acid Schiff (PAS) and Alcian blue (AB) at two different pH values (1.0 and 2.5) to stain different types of mucins produced by goblet cells [52]. PAS stains neutral mucins produced by intestinal goblet cells in magenta, whereas AB weakly stains ionised sulphated glycoconjugates at pH = 1.0 and sialic acid at pH = 2.5. All sections were observed under a light microscope (Leica DM LB; Leica Microsystems) and photographed (Olympus DP70 Digital Camera; Olympus Imaging Europa GmbH, Hamburg, Germany). Digital images were processed and analyzed using ANALYSIS image analysis software package (Soft Imaging Systems GmbH). Total numbers of goblet cells (full and empty) and villi height were measured based on the analysis of eight to ten randomly chosen fields from the intestinal mucosa of 15 sea bass *per* diet. Goblet cell counts in intestinal villi were expressed over a contour length of 100 μm, whereas villi height and width were calculated according to the method of Escaffre et al. [53].

Illumina sequencing

Total RNAs from a pool of the proximal intestines of three sea bass from the same replicate tank were extracted separately. Tissues were homogenized (Mini-Beadbeater, Biospec Products Inc., USA) in 1 mL of TRIzol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and solvent extraction was performed following the manufacturer's instructions. Final RNA concentrations were determined by spectrophotometry (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). RNA quality was assessed from A_{260}/A_{280} ratios, and RNA integrity was assessed by denaturing gel electrophoresis. The three RNA samples from same replicate tank were then pooled before generating cDNA libraries. The total RNA concentration of each sample was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA libraries were built, and sequencing was performed as described in [54], with slight modifications. One μg of total RNA from each sample was initially used. dsDNAs were cleaved into 300-bp fragments using a Covaris S220 sonicator (Covaris Inc., Woburn, MA, USA) (duty cycle: 5%, intensity 3, 200 bursts *per* second, duration: 50 s). Eight pM of cDNA libraries *per* lane were loaded onto flow cells (Illumina Inc., San Diego, California, USA). The sequencing of 100-pb paired-end reads was performed on an Illumina Miseq Sequencer at the SéSAME Platform (Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, Caen, France).

Bioinformatic analysis

Bioinformatic analysis was performed on RNA sequencing data from European seabass anterior intestine to study their physiological and molecular responses to dietary hydrolysate inclusion in a low fish meal diet. We tested 5 dietary conditions on the transcriptomic response of sea bass intestine: FM5 and FM20 diets as negative and positive control groups, respectively, and the SH, TH and MH hydrolysate-based diets as experimental groups. The whole raw dataset was filtered and trimmed using Trimmomatic v(0.30) [55], using the following parameters: ILLUMINACLIP:adapter.fa:2:30:10, LEADING:5, TRAILING:5, SLIDING WINDOW:4:5, MINLEN:25. Global sequence quality was checked using FastQC (v 0.11.3) (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). Global assembly was conducted using Trinity 2.1.1. [56], a dedicated package for de novo transcriptomics. A normalization step was conducted according to kmer coverage (kmer of 25 nt, maximum coverage of 30) proposed by the Trinity package. The inconsistent contigs generated by Trinity were removed after a remapping of reads using Bowtie (v 1.1.2) [57], and estimating relative abundance using RSEM [58] to get the FPKM values (v 1.2.22) (the two software programs were launched through perl wrappers provided by the Trinity package). Finally, only transcripts with at least an FPKM value above 1 and isoforms corresponding to more than 1% of the total gene count were kept. Annotation of contig sequences was performed using both Blast2Go software [59] and the Trinotate pipeline (http://trinotate.github.io), as described in [60]. Sequences were blasted against the NCBI nr database (release 193) with the following set-up parameters: max BLAST hits 20, min Expect Value 10^{-3}, and against the human proteome Ensembl database (release 82) (BLASTX). Only hits with E-values < 0.001 were kept. Peptide prediction was performed using Transdecoder [60]. Similarity search (blastp of the Transdecoder-predicted peptides) was performed against the uniprot-swissprot database (release 2015–05). Peptide signal prediction was performed using signalP v4.1 [61]. Transmembrane peptide detection was performed using TMHMM v2.0c [62]. Protein domain search was performed using hmmscan from the hmmer v.3.1b1 suite against the Pfam-A database [63]. Finally, transcriptome functional annotation was performed using the Trinotate pipeline. A Gene Ontology (GO) classification was assigned to each predicted protein in BLASTX (E-Value hit: 10^{-6}, annotation cut-off: 55, GO weight: 5). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotation was based on best BLASTX and PFAM search results.

Differential expression analysis

Differential gene expression between dietary treatments was identified using R software [64] and the DESeq2

package [65]. Multiple testing was accounted for by controlling the false discovery rate (FDR) at 5% using the Benjamini-Hochberg procedure. The RNA targets with adjusted *P*-values < 0.2 and absolute fold changes ≥1.4 were considered as differentially expressed. The relatively low stringency of the cut-off criteria is consistent with other nutrigenomic studies [48]. The impacts of hydrolysate diets on specific pathways were monitored using Ingenuity Pathway Analysis software (Qiagen, Hilden, Germany) with standard parameters. All annotated regulated genes were used.

Statistics

Final BW, SL and K results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) from all fish from each treatment. SGR, intestinal villi height, number of goblet cells, proximal composition and survival rates were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) from the value of each replicate tank. All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (normality and homogeneity of variances were previously checked). Differences were considered significant at $P < 0.05$. For GO term comparison with Wego tool, Pearson Chi-Square tests were performed to show significant differences between diets ($P < 0.05$) [66].

Results

Zootechnical performances

Sea bass and feed performances are summarized in Table 1. At the end of the trial, dietary FM reduction (FM5 diet) had significantly impaired growth performances as compared to the positive control group (FM20) ($P < 0.05$). However, diets including protein hydrolysates (FM5 + 5% TH, FM5 + 5% SH and FM5 + 5% MH) significantly improved growth performances as compared to FM5 ($P < 0.05$) and allowed for similar growth performances as in sea bass fed the FM20 diet. The condition factor (K) and the feed intake were not affected by dietary FM reduction or dietary hydrolysate inclusion ($P > 0.05$). Even if FCR values were slightly improved in fish fed dietary hydrolysates compared to negative control (FM5), the only statistical difference was between the negative and the positive controls ($P < 0.05$). Dietary treatments did not impact fish survival ($P > 0.05$).

Histological examination

Figure 1 shows the mean intestinal villi height of European seabass fed each diet. A significant decrease of villi height was observed in sea bass fed the FM5 diet as compared to the FM20 diet ($P < 0.05$). Inclusion of protein hydrolysates in the FM5 diet significantly increased intestinal villi height to reach values close to or even higher than in sea bass fed the FM20 diet ($P < 0.05$). The response of intestinal globlet cell density to dietary FM reduction and protein hydrolysate supplementation showed the same trend as intestinal villi height.

Global overview of the RNA-seq

The whole European seabass transcriptome project includes 108 Illumina libraries corresponding to the anterior intestine, but also the liver and kidney for each diet, for a total of 832,132,824 paired-end reads of 100 bp. Table 2 presents an overview of the sequencing project. Mapping was conducted both on the reference seabass genome (http://seabass.mpipz.de/DOWNLOADS/) and on the de novo assembled transcriptome from all samples, corresponding to 36 experimental conditions (6 diets * 3 tissues * 2 fish conditions) realized in triplicate.

Mapping scores were as follows: 83.55% for the mRNA extracted from the reference seabass genome annotation, and 92.77% for the de novo assembled transcriptome of the anterior intestine. In addition, the numbers of DE genes and annotations were higher with the de novo assembled transcriptome of the anterior intestine. Further differential expression analyses were then conducted on the global de novo transcriptome, composed of 56,246 transcripts after filtering with FPKM < 1 and isoform < 1%. The transcriptome corresponding to the total expression in

Table 1 Growth performances and survival rates of sea bass fed experimental diets over a 10-week period

DIET	FM5	FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
Initial BW (g)	2.2 ± 0.01	2.2 ± 0.01	2.2 ± 0 .01	2.3 ± 0.00	2.2 ± 0.01
Final BW (g)	11.7 ± 0.4^{a}	13.1 ± 0.3^{b}	13.9 ± 0.4^{b}	13.2 ± 0.5^{b}	13.0 ± 0.6^{b}
SGR (%)	2.5 ± 0.1^{a}	2.7 ± 0.1^{b}	2.8 ± 0.1^{b}	2.7 ± 0.1^{b}	2.7 ± 0.1^{b}
K factor	2.0 ± 0.03	2.0 ± 0.01	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.03
Feed intake (g/kg ABW/d)	33.34 ± 1.46	30.40 ± 1.63	31.55 ± 1.41	30.60 ± 1.12	31.50 ± 0.94
FCR	1.95 ± 0.04^{a}	1.75 ± 0.05^{b}	1.83 ± 0.04^{ab}	1.79 ± 0.04^{ab}	1.82 ± 0.04^{ab}
SR (%)	93.0 ± 2.6	96.0 ± 0.9	96.0 ± 0.9	93.8 ± 0.8	97.0 ± 1.1

Values are the means of four replicate groups of 50 measurements each, presented as mean ± SEM. Lines with different superscript letters differ significantly according to Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$). Abbreviations: *FM5* 5% fish meal diet, *FM20* 20% fish meal diet; *TH* tilapia hydrolysate diet, *SH* shrimp hydrolysate diet, *MH* mixed hydrolysate diet, *BW* body weight, *SGR* specific growth rate, *ABW* average body weight, *FCR* feed conversion ratio, *SR* survival rate

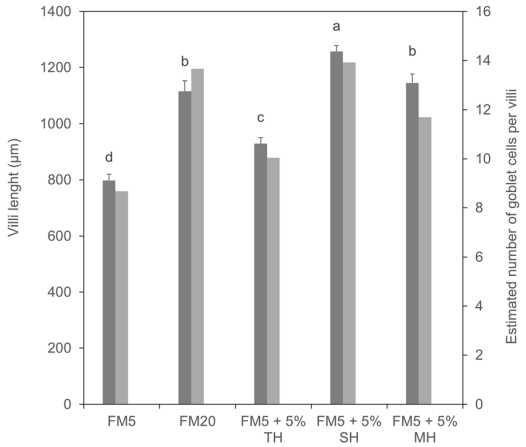


Fig. 1 Villi height and goblet cell density. Villi height values (dark grey) are the means of four replicate groups of 15 measurements each, presented as mean ± SEM. Histograms with the same superscript letter did not differ significantly (Tukey's multiple comparison test, $P > 0.05$). The number of goblet cells within 100 µm of intestinal epithelium (grey) was calculated from 15 individuals *per* dietary group. FM5, 5% fish meal diet; FM20, 20% fish meal diet; TH, tilapia hydrolysate diet; SH, shrimp hydrolysate diet; MH, mixed hydrolysate diet

Table 2 Overview of sequencing, assembly and annotation

Metrix	Unfiltered	Filtered
Transcripts	625,845	56,246
Genes	467,824	39,180
GC%	44.28	44.13
Median length (bp)	389	910
Average length (bp)	922.7	1430.28
Min (bp)	201	201
Max (bp)	58,543	24,803
Total number of bases	577,467,800	80,447,300
Annotation		
Blastx hits with uniprot	278,406	45,853
Blastx hits with uniref90	377,852	46,552
Blastp hits with uniprot	227,499	41,578
Blastp hits with uniref90	280,111	42,257
Proteins with signal peptides	20,540	2226
Proteins with transmembrane helices	28,482	5034
Proteins with PFAM domains	216,290	32,907
Proteins with GO terms	71,304	45,454
Proteins with KEGG	181,895	41,993

Transcript filter: < 1 FPKM, isoform < 1%

the anterior intestinal mucosa was composed of 34,174 transcripts. More precisely, 99% of total expression was present in 49,797 for the whole project and in 10,003 transcripts for the anterior intestinal mucosa respectively.

Quantitative analysis of differential gene expression

Differential gene expression analysis of RNA-seq data was performed to compare diets containing hydrolysates included to low (FM5) and high (FM20) fish meal diets. A total of 383 unique genes were differentially expressed (Table 3). Compared to the FM5 diet, 46 and 50 genes were differentially regulated by diets containing TH and SH, respectively, and this number was higher in the FM20 (197) and MH (270) groups. Compared to the FM5 diet again, the distribution of differentially regulated genes between the FM20 diet and diets including hydrolysates indicated that 30.4% (14/46), 66.0% (33/50), and 39.3% (106/270) of regulated genes were shared with the TH, SH and MH diets, respectively. A total of 301 genes were only regulated by diets containing hydrolysates, but not by the FM20 diet, whereas some genes were regulated only by a specific hydrolysate diet. In particular, 19, 8, and 222 genes were specifically regulated by the TH, SH and MH diets, respectively. Finally, the TH, SH and MH diets induced gene expression patterns very similar to the FM20 diet pattern, with only 8, 6, and 6 genes differentially expressed among these dietary groups, respectively. The complete list and corresponding fold changes of regulated genes is provided in Additional files 2 and 3, for a comparison with the low-FM (FM5) and high-FM (FM20) diets, respectively.

Identification of regulated genes

GO term analysis revealed that dietary FM reduction, from 20 to 5%, led to the regulation of a wide variety of genes involved in the metabolism, immunity, and tissue development of European seabass intestinal mucosa (Fig. 2).

GO term analysis of the genes regulated by hydrolysate-supplemented diets is presented in Fig. 3. The specific hydrolysates, which were influenced by by-product origin and the hydrolysis process, differentially impacted gene regulation ($P < 0.05$). In particular, under the TH diet, the level of GO term annotation was higher for the following categories: macromolecular complex, non-membrane-bounded organelle, intracellular non-membrane-bounded organelle, hydrolase activity, and ribonucleotide binding. In contrast, under the SH diet, the differentially regulated genes belonged mostly to the immune response and response to stimulus. Finally, under the MH diet, lipid metabolism-related GO terms were over-represented.

Based on GO term annotations, 74 differentially expressed transcripts were linked to nutrition as compared

Table 3 Number of differently regulated genes as compared to the low (FM5) and high (FM20) fish meal diets

Nb of regulated genes	FM5	FM20	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% TH	FM5+ 5% MH
vs. FM5	–	197	50	46	270
Shared with FM20		197	33	14	106
Specifically regulated	–	82	8	19	222
vs. FM20	197	–	8	6	6

FM5 5% fish meal diet, *FM20* 20% fish meal diet, *TH* tilapia hydrolysate, *SH* shrimp hydrolysate, *MH* mixed hydrolysate

to the FM5 diet: 15 transcripts related to digestion, 15 to carbohydrates, 7 to starvation, and 37 to carriers (Table 4). Treatments including tilapia hydrolysate (TH and MH diets) impacted the expression of digestive enzyme and carbohydrate metabolism genes more deeply than the FM20 diet, although SH inclusion in the FM5 diet modulated a limited number of genes (5). Under the FM20 diet, carrier genes were over-expressed, except for a few related to lipid transport (apolipoproteins). Diet formulations induced specific regulations with 12, 4, 4, and 32 transcripts differentially expressed by the FM20, SH, TH, and MH diets, respectively, as compared to FM5.

Table 5 presents regulated transcripts related to the cholesterol and long-chain fatty acid pathways. Lipid metabolism was modulated by the MH diet even more than by the FM20 diet. As compared to the FM5 diet, 15, 0, 3, and 28 transcripts were differentially expressed by the FM20, TH, SH and MH diets, respectively. The TH diet did not impact the expression of the transcripts related to the cholesterol and long-chain fatty acid pathways.

Transcripts related to fish immunity and/or the stress response are presented in Table 6. As compared to the FM5 diet, 20, 4, 12, and 36 transcripts were differentially expressed by the FM20, TH, SH and, MH diets, respectively. In contrast to the FM20 diet, all the diets containing hydrolysate down-regulated the expression of transcripts related to interferon. The diets containing one kind of hydrolysate (TH or SH) did not impact the regulation of histo-compatibility antigen-related genes, and only slightly impacted the serum complement- and cellular damage-related genes. Lectin-related gene expression was not affected by dietary TH inclusion.

Impacted metabolic pathways

We conducted various analyses to study the metabolic pathways impacted by dietary hydrolysates. Firstly, we performed a string analysis (https://string-db.org/cgi/input.pl?) to reveal relationships between regulated genes and a defined enrichment (Additional file 4). Regarding the TH diet, 11 genes, distributed into 3 groups, were interconnected, but no enrichment was observed. In the case of the SH diet, 11 regulated genes formed 2 groups, but without inducing overexpression of any specific metabolic pathway. Six regulated genes were common to the TH and SH diets (*cebpd, cebpb, rsad2,*

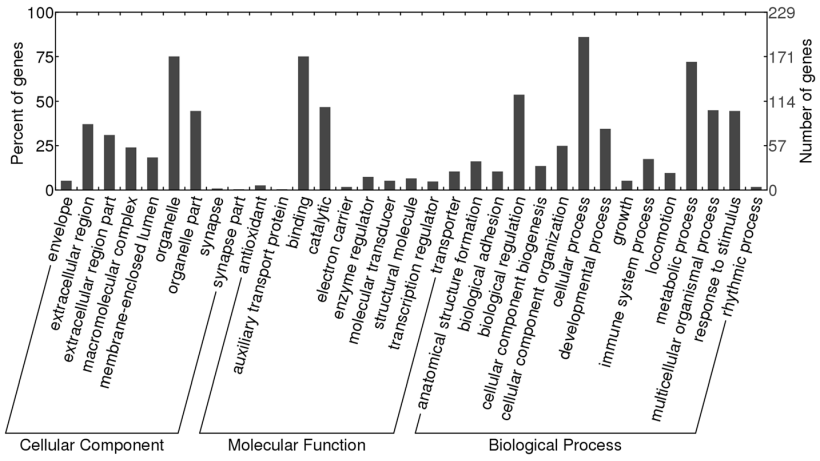


Fig. 2 GO term analysis of regulated genes from the anterior intestinal mucosa of European seabass fed diets containing low FM diet (FM5) as compared to sea bass fed a high FM diet (FM20)

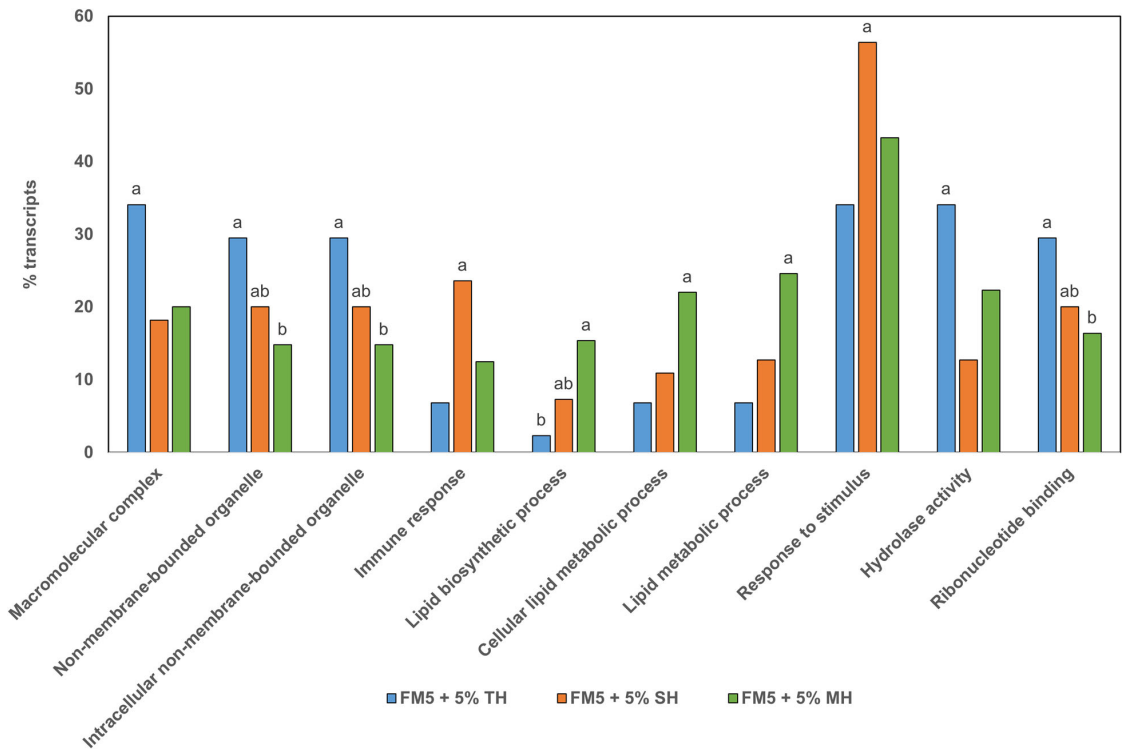


Fig. 3 GO term analysis of regulated genes from the anterior intestinal mucosa of European seabass fed diets containing different types of hydrolysates as compared to sea bass fed a low FM diet (FM5). A Pearson Chi-Square test was performed separately for each GO term annotation to reveal statistical differences between diets. Histograms with the same superscript letter do not differ significantly ($P > 0.05$). FM5, 5% fish meal diet; TH, tilapia hydrolysate; SH, shrimp hydrolysate; MH, mixed hydrolysate

herc6, mx1 and cmpk2). The *g6pc, aldob, eif2ak4, ace, apob* and *hba1, scn2a, junb, fdp5, dhx58* genes were connected to the TH and SH diets, respectively. Under the MH diet, many more regulated genes were connected (87), with the ACLY gene at the center of the gene network. The enrichment scores calculated for biological processes, molecular functions, cellular component and KEGG pathways are shown in Table 7. The main enrichments for biological processes were the following: small molecule metabolic process, cellular lipid metabolic process, lipid metabolic process, organophosphate metabolic process, single-organism catabolic process; cellular components were cytosol, cytoplasmic part, membrane-bounded vesicle, extracellular exosome, and extracellular region part; whereas molecular functions were catalytic activity, ethanolamine kinase activity, oxidoreductase activity, cofactor binding, coenzyme binding, and KEGG metabolic pathways were steroid biosynthesis, fat digestion and absorption, glycerophospholipid metabolism, and glycolysis/gluconeogenesis.

A KEGG analysis based on KEGG orthology annotation showed that the main impacted pathways differed depending on the origin of the dietary hydrolysate (Table 8). In particular, 9, 9, and 55 differentially regulated genes participated to metabolic pathways (KO: 01100) in response to the TH, SH, and MH diets, respectively. To be more precise, the metabolic pathways impacted by the TH diet mainly influenced carbohydrate metabolism, whereas the SH diet impacted the nucleotide metabolism and terpenoid backbone biosynthesis. In addition to these metabolic pathways, defense and immunity pathways were also affected by hydrolysate inclusion to the diet. The complete list of impacted pathways and corresponding genes is available in Additional file 5.

We also investigated the pathways regulated by dietary treatments using Ingenuity Pathway Analysis Software. Results are summarized in Table 9, focusing on the top canonical pathways as well as on molecular and cellular functions. The main metabolic pathways impacted by dietary hydrolysates were the ones related to the

Table 4 Summary of differentially expressed genes related to nutrition

Classification/Transcript	Name (best blast)	Gene fold change as compared to the low fish meal diet (FM5)			
		FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
Digestion related					
TRINITY DN79635 c16 g28	2-phosphoxylose phosphatase 1	−1.85			
TRINITY DN74666 c1 g3	Aminopeptidase N	1.97			2.92
TRINITY DN74666 c0 g1	Aminopeptidase N				2.80
TRINITY DN76691 c3 g3	Chymotrypsin-C		2.30		
TRINITY DN66951 c0 g2	Dipeptidase 1				2.68
TRINITY DN75551 c3 g1	Dipeptidyl peptidase 4	1.68			1.96
TRINITY DN71008 c5 g1	Meprin A subunit alpha	1.54			
TRINITY DN72685 c5 g4	Meprin A subunit beta	1.90			2.07
TRINITY DN75683 c2 g1	Meprin A subunit beta	1.64	1.98		2.04
TRINITY DN6986 c0 g1	Pepsin A		3.11	2.7	4.79
TRINITY DN78404 c2 g1	Phospholipase B1, membrane-associated				3.61
TRINITY DN77910 c4 g1	Phospholipase B1, membrane-associated				4.33
TRINITY DN56338 c0 g1	Trypsinogen-like protein 3				−1.90
TRINITY DN74387 c3 g1	Xaa-Pro aminopeptidase 2	2.26			2.61
TRINITY DN75167 c0 g2	Xaa-Pro dipeptidase				1.72
Carbohydrate related					
TRINITY DN74193 c6 g1	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	1.82			
TRINITY DN73012 c2 g2	ADP-dependent glucokinase				−2.19
TRINITY DN77048 c0 g5	Beta-galactosidase				−2.18
TRINITY DN77546 c2 g14	Beta-hexosaminidase subunit beta				3.15
TRINITY DN76262 c5 g1	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 2	6.76		5.3	6.90
TRINITY DN76669 c2 g6	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 4	2.40			
TRINITY DN67442 c0 g3	Fructose-1,6-bisphosphatase 1		1.99		
TRINITY DN79451 c1 g1	Fructose-bisphosphate aldolase B		2.05		2.17
TRINITY DN77757 c0 g1	Glucose-6-phosphatase				2.48
TRINITY DN78836 c3 g3	Glucose-6-phosphatase		2.99		3.71
TRINITY DN77732 c1 g2	Lysosomal alpha-mannosidase				2.13
TRINITY DN75851 c2 g4	Maltase-glucoamylase, intestinal	2.10	2.31		3.03
TRINITY DN75571 c0 g1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	1.70			2.34
TRINITY DN66475 c0 g1	UDP-glucose 4-epimerase	−2.69			−2.53
TRINITY DN75517 c0 g1	UDP-glucose 6-dehydrogenase				−4.48
Starvation related					
TRINITY DN71986 c0 g1	Angiopoietin-related protein 4	−1.71			−2.88
TRINITY DN65255 c0 g1	Collectrin				4.96
TRINITY DN69741 c0 g2	DEP domain-containing mTOR-interacting protein	2.10			1.87
TRINITY DN79325 c3 g4	Folliculin-interacting protein 1	1.69			
TRINITY DN53239 c0 g1	Neuropeptide Y				−3.68
TRINITY DN59469 c0 g1	Neuropeptide YY-A				−2.59
TRINITY DN76722 c3 g1	Serine/threonine-protein kinase ULK2	2.57			

Table 4 Summary of differentially expressed genes related to nutrition *(Continued)*

Classification/Transcript	Name (best blast)	Gene fold change as compared to the low fish meal diet (FM5)			
		FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
Carrier					
TRINITY DN79318 c11 g9	14 kDa apolipoprotein	−1.64			−2.91
TRINITY DN79318 c11 g7	14 kDa apolipoprotein	−1.79			−2.92
TRINITY DN69453 c0 g1	Apolipoprotein A1/A4/E domain (pfam)	−3.09			−7.19
TRINITY DN71711 c0 g1	Apolipoprotein A-IV	−2.02			− 2.84
TRINITY DN70740 c0 g1	Apolipoprotein A-IV	−3.28		−2.1	−5.05
TRINITY DN79385 c0 g8	Apolipoprotein B-100		2.57		
TRINITY DN73752 c8 g3	Apolipoprotein C-I (ApoC-1) pfam				−3.87
TRINITY DN78962 c1 g23	Apolipoprotein C-II (pfam)				−2.29
TRINITY DN78962 c1 g36	Apolipoprotein C-II (pfam)	−1.66			−2.54
TRINITY DN78793 c2 g9	Apolipoprotein Eb				−4.81
TRINITY DN63420 c0 g2	Aquaporin FA-CHIP				2.00
TRINITY DN76968 c1 g2	Asc-type amino acid transporter 1	1.70			
TRINITY DN70677 c12 g4	ATP-binding cassette sub-family A member 1				1.98
TRINITY DN78213 c1 g1	Chloride anion exchanger				2.74
TRINITY DN68770 c0 g2	Chloride intracellular channel protein 4				2.01
TRINITY DN67686 c1 g1	Chloride intracellular channel protein 5				1.77
TRINITY DN69002 c1 g2	Large neutral amino acids transporter small subunit 4				1.96
TRINITY DN79534 c0 g1	MLN64 N-terminal domain homolog				2.39
TRINITY DN75016 c2 g2	Monocarboxylate transporter 12-B				1.81
TRINITY DN71474 c7 g3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1				2.64
TRINITY DN74500 c2 g1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3				1.94
TRINITY DN79418 c0 g1	Niemann-Pick C1-like protein 1				2.65
TRINITY DN76301 c3 g1	Niemann-Pick C1-like protein 1				1.85
TRINITY DN75948 c4 g4	Phospholipid-transporting ATPase IA	2.26			
TRINITY DN75214 c1 g9	Prolyl endopeptidase-like				1.85
TRINITY DN77239 c2 g2	Sodium/hydrogen exchanger 7				4.65
TRINITY DN67206 c1 g1	Sodium/myo-inositol cotransporter	−3.06			−3.55
TRINITY DN67731 c1 g1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1		2.22		2.99
TRINITY DN79640 c8 g1	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT1	2.83		2.7	3.96
TRINITY DN71667 c2 g2	Sodium-dependent phosphate transport protein 2B			2.3	3.25
TRINITY DN69556 c1 g3	Solute carrier family 13 member 2	2.15			2.78
TRINITY DN60850 c0 g1	Solute carrier family 13 member 5	2.34		2.1	2.73
TRINITY DN68059 c1 g4	Solute carrier family 15 member 1		1.78		
TRINITY DN73228 c5 g1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2				2.56
TRINITY DN72783 c3 g1	Solute carrier family 22 member 6		−3.83		
TRINITY DN79648 c5 g9	Solute carrier family 40 member 1				2.60
TRINITY DN73224 c8 g2	Zinc transporter 1				2.54

Values correspond to fold changes between diets and the low fish meal control diet. Positive values indicate upregulation, and negative values down regulation. *FM5* 5% fish meal diet, *FM20* 20% fish meal diet, *TH* tilapia hydrolysate diet, *SH* shrimp hydrolysate diet, *MH* mixed hydrolysate diet

Table 5 Summary of differentially expressed genes related to cholesterol and long chain fatty acid pathways

Classification/Transcript		Gene fold change as compared to the low fish meal diet (FM5)			
		FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
Cholesterol related					
TRINITY DN71881 c0 g2	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase				−3.00
TRINITY DN67458 c2 g3	Delta(14)-sterol reductase				−2.75
TRINITY DN76391 c4 g1	Farnesyl pyrophosphate synthase	−2.98		−2.7	−5.68
TRINITY DN71950 c2 g1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	−1.93			−3.19
TRINITY DN79342 c1 g2	Lanosterol 14-alpha demethylase	−1.85			−2.06
TRINITY DN75940 c1 g2	Lanosterol synthase	−2.65			−3.74
TRINITY DN76284 c0 g1	Lathosterol oxidase				−2.68
TRINITY DN72542 c3 g1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	2.61			
TRINITY DN66926 c0 g1	Squalene monooxygenase				−3.82
TRINITY DN78143 c3 g1	Squalene synthase				−2.64
TRINITY DN71672 c0 g3	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating				−3.59
TRINITY DN75298 c0 g2	Transmembrane protein 97				−2.25
Fatty acid related					
TRINITY DN70866 c4 g9	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial				−1.92
TRINITY DN78203 c0 g3	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial				−2.37
TRINITY DN74534 c0 g3	Acetoacetyl-CoA synthetase				−4.95
TRINITY DN74255 c1 g3	Acetyl-CoA carboxylase				−2.11
TRINITY DN72189 c4 g3	Acyl-CoA desaturase	1.78			5.40
TRINITY DN70036 c1 g2	Alkylglycerol monooxygenase	1.99			
TRINITY DN77637 c3 g4	ATP-binding cassette sub-family D member 2				−3.41
TRINITY DN74635 c4 g2	Elongation of very long chain fatty acids protein 4				−2.71
TRINITY DN73852 c1 g2	Elongation of very long chain fatty acids protein 6				−3.96
TRINITY DN79046 c1 g4	Fatty acid hydroxylase domain-containing protein 2				1.94
TRINITY DN79053 c1 g4	Fatty acid synthase				−3.33
TRINITY DN79341 c1 g1	Fatty acid-binding protein, brain	4.26			
TRINITY DN56507 c0 g1	Fatty acid-binding protein, intestinal				−1.88
TRINITY DN79266 c1 g10	Fatty acid-binding protein, liver-type				−2.17
TRINITY DN78522 c0 g2	Long-chain-fatty-acid–CoA ligase 4	−1.89			
TRINITY DN75220 c0 g3	Methylsterol monooxygenase 1	−2.26			−2.31
TRINITY DN78695 c0 g7	Perilipin-2	−3.04			
TRINITY DN78695 c0 g2	Perilipin-2	−3.15		−2.3	
TRINITY DN72627 c0 g1	Phosphatidate phosphatase LPIN1				−4.12
TRINITY DN72627 c1 g3	Phosphatidate phosphatase LPIN2	2.00			
TRINITY DN71726 c1 g1	Sodium-dependent lysophosphatidylcholine symporter 1-B				−3.38
TRINITY DN72471 c1 g2	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial				−2.18
TRINITY DN67880 c1 g2	Very long-chain acyl-CoA synthetase			2.1	3.01
TRINITY DN71905 c5 g2	Very long-chain acyl-CoA synthetase	1.93			
TRINITY DN76293 c0 g2	Very long-chain acyl-CoA synthetase	1.87			

Values correspond to fold changes between diets and the low fish meal control diet. Positive values indicate upregulation, and negative values down regulation. *FM5* 5% fish meal diet, *FM20* 20% fish meal diet, *TH* tilapia hydrolysate diet, *SH* shrimp hydrolysate diet, *MH* mixed hydrolysate diet

Table 6 Summary of differentially expressed genes related to fish health status

Classification/Transcript	Name (best blast)	Gene fold change as compared to the low fish meal diet (FM5)			
		FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
Interferon related					
TRINITY DN69994 c1 g3	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase				2.39
TRINITY DN67652 c1 g1	Interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A			−2.2	−2.22
TRINITY DN78765 c2 g3	Interferon stimulated gene 15			−3.4	
TRINITY DN78866 c1 g8	Interferon-induced GTP-binding protein Mx		−2.72		−2.56
TRINITY DN78866 c1 g9	Interferon-induced GTP-binding protein Mx		−3.37	−2.7	−2.41
TRINITY DN78532 c1 g14	Interferon-inducible protein 56			−2.3	−2.23
Histocompatibility antigen related					
TRINITY DN79419 c7 g6	Class I histocompatibility antigen, B alpha chain	1.95			2.98
TRINITY DN79651 c13 g9	H^{-2} class I histocompatibility antigen, K-K alpha chain				3.85
TRINITY DN78477 c2 g7	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain	1.95			2.74
TRINITY DN72971 c0 g4	Rano class II histocompatibility antigen, A beta chain	2.20			2.45
TRINITY DN72971 c0 g3	Rano class II histocompatibility antigen, A beta chain				3.32
Lectin related					
TRINITY DN69402 c2 g1	Fucolectin	4.15		3.9	5.35
TRINITY DN69402 c2 g2	Fucolectin	6.15		2.9	7.67
TRINITY DN65160 c0 g3	Fucolectin-1	2.46			3.39
TRINITY DN65160 c0 g4	Fucolectin-1			4.2	7.27
TRINITY DN78379 c3 g2	Fucolectin-1				5.03
TRINITY DN78379 c3 g7	Fucolectin-1	2.54			2.38
TRINITY DN69906 c1 g1	Nattectin				3.37
Pentraxin related					
TRINITY DN77743 c1 g13	C-reactive protein			2.9	
TRINITY DN77743 c1 g7	C-reactive protein	3.73	3.25	2.5	4.47
TRINITY DN14972 c0 g1	Serum amyloid P-component	5.12		2.8	5.87
Serum complement related					
TRINITY DN60272 c0 g1	C1q domain (pfam)	1.53			
TRINITY DN60272 c0 g1	C1q domain (pfam)	1.53			
TRINITY DN78829 c1 g1	C1q domain (pfam)	3.53			4.69
TRINITY DN77811 c0 g3	C1q domain (pfam)				2.91
TRINITY DN73741 c7 g14	C1q-like 23 kDa protein		6.85		
TRINITY DN67406 c0 g1	C1q-like 23 kDa protein	7.94			10.81
TRINITY DN79561 c2 g21	C1q-like 23 kDa protein	6.25			10.35
TNF-α related					
TRINITY DN59663 c0 g1	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 3				2.31
TRINITY DN75139 c4 g2	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	2.20		2.3	3.09
TRINITY DN69734 c2 g1	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A				2.82
Cellular stress related					
TRINITY DN71217 c2 g2	Glutathione peroxidase 2				−2.58
TRINITY DN79626 c5 g2	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	−2.21			−3.81
TRINITY DN79626 c5 g6	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial				−3.27
TRINITY DN79626 c5 g1	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	−2.56			−4.22

Table 6 Summary of differentially expressed genes related to fish health status *(Continued)*

Classification/Transcript	Name (best blast)	Gene fold change as compared to the low fish meal diet (FM5)			
		FM20	FM5 + 5% TH	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% MH
TRINITY DN76439 c4 g1	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	2.72			4.40
TRINITY DN63786 c0 g2	Sestrin-1				2.12
TRINITY DN77226 c0 g3	Selenocysteine lyase				−3.08
TRINITY DN68233 c1 g1	DNA damage-inducible transcript 4-like protein	−6.45		−3.2	−3.41
TRINITY DN77069 c1 g2	DNA repair protein complementing XP-A cells homolog	−2.82			−2.64
TRINITY DN76110 c0 g10	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2				−2.57

Values correspond to fold changes between diets and the low fish meal control diet. Positive values indicate upregulation, and negative values down regulation. *FM5* 5% fish meal diet, *FM20* 20% fish meal diet, *TH* tilapia hydrolysate diet, *SH* shrimp hydrolysate diet, *MH* mixed hydrolysate diet

carbohydrate and lipid metabolisms. Complete results are available in Additional file 6.

Discussion

Impact of hydrolysate inclusion in a low FM diet on European seabass growth performances and histological organization of the intestine mucosa

Our results showed that a 15% decrease of dietary FM negatively affected the growth performances of European seabass as compared to the 20% FM control diet. These findings are consistent with other studies about other carnivorous fish species [12, 67–69]. However, dietary inclusion of 5% of protein hydrolysate restored growth performances to the same level as the FM20 control diet. These positive effects of dietary hydrolysates are in agreement with other studies about fish fed diets incorporating such ingredients [29, 32, 38].

Feed intake was not modified by diets as fish were fed in excess to guarantee a high consumption. Feed conversion ratio improvement of fish fed the FM20 diet compared to the FM5 diet could be the result of a better nutritional balance of the diet combined to a better feed consumption. Dietary inclusion of hydrolysate allowed to recover a good feed intake as well as to improve enough feed efficiency to reach fish and feed performance very closed to the positive control. The high degree of protein hydrolysis of our hydrolysates [37, 40], resulting in enrichment of the feed with highly palatable and digestible low-molecular-weight peptides and free amino acids, could explain why growth performances were improved. However, fish growth performances should not be the single criterion to evaluate the performance of a new aquafeed formula. It is also necessary to study the response of fish metabolism to ensure that modifications in the diet will not induce significant metabolic disturbances that could affect fish resistance to their environment. Maintaining the integrity of fish intestines is of critical concern when considering the performance of aquaculture feeds. Many studies have shown that enteritis events can occur when carnivorous fish are fed feeds formulated with high levels of plant-based proteins [17, 70–74]. A direct consequence of enteritis is deterioration of feed utilization and of the fish health status. The intestine is involved not only in digestion and feed absorption, but also in water and electrolyte balance, nutrient sensing, and immunity. This functional diversity is currently being elucidated in fish, and different histological and molecular approaches are helping to understand the many vital functions conducted along the gastrointestinal tract [46]. The general organization and morphometric parameters of the intestine, represented by villi size and the number of goblet cells, are good indicators of the health and condition of the fish intestinal mucosa: an increase of intestinal villi size reflects an improvement of the exchange surface, of the activity of the brush border enzymes and of the nutrient transport systems, with positive effects on digestion and absorption [75]. In addition, in rainbow trout (*O. mykiss*) goblet cells regulate proteins or peptides as well as ion and fluid transport, and also provide an effective immune barrier against potentially pathogenic gut bacteria [47, 76]. Furthermore, enhanced mucin production by increased goblet cell populations physically displaces potentially pathogenic organisms, a more diverse microbiota leads to a thickening of the mucus layer, and this improves gut microniches inhabited by these beneficial bacteria [77]. In the present study, we demonstrate that European seabass fed a diet containing low fish meal levels (FM5) had an altered intestinal mucosa. These results are consistent with other studies that showed a decrease in villi height [39, 72, 78–80] and/or in the number of goblet cells [38, 39] in fish fed the low FM diet. Incorporation of hydrolysates at a relatively low inclusion rate (5%) in the low FM formula (FM5) improved the histological organization of the intestinal mucosa, with villi heights close to those observed in the control group (FM20). Moreover, the origin of the raw material used to manufacture the hydrolysates, as well as their hydrolysis level, seemed to be determining parameters for enhancing the morphological development of the intestine. The different specifications of the protein hydrolysates led to different

Table 7 Functional enrichments related to the mixed hydrolysate diet (FM5 + 5% MH) as compared to the low FM diet (FM5)

Pathway ID	Pathway description	Count in gene set	False discovery rate
Biological Process (GO)			
GO:0044281	small molecule metabolic process	47	1.29E-10
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	27	1.35E-08
GO:0006629	lipid metabolic process	30	2.85E-08
GO:0019637	organophosphate metabolic process	25	1.72E-07
GO:0044712	single-organism catabolic process	26	2.12E-07
Molecular Function (GO)			
GO:0003824	catalytic activity	71	4.72E-08
GO:0004305	ethanolamine kinase activity	4	4.71E-06
GO:0016491	oxidoreductase activity	20	2.75E-05
GO:0048037	cofactor binding	13	2.75E-05
GO:0050662	coenzyme binding	11	4.17E-05
Cellular Component (GO)			
GO:0005829	cytosol	49	5.48E-06
GO:0044444	cytoplasmic part	80	7.17E-06
GO:0031988	membrane-bounded vesicle	49	1.27E-05
GO:0070062	extracellular exosome	43	1.27E-05
GO:0044421	extracellular region part	50	2.76E-05
KEGG Pathways			
1100	Metabolic pathways	32	4.73E-09
100	Steroid biosynthesis	4	0.000973
4975	Fat digestion and absorption	5	0.000973
564	Glycerophospholipid metabolism	6	0.00308
10	Glycolysis/Gluconeogenesis	4	0.0473

responses of villi height, with a higher benefit from dietary SH than TH, although MH performance lay in-between. However, it is still unclear whether this improved response was related to a dietary effect of SH on the intestinal mucosa due to i) the higher intake of free amino acids, or ii) a protective effect of the intestinal epithelium due to the presence of bioactive peptides in the hydrolysate, or iii) a modulation of the intestinal microbiota and/or of antimicrobial peptides. These hypotheses are not mutually exclusive. Although the mode of action of hydrolysates remains to be elucidated, this study confirms that they are beneficial for the fish intestine, as already observed in olive flounder [39]. It also confirms the potential of hydrolysates for replacing FM in aquafeeds for carnivorous species.

Impact of hydrolysate inclusion in a low FM diet on intestine gene expression

The intestine is a complex organ because many metabolic interactions take place inside it [49]. We analyzed the differentially expressed genes from the intestinal mucosa of European seabass fed different diets. Low FM (FM5 diet) caused metabolic disturbances, and certain metabolic pathways were modulated in link with dietary inclusion of protein hydrolysates of different origins. Dietary FM reduction (FM5 diet) impaired several intestinal functions, i.e. nutrient transport, immune defense, gut morphogenesis (Fig. 2). These transcriptomic results are consistent with the lower performances recorded in sea bass fed the FM5 diet throughout the zootechnical trial.

The different transcriptomic data analyses evidenced a few discrepancies in sea bass responses depending on dietary hydrolysate origin (Tables 8 and 9). The comparative analysis of the two SH and TH protein hydrolysates confirmed that the sea bass intestinal transcriptomic response seemed to be closely related to the biochemical properties of each hydrolysate. Thus, based on GO term analysis, a higher proportion of genes (34.1% vs. 12.7%) linked to hydrolases was differentially expressed in sea bass fed the TH diet as compared to the SH diet (Fig. 3). Interestingly, the regulated enzymes were not only implied in peptide/protein degradation, as expected from dietary protein hydrolysate inclusion, but also in carbohydrate degradation (malatase-gluco-amylase, aldolase B,

Table 8 KEGG analysis of the top 5 pathways regulated by hydrolysate-supplemented diets as compared to the low FM diet (FM5)

TH diet	Nb. of regulated genes
01100 Metabolic pathways	9
04974 Protein digestion and absorption	6
03010 Ribosome	3
04972 Pancreatic secretion	3
01120 Microbial metabolism in diverse environments	
SH diet	Nb. of regulated genes
01100 Metabolic pathways	9
04210 Apoptosis	5
04217 Necroptosis	4
05164 Influenza A	4
01110 Biosynthesis of secondary metabolites	3
MH diet	Nb. of regulated genes
01100 Metabolic pathways	55
01110 Biosynthesis of secondary metabolites	28
01130 Biosynthesis of antibiotics	19
00100 Steroid biosynthesis	9
05166 HTLV-I infection	9

TH tilapia hydrolysate, *SH* shrimp hydrolysate, *MH* mixed hydrolysate

glucose-6-phosphatase), and probably stimulate starch degradation in the PBM fraction of diets (Table 4). These differences in gene expression of intestinal hydrolases might be explained by the different peptide compositions of tilapia and shrimp hydrolysates. TH is mainly composed of higher-molecular-weight peptides than SH, and also exhibits higher peptide diversity than SH [40]. These higher-molecular-weight peptides could require additional hydrolysis by enterocyte enzymes, resulting in greater mRNA synthesis from genes related to protein digestion and absorption. On the contrary, GO terms of differentially expressed genes involved in the immune response (6.8% vs. 23.6%) and in the response to stimuli (34% vs. 56.4%) were less in sea bass fed the TH diet than in sea bass fed the SH diet (Fig. 3). In particular, the SH diet induced the expression of lectin-related genes (Table 6), which protect the intestinal mucosa from pathogenic bacterial invasion [81]. These findings support the immunostimulating effect of SH. SH is mainly composed of low-molecular-weight peptides derived from the enzymatic cleavage of haemocyanin [37], which has immunostimulatory properties used in the treatment of cancers such as melanomas or in bioadjuvants for vaccines [82–84]. In addition, peptides derived from haemocyanin degradation are also known to exhibit other bioactive properties such as responses to stressors, pathogens (bacteria and parasites) and antibacterial agents [85]. Marine protein hydrolysates have been reported to have in

Table 9 Ingenuity Pathway Analysis: main pathways impacted by hydrolysate-supplemented diets

TH diet versus FM5 diet	SH diet versus FM5 diet	MH diet versus FM5 diet
Top Canonical Pathways (Name/p-value/Overlap)	Top Canonical Pathways (Name/p-value/Overlap)	Top Canonical Pathways (Name/*p*-value/Overlap)
Glycolysis I/1.23E-03/8%	Role of Lipids/Lipid Rafts in the Pathogenesis of Influenza/9.11E-04/9.1%	Superpathway of Cholesterol Biosynthesis/2.13E-17/42.9%
Gluconeogenesis I/1.23E-03/8%	Glutamine Biosynthesis I/2.04E-03/100%	Cholesterol Biosynthesis I/6.27E-16/ 69.2%
Glutamine Biosynthesis I/2.08E-03/100%	Xanthine and Xanthosine Salvage/2.04E-03/ 100%	Cholesterol Biosynthesis II (via 24.25-dihydrolanosterol) / 6.27E-16/69.2%
FXR/RXR Activation/2.30E-03/2.4%	Type II Diabetes Mellitus Signalling/2.20E-03/ 2.4%	Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)/6.27E-/ 69.2%
IL-17A Signalling in Fibroblasts/2.41E-03/ 5.7%	IL-17A Signalling in Fibroblasts/2.31E-03/ 5.7%	Zymosterol Biosynthesis/1.48E-07/ 66.7%
Molecular and Cellular Functions (Name/p-value/#Molecules)	Molecular and Cellular Functions (Name/*p*-value/#Molecules)	Molecular and Cellular Functions (Name/*p*-value/#Molecules)
Cell Morphology/2.27E-02 - 1.27E-05/9	Cell Death and Survival/1.73E-02 - 1.81E-05/ 14	Lipid Metabolism/6.58E-03 - 2.66E-14/79
Carbohydrate Metabolism/2.67E-02 - 6.33E-05/9	Cell-To-Cell Signalling and Interaction/1.62E-02 - 2.68E-05/10	Small Molecule Biochemistry/6.58E-03 - 2.66E-14/106
Small Molecule Biochemistry/2.75E-02 - 6.33E-05/20	Cellular Development 1.72E-02 -/3.65E-05/15	Vitamin and Mineral Metabolism/ 6.25E-03 - 1.96E-11/30
Amino Acid Metabolism/2.67E-02 - 2.76E-04/ 4	Cellular Function and Maintenance/1.73E-02 - 3.65E-05/14	Molecular Transport/6.25E-03 - 3.02E-10/74
Post-Translational Modification/1.24E-02 - 2.76E-04/2	Cellular Growth and Proliferation/1.72E-02 - 3.65E-05/12	Carbohydrate Metabolism/6.25E-03 - 1.60E-08/43

TH tilapia hydrolysate, *SH* shrimp hydrolysate, *MH* mixed hydrolysate, *FM5* low fish meal diet

vitro antibacterial [37, 40], antioxidant and/or immunomodulatory [86] functional properties. Our results seem to confirm immuno-stimulatory effects (interferon, histocompatibility antigen, lectin, pentraxin or serum complement system expression) at a transcriptomic level, as already observed in several carnivorous fish fed diets containing the same hydrolysates [32, 33, 38, 39, 87]. Moreover, hydrolysates down-regulated the expression of interferon-related genes. In fish, genes linked to interferon are expressed during viral infection [81], and in vertebrates, interferons are also involved in intestinal homeostasis after infection [88]. These transcriptomic results confirm that dietary hydrolysate supplementation has beneficial effects on the intestinal mucosa.

String analysis did not evidence any GO term or metabolic enrichment in diets containing hydrolysates of a specific origin (shrimp or tilapia). This result is surprising given the marked difference in growth responses between sea bass fed the FM5 diet and sea bass fed diets containing hydrolysates, as well as the positive response of intestine histological organization in sea bass fed the SH diet. For the SH diet, this may be due to the fact that sea bass fed the FM5 diet did not show any histological signs of severe enteritis or inflammation of the intestinal mucosa; besides, there was no change at a molecular level. Enteritis induces the regulation of a large number of genes (apoptosis, proinflammatory, oxidative stress, endocytosis, and cell migration) as already shown in a study on the replacement of FM by soybean meal in Atlantic salmon [48]. In our study, the physiological state of the sea bass may not have been sufficiently altered to induce a transcriptomic response taking into account our filtering treatment (absolute fold change > 1.4 and *P-adj* < 0.2). Hence, the low number of regulated genes did not allow us to highlight any group of genes to explain the phenotypic differences observed between dietary treatments at a transcriptomic level.

On the contrary, in sea bass fed the diet containing the mixed hydrolysate (MH diet), the much larger number of differentially regulated genes (270 as compared to the FM5 diet) made it possible to carry out an enrichment analysis with String both in GO terms and in metabolic pathways. The analysis showed that the lipid metabolism was strongly impacted, and acetyl-CoA appeared to play a central role in this process. Interestingly, the MH diet decreased cholesterol and long-chain fatty acid metabolism (Table 5). Genes involved in cholesterol and long-chain fatty acid metabolism were overexpressed in Atlantic salmon fed protein diets containing a high level of soybean meal [48]. On the contrary, these two genes families were down-regulated in European seabass fed the MH diet. Moreover, many genes coding for apolipoprotein, which is involved in lipid transport, were down-regulated in sea bass fed with the mixed hydrolysate. These results provide evidence for a significant effect of the mixed hydrolysate diet on lipid metabolism at the transcriptomic level. Such an effect would deserve to be deeply investigated to understand the phenotypic consequences (lipid utilization and storage) of such gene responses to dietary protein hydrolysate. It is worth noting that modulation of lipid metabolism by dietary protein hydrolysates has already been observed in turbot and mice, with a beneficial effect on the reduction of visceral lipid accumulation [35, 89–91].

The MH diet also promoted European seabass health status by regulating the same immuno-stimulatory related genes as the TH and SH diets, but also by specifically modulating the expression of specific genes, such as H^{-2} class I and class II histocompatibility antigen genes, which were over-expressed (Table 6). Moreover, the genes involved in the response to cellular damage (glutathione peroxidase, DNA damage repair) were under-expressed, which suggests an improvement of intestinal health and condition. Król et al. demonstrated that deregulation of the intestine (enteritis) induced the overexpression of genes linked to the oxidative defenses of epithelial cells [48]. A possible explanation for this larger number of differentially regulated genes may be that the combined hydrolysates provided a wider variety of functional peptides, an important characteristic linked to the performance of dietary protein hydrolysates [34].

Nevertheless, a focus could be performed further by qPCR in order to target the major actors of the main metabolic pathways highlighted by this study.

Restoring the intestinal transcriptomic profile of the high FM diet with a low FM diet supplemented with protein hydrolysates

Hydrolysate diets induced a similar pattern of gene expression as the control diet (FM20), regardless of the included hydrolysate. Compared to the FM20 diet, the number of differentially regulated genes was very low for all hydrolysate diets, with 6, 8, and 6 genes for the TH, SH, and MH diets, respectively (Additional file 3). Once again, regulated genes were specific to hydrolysate origin, so that no gene was regulated by all three TH, SH and MH diets as compared to the FM20 group. Another mechanism involved in the differences in gene regulation between hydrolysate diets may be related to the glycosylation types in the resulting peptide fragments. The method used to generate these hydrolysates may also influence the degree of conservation of the glycosidic residues. Immune stimulation was more prominent in sea bass fed with SH; in parallel, glycosylation patterns conserved among plants and invertebrates have been found to be immunogenic in vertebrates [92]. Further work in the area of protein glycosylation may also

be profitable and provide insights into this hypothesis. Although it is difficult to conclude about the relationship between regulated genes and the functional benefits of the TH diet, our results show that the SH diet down-regulated members of the GTPase IMAP family (members 6, 7 and 8) related to immunity. This highlights again the immunomodulatory effect of SH. Regarding the MH diet, Acyl-CoA desaturase and UDP-glucose 6-dehydrogenase were respectively over- and under-expressed as compared to the FM20 diet. Therefore the lipid and carbohydrate pathways were modulated by this dietary treatment. Achieving the performance of a diet rich in FM during grow-out is a key point when dealing with low FM diets and alternative ingredients. In this study, the incorporation of 5% of hydrolysate compensated for the metabolic disturbances associated with the replacement of 15% of FM by a mixture of plant proteins, as observed in European seabass fed the FM5 diet. The intestinal transcriptomic response confirmed the results obtained at the zootechnical and gut histological levels, i.e. protein hydrolysates of aquaculture origin are valuable candidates to support FM replacement without deteriorating the zootechnical and functional performances of aquafeeds.

Conclusion

Within the global context of FM replacement in aquaculture feed formulation, evaluating the performance of new raw materials has become a crucial economic stake for aquafeed manufacturers. Although assessing the zootechnical performances of new formulations remains indispensable, the development of new protocols and tools for molecular and biochemical investigations can provide a more comprehensive view of the response of animals to novel diets. We combined zootechnical and transcriptomic approaches to evaluate the performances of protein hydrolysates as surrogates of dietary FM in European seabass. The reduction of the dietary FM level from 20 to 5% significantly impaired growth performances, intestinal histological organization, and induced significant changes in the transcriptomic profile of the intestine. By incorporating protein hydrolysate into the low FM diet (FM5) restored European seabass performances to a similar high level to those recorded with the high FM diet (FM20). In addition, this study demonstrates that the raw material used to manufacture protein hydrolysate is an important determinant in the transcriptomic response of fish.

Although the hydrolysates promoted the same zootechnical performances, the transcriptomic response of the intestine showed that genes and metabolic pathways were modulated in a hydrolysate-dependent manner. Moreover, including a combination of tilapia and shrimp hydrolysates into European seabass feed regulated a higher number of genes than the independent hydrolysates. It would be interesting to assess hydrolysate performances in fish grown under more challenging conditions (high density, low oxygen, low/high temperature,…) to check how these differences in transcriptomic profiles are translated into phenotypic responses. These results offer an interesting scenario for the formulation of new high-performance feeds with a low level of FM inclusion. The analysis of the transcriptomic responses of liver and kidney sampled in the present study will allow us to complete this work and to better understand how metabolic pathways are modulated by the replacement of FM by protein hydrolysates in European seabass.

Additional files

Additional file 1: Diet formulation and proximal composition. FM5, 5% fish meal diet; FM20, 20% fish meal diet; TH, tilapia hydrolysate diet; SH, shrimp hydrolysate diet; MH, mixed hydrolysate diet. (XLSX 10 kb)

Additional file 2: Global list and fold changes of differentially expressed genes versus FM5. Values correspond to fold changes between diets and the low fish meal control diet. Positive values indicate upregulation, and negative values down regulation. FM5, 5% fish meal diet; FM20, 20% fish meal diet; TH, tilapia hydrolysate diet; SH, shrimp hydrolysate diet; MH, mixed hydrolysate diet. Values with "*" correspond to fold change means of isoforms. If isoforms were at the same time up and down regulated each values appear. (XLSX 37 kb)

Additional file 3: Global list and fold changes of differentially expressed genes versus FM20. Values correspond to fold changes between hydrolysate diets and the high fish meal control diet. Positive values indicate upregulation, and negative values down regulation. (XLSX 10 kb)

Additional file 4: Relationship between regulated genes by hydrolysate diets. Differentially expressed gene compared to low fish meal diet have been tested against *Homo sapiens* background. Only connected genes are presented. A. relation between the regulated genes by shrimp hydrolysate diet. B. relation between the regulated genes by tilapia hydrolysate diet. C. relation between the regulated genes by mixed hydrolysate diet. (TIF 2612 kb)

Additional file 5: KEGG analysis: list of genes differentially expressed by hydrolysate and high fish meal diets compared to low fish meal diet. (XLSX 63 kb)

Additional file 6: IPA analysis: list of main pathways impacted by hydrolysate and high fish meal diets compared to low fish meal diet. (XLSX 57 kb)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dominique Vaur, Nicolas Goardon and Angelina Legros for the technical assistance on the Miseq sequencing experiment at the SéSAME platform.

Funding

A. Leduc was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (grant number 2014/1274), and by DIANA AQUA (Symrise group). E. Gisbert and K. Blyth Andree were partially supported by the MINECO (Spanish Government, project reference AGL2014–51839-C6–5-R).

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article (and its additional files). The raw data generated and/or analyzed during the current study is not publicly available due to the data mining still in progress. Nevertheless, some data could be available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions
CZG, VF and JH conceived and designed the study and corrected the manuscrit. MR, EG and KA performed feeding trial and sampling. EC and GLC performed bioinformatics analysis. HC and ALS performed IPA analysis. AL performed RNAseq banking, Go term, String and KEGG analyzes, interpreted results and wrote the manuscript. All authors discussed, commented on the manuscript and approved the final manuscript.

Ethics approval
All experimental procedures involving sea bass were conducted in compliance with the experimental research protocol approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the IRTA, the Departament Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (permit number 7962) and in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU) for the use of laboratory animals.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]Normandie University, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Université de Caen Normandie, Caen 14032, France. [2]UPMC, CNRS, FR2424, ABiMS, Station Biologique, Roscoff, France. [3]Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, Rouen, France. [4]Aquativ (DianaAqua, Symrise Group), Elven, France. [5]Institute of Agriculture and Food Research and Technology (IRTA), Sant Carles de la Ràpita, Spain.

Received: 4 January 2018 Accepted: 10 May 2018
Published online: 24 May 2018

References

1. FAO. FAO Global Aquaculture Production statistics database updated to. Summary information. Food Agric Oraganization United Nations. 2013;2015:2013. Available: http://www.fao.org/3/a-i4899e.pdf
2. World Bank. Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture. Agric Environ Serv Discuss Pap. 2013;3: 102. doi:83177-GLB.
3. Hardy RW. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. Aquaculture Research. 2010:770–6. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x.
4. Duarte CM, Holmer M, Olsen Y, Soto D, Marbà N, Guiu J, et al. Will the oceans help feed humanity? Bioscience. 2009;59:967–76. https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.8.
5. Robaina L, Izquierdo MS, Moyano FJ, Socorro J, Vergara JM, Montero D, et al. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (Sparus aurata): nutritional and histological implications. Aquaculture. 1995;130:219–33. https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00225-D.
6. Kaushik SJ, Covès D, Dutto G, Blanc D. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture. 2004;230:391–404. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8.
7. Salze G, McLean E, Battle PR, Schwarz MH, Craig SR. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture.. Elsevier B.V.; 2010;298: 294–299 doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.003
8. Moxley JD, Rossi W, Buentello A, Pohlenz C, Gatlin DM, Tomasso JR. Replacement of fish meal with plant feedstuffs in the diet of red drum, Sciaenops ocellatus: effects on production characteristics and tolerance to aquaculture-related stressors. J World Aquac Soc. 2014;45:192–8. https://doi.org/10.1111/jwas.12106.
9. Aksnes A, Hope B, Jönsson E, Björnsson BT, Albrektsen S. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed high plant protein diets. I: growth, growth regulation and feed utilization. Aquaculture. 2006;261:305–17. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.025.
10. Hernández MD, Martínez FJ, Jover M, García B. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (Diplodus puntazzo) diet. Aquaculture. 2007;263:159–67. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.040.
11. Médale F, Kaushik S. Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. Cah Agric. 2009;18:103–11. https://doi.org/10.1684/agr.2009.0279.
12. Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture. 2001:197–227. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9.
13. Krogdahl A, Hemre GI, Mommsen TP. Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. Aquaculture Nutrition. 2005:103–22. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x.
14. Baeverfjord G, Krogdahl Å. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, Salmo salar L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. J Fish Dis. 1996;19:375–87. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1996.d01-92.x.
15. Urán PA, Gonçalves AA, Taverne-Thiele JJ, Schrama JW, Verreth JAJ, Rombout JHWM. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (Cyprinus carpio L.). Fish Shellfish Immunol. 2008;25:751–60. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.013.
16. Bakke-McKellep AM, McL Press C, Baeverfjord G, Krogdahl Å, Landsverk T. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, Salmo salar L., with soybean meal-induced enteritis. J Fish Dis. 2000;23:115–27. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00218.x.
17. Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (Sparus aurata). Aquaculture. 2005;249:387–400. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.031.
18. Kousoulaki K, Sether BS, Albrektsen S, Noble C. 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. 2015;21:129–51. https://doi.org/10.1111/anu.12233.
19. Hardy RW, Tacon AGJ. Fishmeal: historical uses, production trends and future outlook for supplies. Responsible Marine Aquaculture. Wallingford: CABI; 2002. pp. 311–325. doi:https://doi.org/10.1079/9780851996042.0311.
20. 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. https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106.
21. Hardy RW, Sealey WM, Gatlin DM. Fisheries By-Catch and By-Product Meals as Protein Sources For Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. J World Aquac Soc. 2005;3:393–400. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00343.x.
22. Hsu KC. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. Food Chem. 2010;122:42–8. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013.
23. Lee KJ, Powell MS, Barrows FT, Smiley S, Bechtel P, Hardy RW. Evaluation of supplemental fish bone meal made from Alaska seafood processing byproducts and dicalcium phosphate in plant protein based diets for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture. 2010;302:248–55. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.034.
24. Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food Chem Elsevier Ltd. 2012;135:3020–38. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100.
25. Se-Know K. Seafood processing by-products [internet]. Seafoods: chemistry, processing technology and quality. Springer US: Boston; 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9590-1.
26. Gildberg A. Enzymic processing of marine raw materials. Process Biochemistry. 1994:1–15. https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80030-8.
27. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein Hydrolysates: production, biochemical, and functional properties [internet]. Crit Rev Food Sci Nutr. 2000; https://doi.org/10.1080/10408690091189266.
28. Refstie S, Olli JJ, Standal H. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. Aquaculture. 2004;239:331–49. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015.

29. Cahu CL, Zambonino Infante JL, Quazuguel P, Le Gall MM. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass Dicentrarchus labrax larvae. Aquaculture. 1999;171:109–19. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00428-1.
30. Choi YJ, Hur S, Choi BD, Konno K, Park JW. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. J Food Sci. 2009;74 https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00988.x.
31. Gisbert E, Skalli A, Fernández I, Kotzamanis Y, Zambonino-Infante JL, Fabregat R. Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture. Elsevier B.V.; 2012;338–341: 96–104. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.007
32. Kotzamanis YP, Gisbert E, Gatesoupe FJ, Zambonino Infante J, Cahu C. 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. 2007;147:205–14. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.037.
33. Tang HG, Wu TX, Zhao ZY, Pan XD. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (Pseudosciaena crocea R.). J Zhejiang Univ Sci B. 2008;9:684–90. https://doi.org/10.1631/jzus.B0820088.
34. Espe M, Sveier H, Hogoy I, Lied E. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. Aquaculture. 1999:174, 119–37. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00502-X.
35. Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. J Sci Food Agric. 2000;80:581–9. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<581::AID-JSFA578>3.0.CO;2-I.
36. Plascencia-Jatomea M, Olvera-Novoa MA, Arredondo-Figueroa JL, Hall GM, Shirai K. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. J Sci Food Agric. John Wiley & Sons, Ltd.; 2002;82: 753–759. doi:https://doi.org/10.1002/jsfa.1092
37. Robert M, Zatylny-Gaudin C, Fournier V, Corre E, Le Corguillé G, Bernay B, et al. Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (L. vannamei). J Biotechnol. 2014;186:30–7. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.020.
38. Khosravi S, Rahimnejad S, Herault M, Fournier V, Lee C-R, Dio Bui HT, et al. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream Pagrus major. Fish Shellfish Immunol. 2015;45:858–68. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.039.
39. Khosravi S, Bui HTD, Herault M, Fournier V, Kim K-D, Lee B-J, et al. Supplementation of protein Hydrolysates to a low-fishmeal diet improves growth and health status of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J World Aquac Soc. 2017; https://doi.org/10.1111/jwas.12436.
40. Robert M, Zatylny-Gaudin C, Fournier V, Corre E, Le Corguillé G, Bernay B, et al. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (Oreochromis niloticus) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. Process Biochem. 2015;50:487–92. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.022.
41. Khosravi S, Bui HTD, Rahimnejad S, Herault M, Fournier V, Jeong JB, et al. Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (Paralichthys olivaceus) challenged with Edwardsiella tarda. Aquac Nutr. 2015;21:321–31. https://doi.org/10.1111/anu.12157.
42. Léauté J-P. Approche du regime alimentaire des juveniles de bars et de limandes en baie de Somme. Rev des Trav l'Institut des Pêches Marit. 1984;48:55–63.
43. Kaushik SJ. European sea bass, Dicentrarchus labrax. Nutr Requir Feed finfish Aquac. 2002:28–39. https://doi.org/10.1079/9780851995199.0028.
44. Hardy RW. Farmed fish diet requirements for the next decade and implication for global availability of nutrients. In: Lim C, Webster CW, Lee E CS, editors. Alternative protein sources in aquaculture diets. New York: TheHaworth press; 2008. p. 1–16.
45. Robert M. Développement d'hydrolysats pour l'alimentation des animaux d'aquaculture : caractérisation moléculaire et fonctionnelle. Université de Caen Basse-Normandie. 2014;
46. Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Gene expression profiling reveals functional specialization along the intestinal tract of a carnivorous teleostean fish (Dicentrarchus labrax). Front Physiol. 2016;7:1–17. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00359.
47. Gisbert E, Andree KB, Quintela JC, Calduch-Giner JA, Ipharraguerre IR, Pérez-Sánchez J. Olive oil bioactive compounds increase body weight, and improve gut health and integrity in gilthead sea bream (Sparus aurata). Br J Nutr. 2017;117:351–63. https://doi.org/10.1017/S0007114517000228.
48. Król E, Douglas A, Tocher DR, Crampton VO, Speakman JR, Secombes CJ, et al. Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. BMC Genomics. 2016;17:156. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2473-0.
49. Martin SAM, Dehler CE, Król E. Transcriptomic responses in the fish intestine. Dev Comp Immunol. 2016;64:103–17. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.014.
50. Zhang Y, Li Y, Liang X, Cao X, Huang L, Yan J, et al. Hepatic transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes response to dietary oxidized fish oil in loach Misgurnus anguillicaudatus. PLoS One. 2017;12:1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172386.
51. Wilson RP. Amino acids and protein. In: Hardy JH and R, editor. Fish nutrition, 3rd ed. San Diego: academic press; 2002. p. 143–79.
52. Pearse AGE. Carbohydrates and mucosubstances. Histochem Theor Appl. Analytical technology Churchill Livingstone. Edinburgh. 1985;2:675–753.
53. Escaffre A-M, Kaushik S, Mambrini M. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. Aquaculture. 2007;273:127–38. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.028.
54. Cornet V, Henry J, Corre E, Le Corguille G, Zanuttini B, Zatylny-Gaudin C. Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation. J Proteomics Elsevier BV. 2014;108:209–22. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.019.
55. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30:2114–20. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170.
56. Grabherr MG, Haas BJ, Levin MYJZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Bruce W, Friedman N, AR. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. Nat Biotechnol. 2013;29:644–52. https://doi.org/10.1038/nbt.1883.Trinity.
57. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10:R25. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25.
58. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011;12:323. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323.
59. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal annotation and visualization tool in functional genomics research. Application note. Bioinformatics. 2005;21:3674–6. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610.
60. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat Protoc. 2013;8:1494–512. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084.
61. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods. 2011;8:785–6. https://doi.org/10.1038/nmeth.1701.
62. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. J Mol Biol. 2001;305:567–80. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315.
63. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. Nucleic Acids Res. 2014; https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223.
64. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
65. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15:550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.
66. Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. Nucleic Acids Res. 2006;34 https://doi.org/10.1093/nar/gkl031.

67. Santigosa E, García-Meilán I, Valentin JM, Pérez-Sánchez J, Médale F, Kaushik S, et al. 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. 2011;317:146–54. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.026.
68. Estévez A, Treviño L, Kotzamanis Y, Karacostas I, Tort L, Gisbert E. Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (Argyrosomus regius) juveniles at low temperatures. Aquac Nutr. 2011;17 https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00798.x.
69. Ribeiro L, Moura J, Santos M, Colen R, Rodrigues V, Bandarra N, et al. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (Argyrosomus regius). Aquaculture. Elsevier BV. 2014;447:116–28. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.017.
70. De Santis C, Ruohonen K, Tocher DR, SAM M, Krol E, Secombes CJ, et al. Atlantic salmon (Salmo salar) parr as a model to predict the optimum inclusion of air classified faba bean protein concentrate in feeds for seawater salmon. Aquaculture. 2015;444:70–8. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.024.
71. Penn MH, Bendiksen EA, Campbell P, Krogdahl AS. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquaculture. 2011;310:267–73. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.040.
72. Krogdahl Å, Bakke-McKellep AM, Baeverfjord G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (Salmo solar L.). Aquac Nutr. 2003;9:361–71. https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00264.x.
73. Knudsen D, Jutfelt F, Sundh H, Sundell K, Koppe W, Frøkiær H. 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. 2008;100:120–9. https://doi.org/10.1017/S0007114507886338.
74. Zhang JX, Guo LY, Feng L, Jiang WD, Kuang SY, Liu Y, et al. Soybean β-Conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish. PLoS One. 2013;8:1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058115.
75. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. Am J Clin Nutr. 1992;55:299S–308S.
76. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat Rev Microbiol Nature Publishing Group. 2011;9:265–78. https://doi.org/10.1038/nrmicro2538.
77. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson M a, Wyss M, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. Nat Commun 2015;6: 8292. doi:https://doi.org/10.1038/ncomms9292.
78. Heikkinen J, Vielma J, Kemiläinen O, Tiirola M, Eskelinen P, Kiuru T, et al. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture. 2006;261:259–68. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.012.
79. Bakke-McKellep AM, Penn MH, Salas PM, Refstie S, Sperstad S, Landsverk T, et al. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (Salmo salar L.). Br J Nutr. 2007;97:699–713. https://doi.org/10.1017/S0007114507381397.
80. Krogdahl Å, Bakke-McKellep a M, Røed KH, Baeverfjord G. Feeding Atlantic salmon Salmo salar L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. Aquac Nutr. 2000;6:77–84. https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00129.x.
81. Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev Comp Immunol. 2001;25:827–39. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6.
82. Talaei Zanjani N, Miranda-saksena M, Valtchev P, Diefenbach RJ, Hueston L, Diefenbach E, et al. Abalone Hemocyanin blocks the entry of herpes simplex virus 1 into Cells : a potential new antiviral strategy. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:1003–12. https://doi.org/10.1128/AAC.01738-15. Address.
83. Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, Del Campo M, Tampe R, Zhong TY, et al. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet Fissurella latimarginata promotes potent anti-tumor activity in melanoma. PLoS One. 2014;9 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087240.
84. Moltedo B, Faunes F, Haussmann D, De Ioannes P, De Ioannes AE, Puente J, et al. Immunotherapeutic effect of Concholepas Hemocyanin in the murine bladder Cancer model: evidence for conserved antitumor properties among Hemocyanins. J Urol. 2006;176:2690–5. https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.07.136.
85. Coates CJ, Decker H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. Cell Mol Life Sci Springer. 2017;74:293–317. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2326-7.
86. Kim SK, Mendis E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - a review. Food Res Int. 2006:383–93. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010.
87. Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, Herault M, Lee KJ. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (Pagrus major) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture. 2014;418–419:11–6. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.046.
88. Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, et al. Interferon-γ regulates intestinal epithelial homeostasis through converging β-catenin signaling pathways. Immunity. 2011;32:392–402. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.001.Interferon-.
89. Bjørndal B, Berge C, Ramsvik MS, Svardal A, Bohov P, Skorve J, et al. A fish protein hydrolysate alters fatty acid composition in liver and adipose tissue and increases plasma carnitine levels in a mouse model of chronic inflammation. Lipids Health Dis. 2013;12:143. https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-143.
90. Liaset B, Madsen L, Hao Q, Criales G, Mellgren G, Marschall HU, et al. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids Elsevier BV. 2009;1791:254–62. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.016.
91. Vigerust NF, Cacabelos D, Burri L, Berge K, Wergedahl H, Christensen B, et al. Fish oil and 3-thia fatty acid have additive effects on lipid metabolism but antagonistic effects on oxidative damage when fed to rats for 50 weeks. J Nutr Biochem BioMed Central. 2012;23:1384–93. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.08.006.
92. Varki A, Freeze HH, Gagneux P. Evolution of Glycan Diversity. Essentials Glycobiol. 2009:281–689. NBK1942 [bookaccession]

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

3.2 Impact des hydrolysats de protéines sur la régulation transcriptomique du foie chez le bar

Les analyses d'expression différentielle réalisées à partir du transcriptome du foie et présentées dans ce chapitre donneront lieu à une soumission dans une revue à comité de lecture de rang A. Les échantillons de foie analysés lors de ces travaux sont issus de l'essai conduit chez le bar européen dans les structures d'élevage de l'IRTA (Espagne). Les résultats zootechniques déjà présentés et discutés précédemment ne seront pas mentionnés dans ce chapitre, qui se concentrera sur l'analyse de la réponse transcriptomique du foie chez le bar nourri avec différents régimes alimentaires incorporant deux niveaux de FP et 3 hydrolysats de protéines différents.

Nous avons mené une analyse transcriptomique du foie des poissons ayant été nourris avec des aliments pauvres en FP (FM5, témoin négatif) supplémentés avec 5% d'hydrolysats de protéines de différentes origines (tilapia, crevette et un mélange des 2 produits) et comparé leur performance à un régime contenant 20% de FP (FM20, témoin positif). Les 2 régimes témoins (FM5 et FM20) ont par ailleurs été comparés deux à deux.

Dans un premier temps, la comparaison des témoins positifs (FM20) et négatifs (FM5) permet de mettre en évidence les variations induites par la diminution de la teneur en farine de poisson dans l'aliment. Dans un deuxième temps, la comparaison des régimes contenant des hydrolysats avec le témoin négatif permet d'étudier l'impact de l'adjonction des hydrolysats et donc la capacité de ces derniers à compenser une carence en FP. Enfin, l'analyse différentielle des régimes contenant des hydrolysats par rapport au régime riche en farine de poisson permet de comparer la performance des hydrolysats avec un aliment « référence », c'est-à-dire de confronter FP et hydrolysats.

Concernant l'analyse bioinformatique des données, plusieurs filtrages ont été réalisés à postériori de l'analyse différentielle, seuls les transcrits représentants plus de 1% des isoformes et dont les valeurs d'expression sont supérieures à 1 FPKM ont été pris en compte. De plus, nous avons défini comme seuil de régulation un facteur de variation supérieur à 2 et une p_adj inférieure à 0,1.

3.2.1 Séquençage des échantillons

Le séquençage des échantillons de foie a été réalisé à la plateforme Sésame du centre de lutte contre le cancer François Baclesse sur un séquenceur NextSeq 550 Illumina. Le transcriptome *de novo* du foie a été réalisé à partir de 36 échantillons (6 régimes alimentaires x 2 statuts sanitaires (poissons infectés ou non) x 3 réplicats) et se compose de 20 870 transcrits.

3.2.2 Résultats

Étude quantitative du nombre de gènes différentiellement exprimés.

Les nombres de transcrits DE totaux et annotés avec BlastX sont de 7 568 et 3 077 respectivement. L'analyse du nombre de transcrits DE donne une première indication sur la proximité ou la divergence des profils d'expression des gènes entre les groupes de poissons nourris sur différents régimes alimentaires.

Le **Tableau 23** présente le nombre de transcrits DE. Nous avons comparé les résultats de l'expression différentielle obtenus avec le transcriptome *de novo* mais également à partir du génome de référence du bar européen. La première ligne correspond donc, avec les mêmes conditions de filtrage, au nombre de transcrits DE observés en utilisant le transcriptome extrait du génome de référence. La deuxième ligne correspond au nombre de transcrits DE obtenus à partir du transcriptome *de novo* et possédant une annotation BlastX. On constate que le nombre de transcrits DE identifiés est beaucoup plus faible en utilisant le transcriptome extrait du génome de référence. C'est pourquoi, la suite de l'exploitation des résultats de l'expression différentielle a été réalisée uniquement à partir du transcriptome *de novo*.

Tableau 23 – Nombre de transcrits différentiellement exprimés dans le foie renvoyant une annotation BlastX. Filtrage : |FC| >2 ; p_adj <0,1 ; FPKM >1 ; isoforme > 1%. Abréviations : DE : différentiellement exprimé, FM5 et FM20 : 5% et 20% de farine de poisson, TH : hydrolysat de tilapia, SH : hydrolysat de crevette, MH : mélange d'hydrolysats.

	FM5	FM20	TH	SH	MH
Gènes DE par rapport à FM5 (génome)	-	199	49	25	328
Gènes DE par rapport à FM5 (*de novo*)	-	1054	91	206	1352
Gènes DE par rapport à FM20 (*de novo*)	1054	-	1017	2315	19

La diminution de la teneur de FP (FM5 vs FM20) induit l'expression différentielle de 1054 transcrits. Ce nombre est du même ordre de grandeur que celui observé avec le mélange d'hydrolysats (1352 transcrits). Seulement 19 transcrits sont DE entre le régime incorporant le mélange d'hydrolysats et le régime riche en FP témoignant des profils d'expression très proches chez les poissons ayant été nourris avec ces deux régimes alimentaires.

En revanche, les poissons ayant été nourris avec l'hydrolysat de tilapia ou de crevette conservent des profils d'expressions plus proches de ceux ayant été nourris avec le régime appauvri. En effet, le nombre de transcrits DE est plus faible lors de la comparaison avec FM5 qu'avec FM20 avec 91 transcrits contre 1017 pour l'hydrolysat de tilapia et 206 contre 2315 pour l'hydrolysat de crevette.

Cette première information montre que deux groupes se détachent en termes de profils d'expression transcriptomique. Un premier groupe contenant le régime appauvri (FM5) et les régimes contenant l'hydrolysat de tilapia (TH) et de crevette (SH). Le deuxième groupe comprend le régime riche en farine de poisson (FM20) et le mélange d'hydrolysats (MH).

La **figure 40** présente le nombre d'occurrences des identifications BlastX pour les transcrits DE lors des comparaisons de l'ensemble des régimes avec le régime appauvri (FM5) et riche en farine de poisson (FM20). La majorité des annotations ne sont retrouvées que pour 1 ou 2 transcrits témoignant d'un faible nombre d'isoformes au sein des transcrits DE. Certaines annotations ont été retrouvées dans de nombreux transcrits DE, c'est le cas notamment du complément C3 qui est retrouvé 81 et 218 fois lors des comparaisons entre FM5 et FM20 respectivement. Le complement component C9 est également retrouvé 20 et 28 fois dans les transcrits DE.

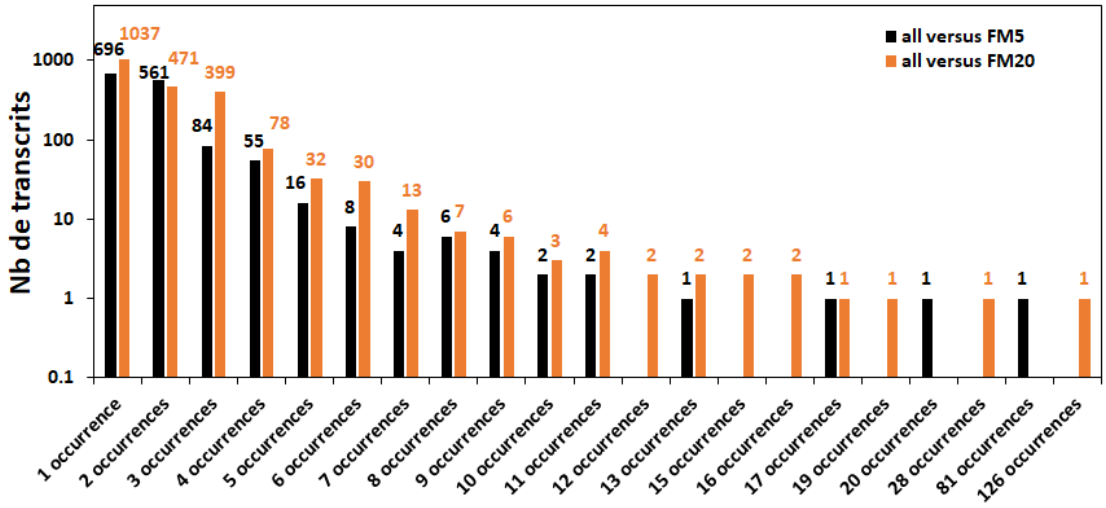


FIGURE 40 – Nombre d'occurrence des annotations BlastX des transcrits différentiellement exprimés lors des comparaisons de l'ensemble des régimes avec les régimes appauvri (FM5) et riche (FM20) en farine de poisson.

Les séquences des transcrits ont été identifiées par comparaison avec les différentes bases de données [1] et la **Figure 41** présente la répartition des gènes DE lors de la supplémentation du régime appauvri FM5 avec 15% de farine de poisson (FM20) ou 5% des différents hydrolysats (FH, SH et MH). Il s'agit d'une analyse sur l'annotation BlastX des transcrits. Aussi, les doublons (isoformes) ont été supprimés. Les valeurs numériques correspondent donc au nombre de gènes uniques DE. Cette figure témoigne en quelque sorte de la capacité des différentes adjonctions (+15% de farine ou +5% d'hydrolysat) à moduler l'expression des gènes du foie.

1. Cf Annotation des transcrits page 118

Seuls quelques gènes DE sont communs aux différents régimes alimentaires. Quatorze gènes sont mêmes communs à tous les régimes alimentaires. Il s'agit de gènes codant pour Alpha-1-antitrypsin homolog, Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, Fibrinogen beta chain, Fibrinogen gamma chain, Hemopexin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B, Period circadian protein homolog 2, Phenylalanine-4-hydroxylase, Pleckstrin homology domain-containing family F member 1, Serum amyloid A-1 protein, Translocation protein SEC62, Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 et Vitamin D 25-hydroxylase.

Une proportion importante des gènes DE sont spécifiques au régime alimentaire testé : 24,1% (214/887) pour le régime riche en farine de poisson, 32% (24/75) pour l'hydrolysat de tilapia, 32,3% (53/164) pour l'hydrolysat de crevette et 38,9% (436/1120) pour le mélange d'hydrolysats.

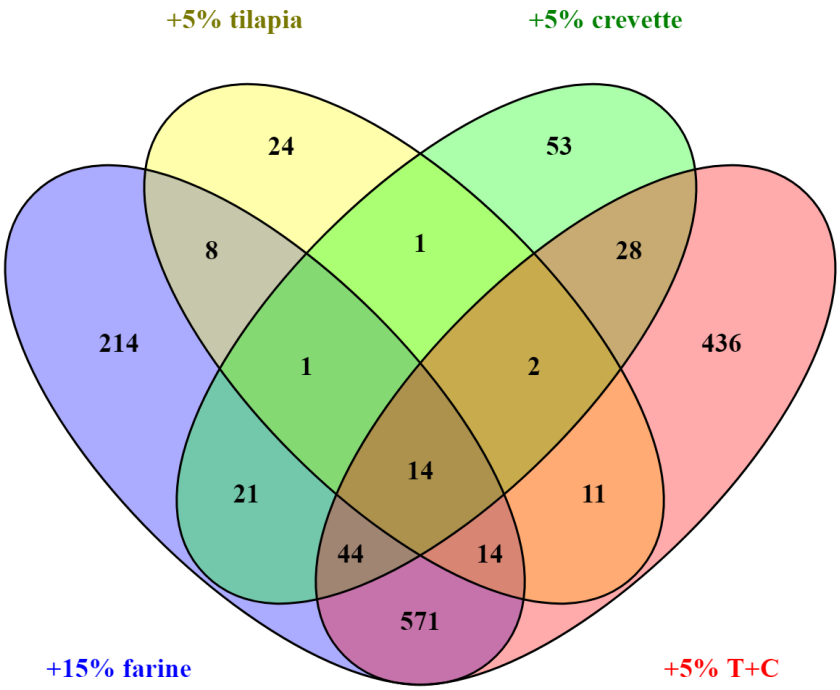


FIGURE 41 – Répartition des transcrits différentiellement exprimés par rapport au régime pauvre en farine de poisson. Effets de l'ajout de 15% farine de poisson ou de 5% des différents hydrolysats dans les aliments. Les chiffres correspondent à des gènes ayant une annotation BlastX unique.

La **Figure 42** présente la répartition des gènes DE entre le régime riche en FP (FM20) et les régimes contenant le mélange d'hydrolysats. Les résultats montrent que 838, 1853 et 19 gènes sont DE entre les régimes contenant l'hydrolysat de tilapia, de crevette et le mélange respectivement, et le régime témoin riche en FP (FM20). Sept gènes DE sont communs aux trois régimes alimentaires contenant les hydrolysats. Il s'agit de gènes codants pour 40S ribosomal protein S29, Coagulation factor X, Complement C3, Fibrinogen beta chain, Fibrinogen gamma chain, Phenylalanine-4-hydroxylase et Ubiquitin-60S ribosomal protein L40. Le grand nombre de gènes DE entre FM20 et les régimes contenant l'hydrolysat de tilapia et de crevette témoigne d'une divergence dans les profils d'expression. En revanche, le très faible nombre de gènes DE entre FM20 et le mélange d'hydrolysats montre que les deux régimes alimentaires modulent l'expression des gènes du foie de manière similaire.

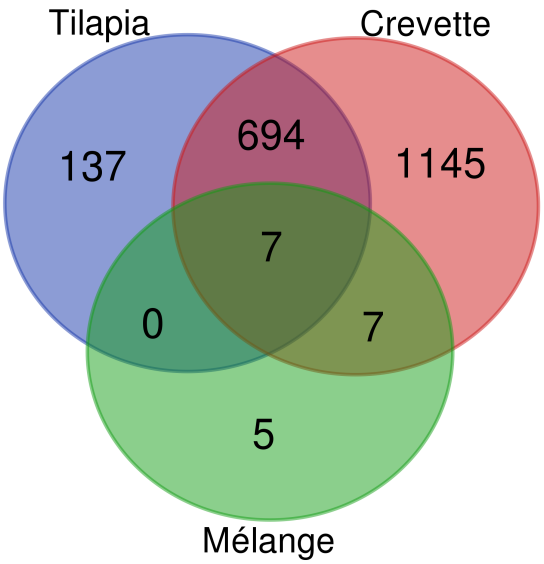


FIGURE 42 – Répartition des gènes différentiellement exprimés lors de la comparaison des hydrolysats avec le régime riche en farine de poisson. Les chiffres correspondent à des gènes ayant une annotation BlastX unique.

De prime abord, le régime riche en FP et celui contenant le mélange d'hydrolysats semblent avoir des profils d'expression très similaires si l'on ne considère que le nombre de gènes différentiellement exprimés [2]. Néanmoins, la **Figure 43** met en évidence que 27,5% (244/887) des gènes DE sont spécifiques au régime alimentaire riche en FP et 42,6% (477/1120) au mélange d'hydrolysats lorsqu'on les compare au

2. Cf **Tableau 23** page 211.

régime apprauvri (FM5).

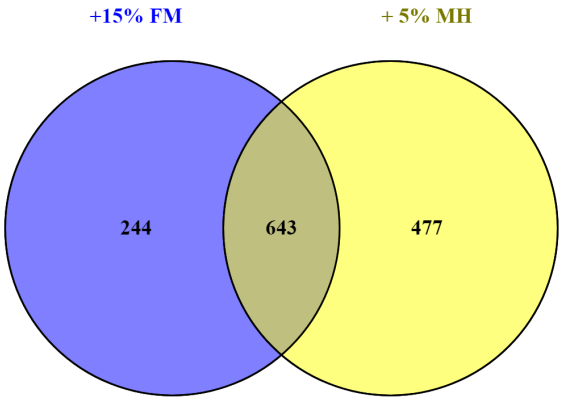


FIGURE 43 – Répartition des gènes différentiellement exprimés lors de l'ajout de 15% farine de poisson ou de 5% du mélange d'hydrolysats. Les chiffres correspondent à des gènes ayant une annotation BlastX unique. FM : farine de poisson, MH : mélange d'hydrolysats.

Ces résultats sur la répartition des gènes DE permettent de mettre en évidence la spécificité des profils d'expression du foie des poissons ayant été nourris avec les différents régimes alimentaires.

Analyse des annotations GO

Une analyse d'enrichissement en annotations GO (composant cellulaire, fonction moléculaire et fonction biologique) a été réalisée à partir de l'annotation fonctionnelle des transcrits. Les résultats sont présentés en fonction de la représentativité des transcrits DE pour chaque annotation GO. Cette dernière information est intéressante car elle permet de déterminer quelle est la part des transcrits DE par rapport à l'ensemble des transcrits possédant la même annotation GO.

Effet de la teneur en farine de poisson dans l'aliment. L'analyse d'enrichissement des transcrits DE entre les poissons ayant été nourris avec les régimes FM5 et FM20 montre qu'au niveau de l'annotation GO il y a majoritairement une augmentation des transcripts DE associés aux membranes cellulaires, aux peptidases et à l'immunité (**Figure 44**).

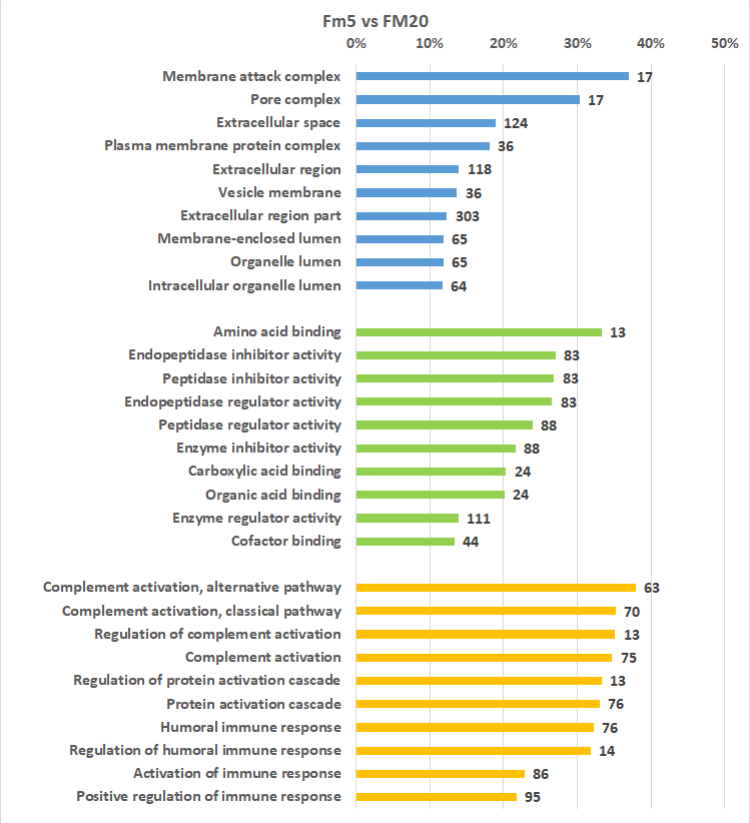


FIGURE 44 – Enrichissement en annotations GO, effet de la part de farine de poisson dans l'aliment. Liste des 10 principaux enrichissements en GO terms observés entre les transcrits DE des poissons ayant été nourris avec les régimes appauvri (FM5) et riche (FM20) en farine de poisson. Les barres bleues correspondent aux composants cellulaires, les barres vertes aux fonctions moléculaires et les barres oranges aux processus biologiques. L'échelle correspond à la représentativité des annotations GO. Il s'agit du ratio du nombre d'annotations GO des transcrits DE sur le nombre total de transcrits possédant la même annotation GO dans l'ensemble du transcriptome. Le chiffre associé à la représentativité correspond au nombre de transcrits participants à l'enrichissement. P_value <0,001.

Effet de l'ajout d'hydrolysat de tilapia dans le régime appauvri en farine de poisson. Le faible nombre de gènes DE entre le régime appauvri en FP et l'hydrolysat de tilapia n'a pas permis de mener d'analyse d'enrichissements en annotations GO.

Effet de l'ajout d'hydrolysat de crevette dans le régime appauvri en farine de poisson Malgré le faible nombre de transcrits DE entre le régime appauvri en FP (FM5) et celui contenant de l'hydrolysat de crevette (SH), une analyse d'enrichissement en annotations GO a pu être réalisée. L'analyse d'enrichissement montre des similitudes avec la comparaison des témoins positif et négatif (**Figure 45**). En effet, les gènes DE liés aux peptidases sont également enrichis. En revanche, les enrichissements en annotations GO des composants cellulaires et des processus biologiques sont différents. Par exemple, nous n'avons pas observé d'enrichissement de gènes liés à l'immunité pour le régime contenant l'hydrolysat de crevette.

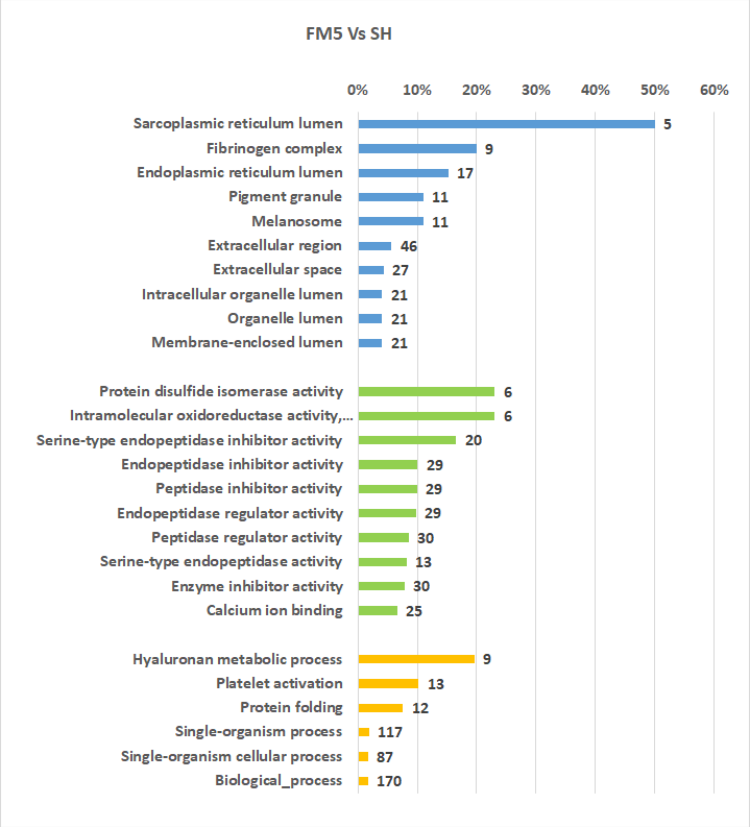


FIGURE 45 – Enrichissement en annotations GO, effet de l'hydrolysat de crevette dans l'aliment. Liste des 10 principaux enrichissements en annotations GO observés entre les transcrits DE des poissons ayant été nourris avec le régime appauvri (FM5) et celui contenant l'hydrolysat de crevette (SH). Les barres bleues correspondent aux composants cellulaires, les barres vertes aux fonctions moléculaires et les barres oranges aux processus biologiques. L'échelle correspond à la représentativité des annotations GO. Il s'agit du ratio du nombre d'annotations GO des transcrits DE sur le nombre total de transcrits possédant la même annotation GO dans l'ensemble du transcriptome. Le chiffre associé à la représentativité correspond au nombre de transcrits participants à l'enrichissement. P_value <0,001.

Effet de l'ajout du mélange d'hydrolysats de protéines dans le régime appauvri en farine de poisson. L'analyse de l'enrichissement des annotations GO des transcrits DE entre le régime appauvri en FP (FM5) et celui contenant le mélange d'hydrolysats (MH) présente des similitudes avec l'analyse du régime riche en FP (**Figure 46**). En effet, les gènes DE associés aux peptidases (fonction moléculaire) et à l'immunité (processus biologique) sont également enrichis. En revanche, seule l'annotation correspondant au composant cellulaire « Extracellular space » est enrichie.

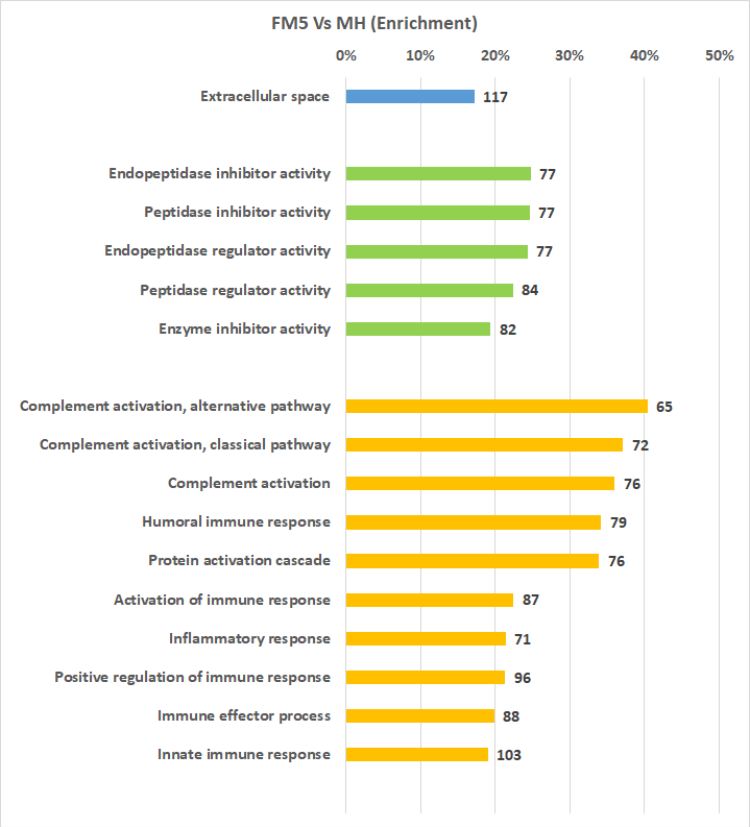
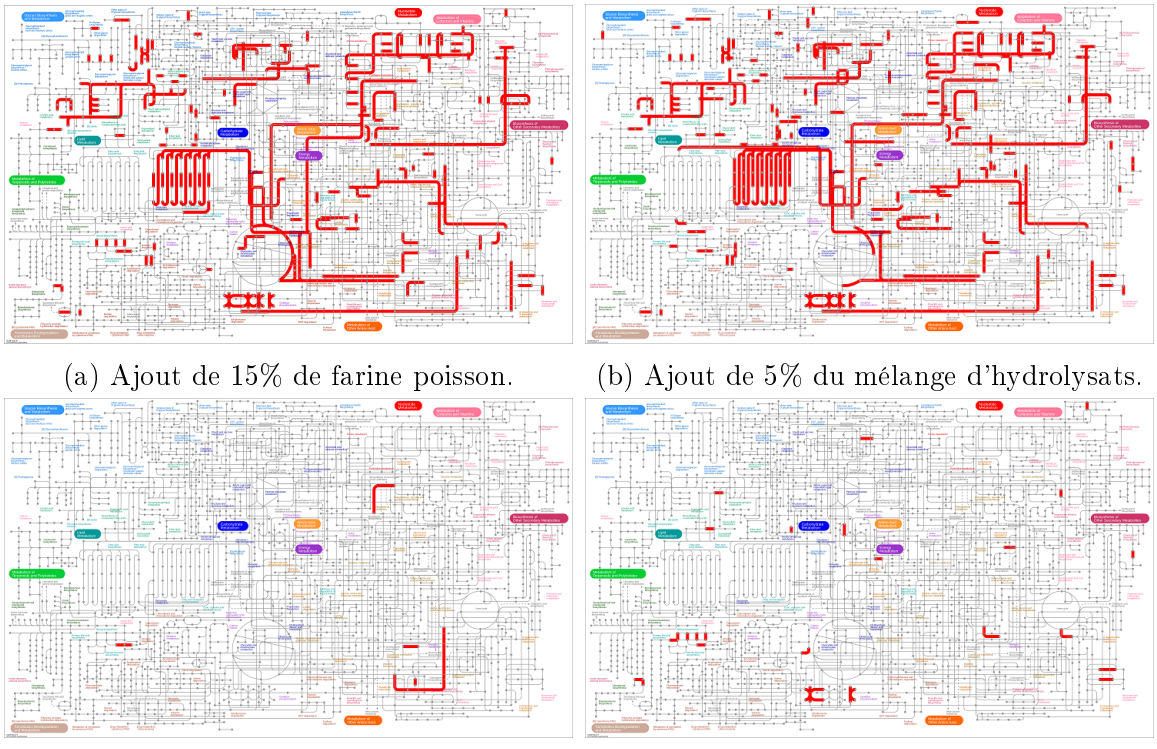


FIGURE 46 – Enrichissement en annotations GO, effet du mélange d'hydrolysats. Liste des 10 principaux enrichissements en annotations GO observés entre les transcrits DE des poissons ayant été nourris avec le régime appauvri (FM5) et celui contenant le mélange d'hydrolysats (MH). Les barres bleues correspondent aux composants cellulaires, les barres vertes aux fonctions moléculaires et les barres oranges aux processus biologiques. L'échelle correspond à la représentativité des annotations GO. Il s'agit du ratio du nombre d'annotations GO des transcrits DE sur le nombre total de transcrits possédant la même annotation GO dans l'ensemble du transcriptome. Le chiffre associé à la représentativité correspond au nombre de transcrits participants à l'enrichissement. $P_value < 10^{-7}$.

L'analyse des enrichissements en annotations GO est très informative. Elle nous permet de mettre en évidence que les gènes liés au métabolisme protéique et à l'immunité sont particulièrement régulés par les différents régimes alimentaires. C'est pourquoi, la suite de l'analyse du transcriptome du hépatique s'est focalisée sur l'analyse des voies métaboliques ainsi que sur les voies de signalisation liées à l'immunité.

Impact des hydrolysats de protéines sur le métabolisme hépatique

Pour l'analyse de la modulation des voies métaboliques par les hydrolysats de protéines, nous avons utilisé les annotations KEGG. La **Figure 47** présente de manière schématique les voies métaboliques hépatiques régulées par l'ajout dans l'aliment de 15% de farine de poisson (FM20) ou 5% d'hydrolysat (TH, SH ou MH) en comparaison au régime pauvre en FP (FM5).



(a) Ajout de 15% de farine poisson.

(b) Ajout de 5% du mélange d'hydrolysats.

(c) Ajout de 5% d'hydrolysat de tilapia.

(d) Ajout de 5% d'hydrolysat de crevette.

FIGURE 47 – Régulation des voies métaboliques hépatiques. Analyse des annotations KEGG. Les voies métaboliques correspondantes aux gènes régulés par l'ajout de farine de poisson ou d'hydrolysat sont représentées en rouge.

De nombreuses voies métaboliques sont modulées par l'ajout de 15% de farine de poisson (**Figure 47a)** et l'ajout de 5% du mélange d'hydrolysats (**Figure 47b**).

En revanche, l'ajout d'hydrolysat de tilapia seul (**Figure 47c**) ou de crevette seul (**Figure 47d**) ne modifie pas l'expression des gènes du métabolisme hépatique. Nous avons également comparé les trois régimes alimentaires contenant des hydrolysats avec le régime témoin positif (FM20). Les résultats ne sont pas présentés car ils n'apportent pas de nouvelles informations. En bref, il n'y a pas de voies métaboliques régulées entre le témoin positif et le mélange d'hydrolysats et seuls trois transcrits annotés codant pour la phenylalanine-4-hydroxylase, la myo-inositol-1-phosphate synthase et l'acétyl-CoA carboxylase / biotine carboxylase 1 sont DE. En revanche, le profil d'expression des gènes des voies métaboliques hépatiques des poissons ayant été nourris avec les régimes alimentaires contenant l'hydrolysat de crevette ou de tilapia seuls est très éloigné de celui du témoin positif.

Les voies métaboliques hépatiques majoritairement impactées par les régimes alimentaires en comparaison au régime appauvri en FP (FM5) sont présentées **Table 24**. Quatre-vingt cinq gènes liés au métabolisme hépatique sont DE entre le régime appauvri en FP (FM5) et le régime riche en FP (FM20). Ce nombre est de 5, 16 et 107 pour les régimes alimentaires incorporant les hydrolysats de tilapia, de crevette et le mélange d'hydrolysats, respectivement. Nous avons observé une grande similitude dans le profil d'expression des gènes des voies métaboliques des poissons nourris avec les régimes riche en FP (FM20) et le mélange d'hydrolysats. En effet, ces derniers régulent tous les deux le métabolisme lipidique, protéique et glucidique. Concernant les régimes supplémentés en hydrolysats de crevette et de tilapia, le faible nombre de transcrits DE par voie métabolique rend l'interprétation des résultats difficile.

Tableau 24 – Les 20 voies métaboliques hépatiques les plus modulées par les différents régimes alimentaires. Les listes sont basées sur l'annotation KEGG des transcrits DE entre le contrôle négatif FM5 et les autres régimes alimentaires. Le chiffre correspond au nombre de gènes différentiellement exprimés.

20% de farine de poisson	**Hydrolysat de tilapia**	**Hydrolysat de crevette**	**Mélange d'hydrolysats**
Metabolic pathways (85)	Metabolic pathways (5)	Metabolic pathways (16)	Metabolic pathways (107)
Biosynthesis of secondary metabolites (34)	Biosynthesis of secondary metabolites (1)	Biosynthesis of secondary metabolites (6)	Biosynthesis of secondary metabolites (34)
Microbial metabolism in diverse environments (17)	Alanine, aspartate and glutamate metabolism (1)	Cholesterol metabolism (2)	Microbial metabolism in diverse environments (20)
Carbon metabolism (12)	Nitrogen metabolism (1)	Riboflavin metabolism (2)	Carbon metabolism (15)
Choline metabolism in cancer (9)	Central carbon metabolism in cancer (1)	Glycine, serine and threonine metabolism (1)	Purine metabolism (12)
Purine metabolism (8)	Phenylalanine metabolism (1)	Thiamine metabolism (1)	Choline metabolism in cancer (11)
Glycine, serine and threonine metabolism (7)	Cysteine and methionine metabolism (1)	Cysteine and methionine metabolism (1)	Glycerophospholipid metabolism (9)
Cholesterol metabolism (7)	D-Glutamine and D-glutamate metabolism (1)	Drug metabolism - cytochrome P450 (1)	Glycine, serine and threonine metabolism (8)
Pyruvate metabolism (6)		Nicotinate and nicotinamide metabolism (1)	Cholesterol metabolism (8)
Glycerolipid metabolism (6)		Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (1)	Pyruvate metabolism (7)
Glycerophospholipid metabolism (6)		Microbial metabolism in diverse environments (1)	Inositol phosphate metabolism (6)
Arginine and proline metabolism (6)		Retinol metabolism (1)	Tryptophan metabolism (6)
Alanine, aspartate and glutamate metabolism (6)		Ascorbate and aldarate metabolism (1)	Pyrimidine metabolism (6)
beta-Alanine metabolism (5)		Carbon metabolism (1)	beta-Alanine metabolism (6)
Fatty acid metabolism (5)		Phosphonate and phosphinate metabolism (1)	Drug metabolism - other enzymes (6)
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (5)		Glutathione metabolism (1)	Alanine, aspartate and glutamate metabolism (5)
Starch and sucrose metabolism (4)		Sphingolipid metabolism (1)	Fatty acid metabolism (5)
Cysteine and methionine metabolism (4)		Porphyrin and chlorophyll metabolism (1)	Starch and sucrose metabolism (5)
Tryptophan metabolism (4)		Arginine and proline metabolism (1)	Propanoate metabolism (5)
Propanoate metabolism (3)		Tryptophan metabolism (1)	Ascorbate and aldarate metabolism (4)

Modulation des biomarqueurs de l'immunité par les hydrolysats de protéines

Une analyse des données transcriptomiques avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis a été réalisée sur les transcrits DE (**Tableau 25**). Ce logiciel permet de mettre en évidence puis de quantifier l'activation et l'inhibition des voies métaboliques au moyen des facteurs de variation des transcrits DE, de leur annotation Ensembl correspondante et d'une base de donnée bibliographique interne à Qiagen.

Tableau 25 – **Liste des 10 principales voies de signalisation modulées par les régimes alimentaires.** Les transcrits différentiellement exprimés annotés ont été analysés avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis. Une valeur de z-score positif témoigne d'une activation et une valeur négative d'une inhibition de la voie métabolique. Abréviations : FM5 : 5% de farine de poisson. FM20 : 20% de farine de poisson. SH : hydrolysat de crevette, MH : mélange d'hydrolysats.

FM5 vs FM20	z-score	-log(p-value)	Ratio
Signaling by Rho Family GTPases	4.243	3.81	9.3%
Ephrin Receptor Signaling	3.9	5.77	12.6%
fMLP Signaling in Neutrophils	3.742	3.95	12.2%
CREB Signaling in Neurons	3.606	2.52	8.7%
IL-8 Signaling	3.606	1.58	7.1%
IL-3 Signaling	3.464	3.98	14.5%
HGF Signaling	3.464	3.18	11.3%
Leukocyte Extravasation Signaling	3.357	1.66	7.1%
NGF Signaling	3.317	2.08	9.2%
Thrombin Signaling	3.317	1.47	6.9%
RhoGDI Signaling	-2.714	2.82	9.3%
PTEN Signaling	-2.309	3.04	10.9%
Role of p14/p19ARF in Tumor Suppression	-2	1.57	11.6%
FM5 vs SH			
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	-2.449	6.37	14.3%
LXR/RXR Activation	-2.121	6.77	7.4%
FM5 vs MH			
Ephrin Receptor Signaling	4.899	6.78	15.5%
Signaling by Rho Family GTPases	4.899	4.27	11.3%
IL-8 Signaling	4.69	4.73	12.7%
Actin Cytoskeleton Signaling	4.315	4.54	11.9%
Tec Kinase Signaling	4	3.46	11.8%
fMLP Signaling in Neutrophils	4	3.36	13.0%
ILK Signaling	3.9	3.06	10.7%
Integrin Signaling	3.78	5.28	12.8%
Rac Signaling	3.742	3.12	12.8%
Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3.638	5.48	18.3%
RhoGDI Signaling	-3.9	5.22	13.9%
EIF2 Signaling	-2.959	18.20	22.2%
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	-2.53	2.76	10.0%
PTEN Signaling	-2.183	4.04	14.3%

Les voies de signalisation ne sont pas modulées entre les poissons nourris avec FM5 et ceux nourris avec l'hydrolysat de tilapia.

Une inhibition des voies Intrinsic Prothrombin Activation Pathway et LXR/RXR Activation a été observée pour les poissons ayant été nourris avec l'hydrolysat de crevette. De plus, deux autres voies de signalisation sont modulées mais ne passent pas le filtrage du z-score $> |2|$. Il s'agit des voies suivants : Coagulation System et Acute Phase Response Signaling avec des z-scores de : -1,414 et -1,134 respectivement.

La diminution de la part de FP (FM5 vs FM20) entraine un grand nombre de régulations des voies de signalisation. En effet, 114 sont activées et seulement 3 sont inhibées.

La même tendance est observée pour la comparaison entre le régime appauvri en FP et le mélange d'hydrolysats (FM5 vs MH). Cent-vingt-et-une voies de signalisation sont activées et seulement 4 sont inhibées. Il est intéressant de noter qu'en comparaison au régime FM5, 98 voies sont communes entre les régimes FM20 et MH, tandis que 19 et 27 voies sont spécifiques des régimes FM20 et MH respectivement.

Parmi les voies de signalisation communes activées, on retrouve de nombreuses voies participant à l'immunité telles que IL-8 Signaling, ILK Signaling, Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes, IL-6 Signaling, RhoA Signaling, Chemokine Signaling, FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells, IL-3 Signaling, NF-κB Activation by Viruses, ERK/MAPK Signaling, Acute Myeloid Leukemia Signaling, Acute Phase Response Signaling, Th1 Pathway, Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses, Dendritic Cell Maturation, IGF-1 Signaling, Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages, NF-κB Signaling, IL-22 Signaling, IL-9 Signaling, Prolactin Signaling, IL-1 Signaling, Role of NFAT in Regulation of the Immune Response, LPS-stimulated MAPK Signaling et iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells.

Discussion

Ces travaux s'inscrivent dans un projet visant à déterminer l'impact de la réduction en FP et de l'incorporation d'hydrolysats de protéines sur la croissance et la réponse des transcriptomes intestinal, hépatique et rénal chez le bar européen. Pour rappel, lors de l'essai nutritionnel, nous avons démontré que l'ajout d'hydro-

lysat dans le régime appauvri en FP (FM5) a permis d'atteindre des performances de croissance et de survie du même niveau que témoin positif riche en FP (FM20) [Leduc *et al.*, 2018]. Il est important de considérer ces résultats zootechniques pour l'interprétation des résultats des régulations transcriptomiques hépatiques.

Impact de la teneur en farine de poisson de l'aliment sur la réponse du transcriptome hépatique. La diminution de la teneur en FP entraine une forte modulation des niveaux d'expression des gènes du foie. En effet, plus de milles gènes (**Tableau 23** page 211), pour la plupart différents au regard du faible nombre d'isoformes (**Figure 40** page 212), sont régulés. Nous avons observé en particulier que les voies métaboliques nutritionnelles sont fortement modulées (**Figure 47** page 219) que ce soient les voies du métabolisme des lipides, des protéines, des carbohydrates ou associé aux bases nucléiques (**Tableau 24** page 221). Cette modification du métabolisme pourrait se traduire par des perturbations importantes dans les apports cellulaires en nutriments et pourrait expliquer les différences de performances zootechniques observées lors de l'essai nutritionnel mais également par d'autres auteurs [Francis *et al.*, 2001, Santigosa *et al.*, 2011b, Estévez *et al.*, 2011, Ribeiro *et al.*, 2014].

L'annotation fonctionnelle a également confirmé que l'immunité est au cœur des régulations hépatiques. Le foie est un organe central dans la réponse immunitaire chez les poissons car il joue un rôle majeur dans le maintien l'homéostasie mais également lors des infections [Wu *et al.*, 2016]. Lors de nos analyses, nous avons observé une très forte proportion de gènes régulés, liés à l'immunité et en particulier au système du complément. L'analyse avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis nous a permis de mettre en évidence que de très nombreuses voies de signalisation était activées (**Tableau 25** page 222). L'appauvrissement de la teneur en FP impacte négativement la capacité de défense des poissons en réprimant les effecteurs comme le complément mais également les cytokines et chimiokines responsables de la migration et/ou de l'activation des cellules de l'immunité. Ces résultats sont intéressants car ils mettent en évidence le lien direct entre la teneur en FP de l'aliment et la santé des poissons et confirment les observations de Geay et al. (2011) sur la modulation des gènes de l'immunité chez le bar lors d'un remplacement partiel de FP dans les aliments.

Impact de l'origine des hydrolysats de protéines sur la réponse du transcriptome hépatique

Performances de l'hydrolysat de tilapia. L'ajout de 5% d'hydrolysat de tilapia dans le régime pauvre en FP (FM5) entraine la régulation d'un faible nombre de gènes. Par conséquent, les analyses d'enrichissement en annotations GO et d'activation ou inhibition des voies de signalisation n'ont pas pu être menées. En effet, l'ajout d'hydrolysat de tilapia dans FM5 ne module pas profondément, comme cela avait pu être observé dans l'intestin, le transcriptome hépatique qui reste très éloigné de celui des poissons ayant été nourris avec un régime riche en farine de poisson.

L'absence d'activation des effecteurs de l'immunité pourrait être due à une immuno-stimulation moins importante de part l'origine et la composition de l'hydrolysat de tilapia. En effet, cet hydrolysat est élaboré à partir de co-produits de tilapia. Les peptides hydrolytiques qui le composent proviennent majoritairement du collagène [Robert *et al.*, 2015]. Le collagène est constitué d'une répétition d'acides aminés $(Gly - X - Y)_n$. Nous avons déterminé lors de la première partie des travaux de thèse, que la diversité en peptides hydrolytiques est moins élevée dans l'hydrolysat de tilapia que dans l'hydrolysat de crevette. L'alignement à l'aide du logiciel Blast (https ://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) du collagène montre qu'il s'agit d'une protéine structurale très conservée chez les téléostéens et il est fort probable que de nombreux peptides provenant de l'hydrolysat de tilapia ne soient pas reconnus comme du non-soi. Ces résultats montrent donc que l'hydrolysat de tilapia possède un plus faible pouvoir immuno-stimulant et que son procédé d'hydrolyse devrait être optimisé pour améliorer cette fonctionnalité.

Performances de l'hydrolysat de crevette. L'ajout de 5% d'hydrolysat de co-produit de crevette dans le régime pauvre en FP (FM5) entraine la régulation d'un nombre de gènes plus important qu'avec l'hydrolysat de tilapia, ce qui a permis de mener les analyses d'enrichissement en annotations GO et d'analyser les voies de signalisation modulées par l'hydrolysat de crevette. Le métabolisme hépatique nutritionel n'est également pas modifié par l'ajout de l'hydrolysat de crevette. En revanche, l'expression des gènes liés à la coagulation semble particulièrement modulée par l'hydrolysat de crevette (**Tableau 25** page 222). En effet, plus préci-

sément, nous avons observé une répression des gènes de Prothrombin, Fibrinogen alpha chain et Fibrinogen gamma chain. Cette observation pourrait provenir de l'origine de la matière première composant l'hydrolysat de crevette. En effet, des activités « heparin-like » ont déjà été identifiés dans les têtes de crevettes *L. vannamei* [Chavante *et al.*, 2014]. Une activation des gènes de la coagulation a également été observée chez le bar eauropéen lors d'une inflammation du foie [Geay *et al.*, 2011] et pourrait mettre en lumière les propriétés anti-inflammatoires de l'hydrolysat de crevette.

Performances du mélange d'hydrolysats de protéines (crevette/tilapia). L'ajout de 5% d'un mélange d'hydrolysats de tilapia et de crevette (MH) dans le régime appauvri en FP (FM5) entraîne la régulation d'un grand nombre de gènes permettant ainsi de restaurer un profil transcriptomique hépatique très proche de celui de poissons ayant été nourris avec un régime riche en FP. En effet, seul un très faible nombre de gènes est DE entre les régimes riche en FP (FM20) et contenant le mélange d'hydrolysats (MH). L'ajout du mélange d'hydrolysats dans le régime faible en FP semble donc avoir un effet positif sur l'ensemble des des voies métaboliques (**Tableau 24** page 221) mais également des voies de signalisation (**Tableau 25** page 222). Comme observé précédemment lors de l'analyse du transcriptome intestinal, l'effet modulateur du mélange d'hydrolysats ne serait pas dû à un effet additionnel des deux hydrolysats mais bel et bien à un effet spécifique et synergique du mélange [Leduc *et al.*, 2018].

Même si les mécanismes sous-jacents restent inconnus, un apport plus varié en peptides hydrolytiques pourrait expliquer les résultats observés avec le mélange. En effet, l'importance de la diversité en petits peptides dans l'alimentation a déjà été démontrée par le passé [Espe *et al.*, 1999, Liaset *et al.*, 2000].

Conclusions. Dans un premier temps, ces travaux ont pu montrer et confirmer que la réduction de la FP dans l'aliment destiné au bar européen entrainait une modification importante de la réponse du transcriptome hépatique. Cette étude a également permis de montrer que de nombreux gènes exprimés dans le foie sont spécifiquement régulés en fonction de l'origine de la matière première composant l'hydrolysat de protéines utilisé pour formuler l'aliment. De plus, ces résultats mettent

en lumière l'importance de l'origine du couple matière première/procédé d'hydrolyse dans la fonctionnalité du produit. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, il serait intéressant d'étudier la régulation du transcriptome hépatique de façon plus ciblée en analysant séparément les gènes communs et spécifiquement DE par la farine de poisson ou par le mélange d'hydrolysats.

A l'issue de l'essai zootechnique, il avait été montré que la supplémentation de l'aliment pauvre en FP avec des hydrolysats de protéines avait permis de restaurer les performances de croissance au même niveau de celles enregistrés avec l'aliment à forte teneur en FP, et ce, quelque soit l'origine de l'hydrolysat. Dans ce chapitre, il a pu être montré que malgré les bonnes performances de croissance, il subsistait des perturbations importantes du métabolisme hépatique chez les poissons nourris avec les hydrolysats. Seule la supplémentation en mélange d'hydrolysats, se distinguant par une richesse en peptides plus importante, a pu limiter les pertubations.

4 Conclusion

Le remplacement des FP par des sources de protéines alternatives est devenu un enjeu majeur pour le développement d'une aquaculture durable. Si aujourd'hui, les FV représentent les meilleures candidats (notamment pour le marché européen) au remplacement des FP, leur utilisation à de fort niveaux d'incorporation reste difficile en raison de leurs conséquences négatives sur l'appétence, les performances nutritionnelles et la santé des poissons carnivores. De nombreuses études ont été menées ces dernières années chez les poissons et la mise en place d'approches transcriptomiques a permis de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu ainsi que les voies métaboliques perturbées par l'utilisation des FV. Lors de notre étude menée chez le bar européen, nous avons pu montrer que la diminution de la quantité de FP dans l'aliment entrainait une diminution des performances de croissance et modifiait de manière importante le métabolisme du foie et dans une moindre mesure celui de l'intestin, comme le montre la modification de l'expression de nombreux gènes liés au métabolisme nutritionnel et à l'immunité.

L'utilisation d'ingrédients fonctionnels est une stratégie aujourd'hui adoptée par l'industrie aquacole pour contrecarrer les effets négatifs des FV. Certains ingrédients sont utilisés pour améliorer l'appétence et d'autres plus spécifiquement la digestibilité ou l'immunité. Les hydrolysats de protéines, qui font l'objet des travaux présentés dans cette thèse, pourraient rassembler les trois bénéfices mentionnés précédemment et offrir aux fabricants d'aliments plus de flexibilité dans leur stratégie de formulations. Le test de conditionnement alimentaire mené chez le bar à l'IRTA a permis de confirmer que l'ajout de 5% d'hydrolysats de protéines dans un régime contenant 5% de FP permettait de restaurer des performances de croissance similaires à celle d'un régime contentant 20% de FP, et ce, quelque soit l'origine des matières pre-

mières (tilapia ou crevette) utilisées pour la fabrication de l'hydrolysat. De même, les hydrolysats appliqués dans la formule à faible teneur en FP, et en particulier l'hydrolysat de crevette, ont montré un effet positif sur le développement de l'épithélium intestinal, dont l'organisation histologique avait été impactée négativement par l'utilisation de FV. L'hydrolysat de crevette a en effet permis de compenser les faiblesses du régime pauvre en FP et de dépasser les performances de l'aliment contrôle à forte teneur en FP. L'hydrolysat de tilapia, s'il a permis d'améliorer les marqueurs histologiques de l'intestin en comparaison au régime pauvre en FP, n'a pas permis d'atteindre les performance du contrôle positif. L'aliment contenant le mélange des 2 hydrolysats a, quant à lui, montré des résultats intermédiaires.

Si la réponse zootechnique des poissons soumis aux différents hydrolysats est proche, ce n'est pas le cas pour la réponse transcriptomique qui reste très dépendante de l'origine des hydrolysats.

Concernant la réponse du transcriptome intestinal, nous avons montré que la combinaison de deux hydrolysats permettait de moduler un nombre de gènes beaucoup plus important que chacun des hydrolysats testés seuls. De plus, l'analyse des voies métaboliques montre que l'hydrolysat de tilapia semble impacter le métabolisme des carbohydrates et d'absorption des nutriments tandis que l'hydrolysat de crevette semble influencer les voies de l'immunité. Enfin, la combinaison des deux produits a permis de combiner les bénéfices en modulant des gènes du métabolisme de l'absorption des nutriments, de l'immunité mais également du métabolisme des lipides. Si l'ajout d'hydrolysat dans le régime pauvre en FP a permis de restaurer un profil d'expression de gènes de l'intestin très comparable à celui des poissons nourris avec un régime riche en FP, la réponse du profil d'expression des gènes hépatiques a été très différente. Ainsi, les deux hydrolysats (crevette et tilapia) utilisés seuls n'ont pas permis de compenser les fortes perturbations résultantes du remplacement de la FP par des FV. En effet, l'ajout de 5% d'hydrolysat de tilapia seul ne modifie pas le métabolisme ni les voies de signalisation du foie par rapport au régime FM5. L'hydrolysat de crevette seul ne modifie pas le métabolisme hépatique mais semble présenter des propriétés anti-thrombiques qu'il faudra étudier plus en détail. Enfin, le mélange d'hydrolysats permet de stimuler les fonctions métaboliques et immunitaires en comparaison au régime pauvre en FP (FM5).

Encore une fois, la combinaison des deux hydrolysats a semble-t-il permis de limiter les impacts de la diminution de FP, ce qui confirme l'importance de la diversité peptidique dans la performance d'un hydrolysat de protéines. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles investigations sur les mélanges hydrolysats dans le but de développer des produits ayant des fonctionnalités définies.

Un objectif clé aujourd'hui annoncé en nutrition aquacole est le soutien de la santé intestinale chez les poissons carnivores, notamment dans le contexte de réduction des FP dans les formules alimentaires. Une des données de sortie de ce travail de thèse étaient également de pouvoir définir une liste de gènes candidats indicateurs de la performance des produits. Grâce aux études présentées précédemment, la disponibilité de données zootechniques, histologiques et moléculaires issues des mêmes poissons a permis de proposer une liste de gènes indicateur de la santé intestinale d'un poisson carnivore (**Tableau 26**). S'il n'a pas été possible de mettre en évidence spécifiquement les gènes impliqués dans le développement différentiel des *villi*, l'analyse de l'expression différentielle des gènes de la partie proximale de l'intestin a néanmoins permis de déterminer un certain nombre gènes candidats. Nous avons ainsi défini deux types de marqueurs. Les marqueurs « **très favorables** » sont des gènes DE uniquement chez les poissons ayant été nourris avec le régime contenant l'hydrolysat de crevette, c'est à dire le régime qui aboutissait à une taille des *villi* significativement plus élevée que celle du contrôle positif riche en FP (FM20), l'idée sous-jacente étant que les *villi* de plus grande taille permettent une absorption intestinale plus efficace. Les marqueurs « **favorables** » sont quant à eux des gènes DE chez les poissons présentant des hauteurs de *villi* équivalentes au contrôle positif (FM20), et au mélange d'hydrolysats. Une étude par qPCR des variations d'expression de ces gènes candidats reste bien évidemment nécessaire pour valider ces marqueurs.

Tableau 26 – Biomarqueurs associés au développement de l'intestin

Marqueurs Très Favorables	
Hemoglobin subunit alpha-1	Activé
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58	Inhibé
Ran GTPase-activating protein 1	Inhibé
Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Inhibé
Marqueurs Favorables	
CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 2	Activé
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	Activé
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	Activé
Fucolectin	Activé
Fucolectin-1	Activé
Glycerol kinase	Activé
Hemoglobin subunit alpha	Activé
Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	Activé
Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	Activé
Serum amyloid P-component	Activé
Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT1	Activé
Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	Activé
Solute carrier family 13 member 5	Activé
Sushi domain-containing protein 2	Activé
Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	Activé
Very long-chain acyl-CoA synthetase	Activé
Actin, cytoplasmic 2	Inhibé
Apolipoprotein A-IV	Inhibé
Calpain-1 catalytic subunit	Inhibé
Cerebellar degeneration-related protein 2	Inhibé
DNA damage-inducible transcript 4-like protein	Inhibé
Farnesyl pyrophosphate synthase	Inhibé
GREB1-like protein	Inhibé
Insulin-like growth factor-binding protein 1	Inhibé
Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	Inhibé
Perilipin-2	Inhibé
Purine nucleoside phosphorylase	Inhibé
Serine/threonine-protein kinase Sgk1	Inhibé
Transcription factor jun-B	Inhibé

Les résultats précédents obtenus sur les prélèvements d'intestin et de foie de bars nourris avec des aliments à faible teneur en FP devront être complétés par l'analyse des données de survie du challenge bactérien menée en fin d'essai de conditionnement alimentaire à l'IRTA, ainsi que par la réponse des transcriptomes du foie et du rein, en ciblant plus spécifiquement la réponse immunitaire des poissons. L'analyse de la réponse du microbiote intestinal dans les études sur la performance des ingrédients alternatifs aux farines de poisson est un domaine qui mériterait également d'être investigué.

Sixième partie

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Les hydrolysats de protéines issus des co-produits de la pêche et de l'aquaculture font partie des ingrédients à fort potentiel nutritionnel pour l'alimentation des poissons et des crevettes d'élevage. Ils représentent également des sources riches en peptides bioactifs, et de ce fait, sont attractifs pour les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. De plus, ils ont l'avantage d'avoir un impact réduit sur l'environnement en permettant la valorisation de co-produits et en réduisant la dépendance de l'aquaculture vis-a-vis des FP. Néanmoins, bien que très étudiés par la communauté scientifique du point de vue de leurs qualités nutritionnelles et de leurs bioactivités, les hydrolysats de co-produits restent des mélanges complexes dont la composition est difficile à appréhender, si bien que les mécanismes à l'origine des performances *in vivo* restent mal élucidés.

L'objectif de cette thèse était ciblé sur le développement d'outils de caractérisation des hydrolysats de protéines d'origine aquatique et de leur performance chez le poisson. L'application de ce travail de thèse concerne le développement d'ingrédients fonctionnels qui contribueront au remplacement total ou partiel des FP dans les aliments destinés aux poissons carnivores. Ce travail thèse a été conduit dans le cadre d'un partenariat entre l'UMR BOREA de l'Université de Caen et la société Diana Aqua appartenant au groupe Symrise, avec une Convention Industrielle de Formation par la REcherche (CIFRE) de l'Association Nationale pour la Recherche Technologique.

1.1 De nouveaux outils pour mesurer la performance des hydrolysats de protéines

Pour mener à bien ces travaux de thèse et apporter des réponses concrètes aux questions posées, des outils méthodologiques, des matériels et des logiciels ont été développés en amont. Une attention particulière a été apportée afin que ces nouveaux outils soient conviviaux dans leur mise en place et leur utilisation.

La caractérisation structurale des hydrolysats de protéines. Il est nécessaire de connaitre les spécifications structurales des hydrolysats de protéines pour pouvoir les valoriser au mieux et ce, pour n'importe quel domaine d'application. En effet, leurs propriétés nutritionnelles et bioactives restent dépendantes de la composition du mélange en peptides (richesse et diversité). Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé plusieurs outils destinés à la caractérisation structurale des hydrolysats de protéines.

Le premier de ces outils consiste en une normalisation, en amont des tests d'analyse quantitatifs et fonctionnels, de la teneur en peptides issus d'hydrolysats pouvant présenter des formes galéniques différentes (poudre, concentré, liquide). Cet outil pourrait être complété par la définition d'une unité relative à la quantité de peptides dans un échantillon d'hydrolysat qui s'exprimerait en Unité Spectrophotométrique d'Hydrolysat (USH). Une unité USH serait équivalente à la teneur en peptides un volume d'un litre d'hydrolysat ayant pour absorbance 1 unité à 214 nm. À titre d'exemple, le seuil d'activité de l'hydrolysat de crevette est inférieur à 1,5 mUSH (moins de 1,5 ml d'échantillon normalisé à 1UA) et la détermination du profil de masse moléculaire par ESI-MS a été réalisée avec 50 mUSH (50 ml de l'échantillon normalisé à 1UA). Pour la caractérisation du profil peptidique qualitatif et quantitatif des hydrolysats, nous avons mis au point une méthodologie permettant la caractérisation de la composition en peptides par la combinaison de méthodes HPLC (HPLSEC) et de spectrométrie de masse (ESI-MS) et, ainsi autorisé la comparaison d'hydrolysats de protéines d'origine différente. La disponibilité de cet outil ouvre de nouvelles perspectives dans le développement et l'optimisation

d'hydrolysats de protéine grâce à une maîtrise plus fine des conditions d'hydrolyse et de leurs impacts sur les spécifications du produit fini. Il permettra également de mieux corréler les propriétés structurales de l'hydrolysat de protéines et les propriétés fonctionnelles (*in vitro* et *in vivo*), de contrôler la standardisation des lots issus de production industrielle ainsi que de caractériser des hydrolysats de protéines issus d'autres sociétés.

L'étude des propriétés fonctionnelles des hydrolysats de protéines reste un challenge important compte tenu du nombre de variables impliquées : espèce, physiologie ou âge des poissons, matière première composant les aliments et conditions d'élevage. En plus de la quantité et la diversité des peptides, il est intéressant de pouvoir caractériser les peptides qui composent les hydrolysats de protéines dans le but de les classifier comme peptides bioactifs ou potentiellement bioactifs. L'identification complète des peptides a été tentée pour deux hydrolysats différents de krill mais cette étude reste encore complexe et fastidieuse en raison du couplage de 3 méthodes d'analyses assez lourdes à mettre en place en raison de la disponibilité limitée des équipements, du coût élevé des analyses et de la hautre technicité de l'analyse des données. L'une des solutions envisagées pour simplifier ce type d'analyses serait le couplage de la détermination du profil de masses moléculaires de l'hydrolysat par LC-ESI-MS (iQual) et l'identification des peptides par LC-ESI-MS/MS. En effet, la plateforme de spectrométrie de masse PROTEOGEN de l'Université de Caen sera très prochainement doté d'un spectromètre de masse de dernière génération (timsTOFT M, Bruker Daltonics). Cet équipement permettra de conduire des analyses quantitatives qui seront à même, au moins de quantifier des peptides d'intérêt (ex : peptide hydrolytique myotrope KNPEQ identifié lors de ces travaux de thèse), au mieux d'identifier tous les peptides d'un hydrolysat.

La caractérisation fonctionnelle des hydrolysats de protéines. La caractérisation de la performance des ingrédients fonctionnels et plus particulièrement des hydrolysats de protéines n'a fait l'objet que de très peu d'études chez le poisson. Pourtant, il est important de mieux appréhender les mécanismes d'action des hydrolysats dans le but d'en optimiser les performances par la modulation des spécifications, notamment des profils peptidiques.

Au cours de cette thèse, nous avons développé un outil puissant, performant et peu coûteux pour mesurer la contraction *in vitro* de l'intestin de bar sous l'effet de peptides myotropes. Si la mesure des contractions à l'aide d'un capteur de force était déjà en place au sein du laboratoire, nous avons néanmoins apporté beaucoup d'améliorations à cette méthode dans le but de standardiser les mesures et de faciliter l'acquisition des données, grâce au développement, en partenariat avec le Docteur Jimmy Rangama du laboratoire CIMAP à Caen, d'un nouvel outil. Il s'agit d'un micro-contrôleur Arduino couplé à un logiciel de visualisation des mesures en temps réel. Cet outil permet d'avoir rapidement une appréciation objective du type d'effet des molécules testées sur l'intestin et du seuil d'activité. Ce test fonctionnel nous a permis de mettre en évidence, lors d'une série d'essais de screening sur plusieurs hydrolysats de protéines, que l'origine de la matière première (krill, crevettes, poisson, calamar) utilisé dans la fabrication de l'hydrolysat conditionne le type d'effet observé (myotrope ou myosuppresseur). Cette méthode de screening rapide a permis de sélectionner deux hydrolysats aux activités myotropes différentes pour la phase de test chez le bar européen qui a également permis de confirmer l'activité myotrope de l'hydrolysat de crevette. La mise en œuvre de techniques de peptidomique a permis d'identifier dans cet hydrolysat de crevette un peptide unique KNPEQ dont l'activité myotrope a été confirmée par le test fonctionnel sur intestin de bar. Il conviendra notamment de poursuivre les études sur ce peptide KNPEQ pour déterminer la capacité de ce peptide à accélérer le transit intestinal des poissons, lorsqu'il est incorporé à des régimes alimentaires et déterminer s'il peut apporter un bénéfice supplémentaire en terme de croissance et d'efficacité alimentaire.

Le système de mesure des contractions musculaires, développé au cours de ces travaux de thèse sur l'intestin de bar européen, est transposable à d'autres types de molécules (phéromones, polluants, médicaments) et sur d'autres modèles comme les mollusques ou les petits mammifères, par exemple. Ce système est dès à présent utilisé par le personnel du laboratoire pour mener à bien des expériences d'identification de peptides bioactifs chez la seiche *Sepia officinalis* et chez l'huître creuse *Magallana gigas*.

Le développement des analyses transcriptomiques haut débit comme le RNA-seq Illumina ouvre la voie à une exploitation plus approfondie des réponses physiologiques lors des tests de conditionnement alimentaire. La baisse des coûts analytiques, couplée à la multiplication des outils et plateformes d'analyses, rendent aujourd'hui accessible ces études aux acteurs non académiques. Toutefois, l'interprétation des résultats avec des outils bioinformatiques reste coûteuse en temps, en infrastructure et requiert des compétences techniques élevées. Les études transcriptomiques requièrent l'utilisation de contrôles biologiques pour garantir la robustesse du protocole expérimental. Dans le cadre de l'essai IRTA réalisé chez le bar européen, nous avons pu inclure des régimes de contrôle pauvres et riche en FP. Bien que les comparaisons de données issues des aliments tests *versus* les aliments contrôle soient très chronophages, ces analyses ont permis à la fois de positionner les performances zootechniques des hydrolysats mais également de s'assurer que les modifications d'expression des gènes associées aux hydrolysats débouchaient réellement sur un effet bénéfique sur les performances de l'animal. Enfin, les résultats issus de la réponse des transcriptomes intestinal et hépatique chez le bar devraient déboucher sur l'élaboration d'une puce à ADN virtuelle qui se focaliserait uniquement sur certaines fonctions particulières (immunité, nutrition protéique, nutrition lipidique, nutrition énergétique, inflammation, santé intestinale, ...). Cette puce virtuelle serait alors utilisée pour analyser la performance d'ingrédients chez le bar et en déterminer les effets fonctionnels voire les mécanismes d'action. Pour ce faire, il reste notamment à poursuivre et simplifier l'analyse bioinformatique des données. Ainsi, nous souhaitons encore améliorer le traitement des données en utilisant l'interface web de la suite logiciel Trinity : Trinotate Web (https ://tri-notate.github.io/TrinotateWeb.html).

Trinotate Web est une interface graphique de visualisation des résultats comme les paramètres de qualité de séquençage et de construction des transcriptomes, d'annotation fonctionnelle et d'expression différentielle (**Figure 48**). Elle est gratuite, tout comme le logiciel Trinity, et s'installe sur tout ordinateur équipé de Linux. Trinotate Web est beaucoup plus convivial et didactique car il s'utilise sur le même modèle qu'une navigation sur un site internet. Nous l'avons testé avec le jeu de données issues des analyses RNA-seq de l'intestin et, même si le programme est encore en développement, il participe déjà à rendre plus accessibles aux biologistes les analyses transcriptomiques.

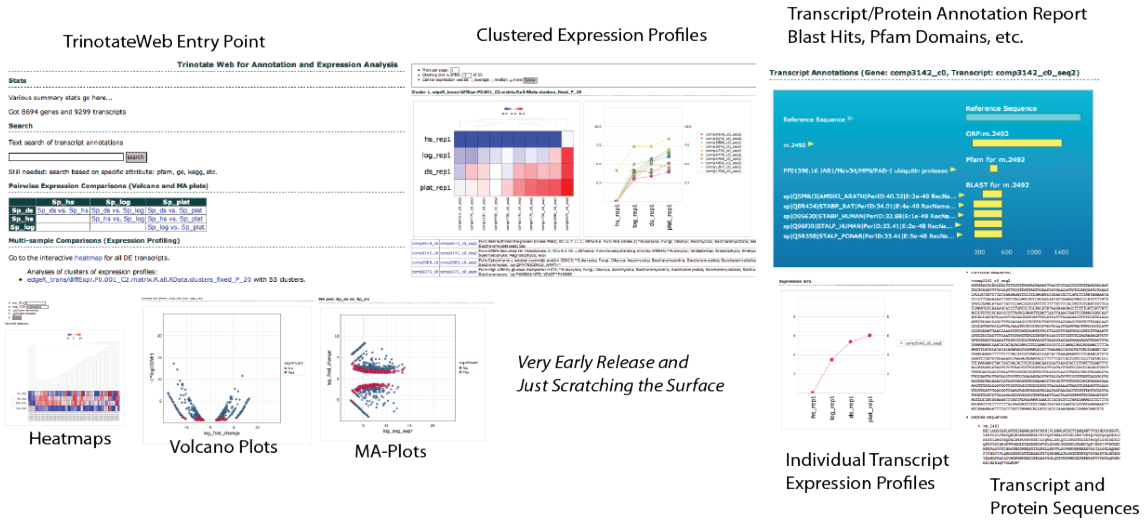


FIGURE 48 – Aperçu des fenêtres de Trinotate Web.

Standardisation de la caractérisation des hydrolysats de protéines. Le développement et la disponibilité des différents outils présentés ci-dessus devraient permettre de définir de nouveaux standards d'analyses spécifiques aux hydrolysats de protéines, intégrant les paramètres structuraux (quantité, diversité) mais également l'identification des peptides (**Figure 49**). En effet, il n'existe aujourd'hui aucune analyse normée permettant de caractériser les hydrolysats de protéines. Toutefois, pour des entreprises privées, la difficulté réside dans l'accès aux plateformes d'analyses qualifiées pour mener ce type d'analyse en routine, ainsi qu'aux outils de bioinformatique. La mise en place de normes permettrait d'améliorer la standardisation et la performance des hydrolysats de protéines et, également, d'apporter plus de clarté sur le marché de ces ingrédients fonctionnels.

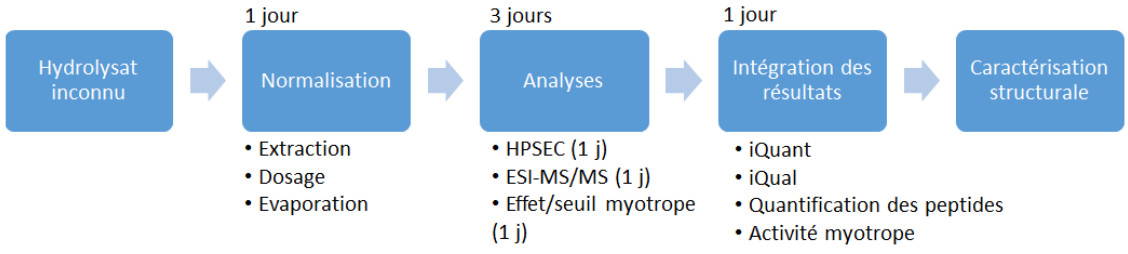


FIGURE 49 – Différentes étapes standardisées de la caractérisation structurale complète d'un hydrolysat de protéine.

1.2 Les hydrolysats de protéines ont-ils des propriétés permettant d'envisager la limitation de l'utilisation des farines de poisson ?

C'est fort des différents outils et méthodologies développés durant cette thèse que nous avons tenté par différentes approches de répondre à cette question : *les hydrolysats de protéines sont-ils de bons candidats pour le remplacement de la FP dans les aliments destinés aux poissons carnivores ?*

Ecologiquement et éthiquement, la réponse est oui, car la diminution de la pression exercée sur les espèces fourrages est nécessaire. En effet, il n'est plus concevable de continuer à puiser dans les ressources halieutiques pour nourrir des poissons d'élevage. La société change et il est fort probable que l'impact écologique de la production d'espèces animales d'élevage devienne dans les prochaines années une limitation au développement économique des filières les moins propres. Les hydrolysats de protéines sont fabriqués à partir de co-produits issus de la transformation des produits de la pêche et de l'aquaculture, qui sont généralement destinés à la production de produits à faible valeur ajoutée (farines, engrais, ...). Dans ce sens, leur empreinte écologique est très faible.

Économiquement, la réponse est oui, car créer de la valeur à partir de matières premières peu ou mal utilisées sera profondément ancrée dans le XXI^{eme} siècle. Les enjeux écologiques de développement durable et d'écologie industrielle seront les nouveaux leviers du développement économique de l'aquaculture de demain.

Nutritionnellement, la réponse est oui, car les performances zootechniques enregistrés sur des poissons nourris avec des hydrolysats sont comparables voire supé-

rieures à celles observées avec un régime riche en FP. En effet, la composition en peptides (quantité, diversité) et la présence de peptides bioactifs dans les hydrolysats apportent un bénéfice nutritionnel (digestion, activité myotrope) et santé (immunostimulation, santé digestive). L'identification du peptide myotrope KNPEQ issu du clivage de l'hémocyanine de crevette pose d'ailleurs de nouvelles questions sur les applications potentielles de peptide au niveau de l'organisme et notamment sa capacité à contrôler le transit intestinal des poissons pour rechercher une meilleure prise alimentaire et utilisation de l'aliment.

Il reste encore de nombreuses études à mener sur l'optimisation de la formulation des régimes alimentaires incorporant des hydrolysats de protéines Les résultats seraient-ils les mêmes avec des hydrolysats plus ou moins hydrolysés ou l'origine des co-produits est-elle la clé de la performance ? En effet, l'utilisation, dans un aliment pauvre en FP, d'un mélange d'hydrolysats de co-produits issus de deux origines différentes a permis de se rapprocher du profil d'expression de poissons nourris avec un régime riche en FP. Ces résultats questionnent sur le(s) mécanisme(s) de la performance des hydrolysats et ouvrent également la voie à de nombreuses études sur les mélanges hydrolysats. Il serait notamment intéressant de travailler sur la modulation des profils peptidiques du mélange d'hydrolysat pour identifier le(s) paramètre(s) responsable(s) de leurs performances : taille, richesse et abondance des peptides. Cela pourrait également permettre de définir un niveau minimum en peptides (caractérisés par leur origine et taille) à apporter dans les formules alimentaires pour garantir des performances élevées.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse concernent le bar européen devront également être confirmées sur d'autres espèces de poissons carnivores d'intérêt aquacole comme les salmonidés.

Enfin, les hydrolysats de protéines ne pouvant être utilisés comme seule source de protéines, il serait intéressant de combiner ces derniers avec des sources de protéines alternatives durables comme les farines d'insecte.

Septième partie

Bibliographie

Bibliographie

[Abu Elala et Ragaa, 2015] Abu Elala, N. M. et Ragaa, N. M. (2015). Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured Oreochromis niloticus. *Journal of Advanced Research*, 6(4):621–629.

[Adamidou *et al.*, 2009] Adamidou, S., Nengas, I., Alexis, M., Foundoulaki, E., Nikolopoulou, D., Campbell, P., Karacostas, I., Rigos, G., Bell, G. J. et Jauncey, K. (2009). Apparent nutrient digestibility and gastrointestinal evacuation time in European seabass (Dicentrarchus labrax) fed diets containing different levels of legumes. *Aquaculture*, 289(1-2):106–112.

[Adámková *et al.*, 2016] Adámková, A., Kourimská, L., Borkovcová, M., Kulma, M. et Mlček, J. (2016). Nutritional values of edible Coleoptera (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio* and *Alphitobius diaperinus*) reared in the Czech Republic. *Potravinarstvo*, 10(1):663–671.

[Adelizi *et al.*, 1998] Adelizi, P. D., Rosati, R. R., Warner, K., Wu, Y. V., Muench, T. R., White, M. R. et Brown, P. B. (1998). Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Aquaculture Nutrition*, 4(4):255–262.

[Akhter *et al.*, 2015] Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M. et Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture : A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2):733–741.

[Aksnes *et al.*, 2006] Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B. T. et Albrektsen, S. (2006). Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I : Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 261(1):305–317.

[Alami-Durante *et al.*, 2010] Alami-Durante, H., Médale, F., Cluzeaud, M. et Kaushik, S. J. (2010). Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture*, 303(1-4):50–58.

[Alberts *et al.*, 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2002). *Molecular Biology Of The Cell 4th Ed*, volume 53.

[Aldman *et al.*, 1989] Aldman, G., Jönsson, A. C., Jensen, J. et Holmgren, S. (1989). Gastrin/CCK-like peptides in the spiny dogfish, Squalus acanthias ; concentrations and actions in the gut. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 92(1):103–108.

[Alejandro Buentello et Gatlin, 2001] Alejandro Buentello, J. et Gatlin, D. M. (2001). Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to edwardsiella ictaluri. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13(3):194–201.

[Alishahi et Aïder, 2012] Alishahi, A. et Aïder, M. (2012). Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture : A review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3):817–830.

[Anderson et Wolf, 1995] Anderson, R. L. et Wolf, W. J. (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *The Journal of nutrition*, 125(3 Suppl):581S–588S.

[Andrews et Young, 1988] Andrews, P. L. R. et Young, J. Z. (1988). The effect of peptides on the motility of the stomach, intestine and rectum in the skate (Raja). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 89(2):343–348.

[Angelidis, 2006] Angelidis, P. (2006). Immersion booster vaccination effect on sea bass (Dicentrarchus labrax L.) juveniles. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 90(1-2):46–49.

[Antony Jesu Prabhu *et al.*, 2014] Antony Jesu Prabhu, P., Schrama, J. W., Mariojouls, C., Godin, S., Fontagné-Dicharry, S., Geurden, I., Surget, A., Bouyssiere, B. et Kaushik, S. J. (2014). Post-prandial changes in plasma mineral levels in rainbow trout fed a complete plant ingredient based diet and the effect of supplemental di-calcium phosphate. *Aquaculture*, 430:1–10.

[Aoki *et al.*, 2008] Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D. et Kondo, H. (2008). Molecular Innate Immunity in Teleost Fish : Review and Future Perspectives. *Fisheries Bethesda*, 39(3):263–276.

[Aoki Hamashima *et al.*, 1996] Aoki Hamashima, Shimazu, H., Fukushige, T., Akano, H., Yamagata, Y. et Watanabe, T. . (1996). Flesh quality in red sea bream [Pagrus major] fed with diet containing a combination of different protein sources as total substitution for fish meal.

[Arnott *et al.*, 1993] Arnott, D., Shabanowitz, J. et Hunt, D. F. (1993). Mass spectrometry of proteins and peptides : Sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. *Clinical Chemistry*, 39(9):2005–2010.

[Baeverfjord et Krogdahl, 1996] Baeverfjord, G. et Krogdahl, Å. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, Salmo salar L., distal intestine : a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19(5):375–387.

[Bai *et al.*, 2015] Bai, S. C., Katya, K. et Yun, H. (2015). 7 - Additives in aquafeed : An overview. *In* Davis, D. A., éditeur : *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pages 171–202. Woodhead Publishing, Oxford.

[Bakke-McKellep *et al.*, 2000] Bakke-McKellep, A. M., McL Press, C., Baeverfjord, G., Krogdahl, Å. et Landsverk, T. (2000). Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases*, 23(2):115–127.

[Bakke-McKellep *et al.*, 2007] Bakke-McKellep, A. M., Penn, M. H., Salas, P. M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringø, E. et Krogdahl, A. (2007). Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (Salmo salar L.). *The British journal of nutrition*, 97(4):699–713.

[Bakopoulos *et al.*, 2003] Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A. et Dimitriadis, G. J. (2003). Vaccination trials of sea

bass, Dicentrarchus labrax (L.), against Photobacterium damsela subsp. piscicida, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26(2):77–90.

[Barnabe, 1976] Barnabe, G. (1976). Elevage larvaire du Loup (*Dicentrarchus labrax (L.)*; Pisces, Serranidae) a l'aide d'aliment sec compose. *Aquaculture*, 9(C):237–252.

[Barroso *et al.*, 2014] Barroso, F. G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M. J., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A. et Pérez-Bañón, C. (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422-423:193–201.

[Bauchot, 1987] Bauchot, M.-L. (1987). Poissons osseux. *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire.\Zone de pêche 37. Volume II. Vertébrés.*, 2:892–1423.

[Bautista-Teruel *et al.*, 2003] Bautista-Teruel, M., Fermin, A. et Koshio, S. (2003). Diet development and evaluation for juvenile abalone, Haliotis asinina : animal and plant protein sources. *Aquaculture*, 219(1-4):645–653.

[Bednářová *et al.*, 2014] Bednářová, M., Borkovcová, M. et Komprda, T. (2014). Purine derivate content and amino acid profile in larval stages of three edible insects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1):71–76.

[Bell et Waagbø, 2008] Bell, J. G. et Waagbø, R. (2008). Safe and nutritious aquaculture produce : Benefits and risks of alternative sustainable aquafeeds. *In Aquaculture in the Ecosystem*, pages 185–225.

[Benjakul et Morrissey, 1997] Benjakul, S. et Morrissey, M. T. (1997). Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9):3423–3430.

[Berge *et al.*, 1998] Berge, G. E., Sveier, H. et Lied, E. (1998). Nutrition of Atlantic salmon (Salmo salar) ; The requirement and metabolic effect of lysine. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 120(3):477–485.

[Bernard *et al.*, 2006] Bernard, D., Six, A., Rigottier-Gois, L., Messiaen, S., Chilmonczyk, S., Quillet, E., Boudinot, P. et Benmansour, A. (2006). Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic t cells in a teleost fish. *The Journal of Immunology*, 176(7):3942–3949.

[Betancor *et al.*, 2015a] Betancor, M. B., Sprague, M., Sayanova, O., Usher, S., Campbell, P. J., Napier, J. A., Caballero, M. J. et Tocher, D. R. (2015a). Evaluation of a high-EPA oil from transgenic *Camelina sativa* in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) : Effects on tissue fatty acid composition, histology and gene expression. *Aquaculture*, 444:1–12.

[Betancor *et al.*, 2015b] Betancor, M. B., Sprague, M., Usher, S., Sayanova, O., Campbell, P. J., Napier, J. A. et Tocher, D. R. (2015b). A nutritionally-enhanced oil from transgenic Camelina sativa effectively replaces fish oil as a source of eicosapentaenoic acid for fish. *Scientific Reports*, 5:8104.

[Beveridge et Little, 2007] Beveridge, M. C. M. et Little, D. C. (2007). *The History of Aquaculture in Traditional Societies*, pages 1–29. Blackwell Science Ltd.

[Bharadwaj *et al.*, 2014] Bharadwaj, A. S., Patnaik, S., Browdy, C. L. et Lawrence, A. L. (2014). Comparative evaluation of an inorganic and a commercial chelated copper source in Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone) fed diets containing phytic acid. *Aquaculture*, 422-423:63–68.

[Bonaldo *et al.*, 2015] Bonaldo, A., Di Marco, P., Petochi, T., Marino, G., Parma, L., Fontanillas, R., Koppe, W., Mongile, F., Finoia, M. G. et Gatta, P. P. (2015). Feeding turbot juveniles Psetta maxima L. with increasing dietary plant protein levels affects growth performance and fish welfare. *Aquaculture Nutrition*, 21(4):401–413.

[Bonaldo *et al.*, 2011] Bonaldo, A., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Badiani, A. et Gatta, P. P. (2011). Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (Psetta maxima) juveniles. *Aquaculture*, 318(1-2):101–108.

[Bosi *et al.*, 2007] Bosi, G., Bermùdez, R. et Domeneghini, C. (2007). The galaninergic enteric nervous system of pleuronectiformes (Pisces, Osteichthyes) : An immunohistochemical and confocal laser scanning immunofluorescence study. *General and Comparative Endocrinology*, 152(1):22–29.

[Bosi *et al.*, 2018] Bosi, G., DePasquale, J. A., Manera, M., Castaldelli, G., Giari, L. et Sayyaf Dezfuli, B. (2018). Histochemical and immunohistochemi-

cal characterization of rodlet cells in the intestine of two teleosts, *Anguilla anguilla* and *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Diseases*, 41(3):475–485.

[Buddington *et al.*, 1997] Buddington, R. K., Krogdahl, A. et Bakke-Mckellep, A. M. (1997). The intestines of carnivorous fish : structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiol Scand Suppl*, 638(July 2015):67–80.

[Bui *et al.*, 2014] Bui, H. T. D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M. et Lee, K. J. (2014). Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major)* fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 418-419:11–16.

[Buonocore *et al.*, 2017] Buonocore, F., Nuñez-Ortiz, N., Picchietti, S., Randelli, E., Stocchi, V., Guerra, L., Toffan, A., Pascoli, F., Fausto, A., Mazzini, M. et Scapigliati, G. (2017). Vaccination and immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) against betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*.

[Bureau *et al.*, 1998] Bureau, D. P., Harris, A. M. et Young Cho, C. (1998). The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 161(1–4):27–43.

[Cabral *et al.*, 2013] Cabral, E. M., Fernandes, T. J., Campos, S. D., Castro-Cunha, M., Oliveira, M. B., Cunha, L. M. et Valente, L. M. (2013). Replacement of fish meal by plant protein sources up to 75% induces good growth performance without affecting flesh quality in ongrowing Senegalese sole. *Aquaculture*, 380-383:130–138.

[Cahu, 2004] Cahu, C. (2004). Domestication et fonction nutrition chez les poissons. *Productions Animales*, 17(3):205–210.

[Cahu *et al.*, 1999] Cahu, C. L., Zambonino Infante, J. L., Quazuguel, P. et Le Gall, M. M. (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171(1-2):109–119.

[Carter et Hauler, 2000] Carter, C. G. et Hauler, R. C. (2000). Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for atlantic salmon, *Salmo salar* l. *Aquaculture*, 185(3):299–311.

[CDU-HGE, 2014] CDU-HGE, C. d. U. e. H.-G.-E. (2014). Motricité digestive. *Les fondamentaux de la pathologie digestive Editions Elesevier-Masson*, pages 1–10.

[Chakraborty et Hancz, 2011] Chakraborty, S. B. et Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3(3):103–119.

[Chalamaiah *et al.*, 2012] Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R. et Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates : Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications : A review. *Food Chemistry*, 135(4):3020–3038.

[Chavante *et al.*, 2014] Chavante, S. F., Brito, A. S., Lima, M., Yates, E., Nader, H., Guerrini, M., Torri, G. et Bisio, A. (2014). A heparin-like glycosaminoglycan from shrimp containing high levels of 3-O-sulfated d-glucosamine groups in an unusual trisaccharide sequence. *Carbohydrate Research*, 390(1):59–66.

[Cheng *et al.*, 2011a] Cheng, Z., Buentello, A. et Gatlin, D. (2011a). Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, Sciaenops ocellatus. *Aquaculture*, 319(1-2).

[Cheng *et al.*, 2011b] Cheng, Z., Buentello, A. et Gatlin, D. M. (2011b). Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum Sciaenops ocellatus. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1):143–147.

[Cheng *et al.*, 2003] Cheng, Z. J., Hardy, R. W. et Usry, J. L. (2003). Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. *Aquaculture*, 218(1-4):553–565.

[Cheung *et al.*, 2015] Cheung, R. C. F., Ng, T. B. et Wong, J. H. (2015). *Marine peptides : Bioactivities and applications*, volume 13.

[Chikwati *et al.*, 2012] Chikwati, E. M., Venold, F. F., Penn, M. H., Rohloff, J., Refstie, S., Guttvik, A., Hillestad, M. et Krogdahl, Å. (2012). Interaction of soyasaponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, Salmo salar L. *British Journal of Nutrition*, 107(11):1570–1590.

[Choi *et al.*, 2009] Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K. et Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, 74(1).

[Chong *et al.*, 2002] Chong, A., Hashim, R. et Bin Ali, A. A. (2002). Inhibition of protease activities in discus Symphysodon spp. by three plant meals. *Aquaculture International*, 10(5):433–441.

[Citarasu, 2010] Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines : A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3):403–414.

[Costas *et al.*, 2011] Costas, B., Conceição, L. E., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A. et Afonso, A. (2011). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (Solea senegalensis Kaup, 1858). *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6):838–847.

[Da *et al.*, 2013] Da, C. T., Lundh, T. et Lindberg, J. E. (2013). Digestibility of dietary components and amino acids in animal and plant protein feed ingredients in striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 19(5):741–750.

[Daniel, 2018] Daniel, N. (2018). A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(February):164–179.

[Daniel L. et Einar, 2014] Daniel L., M. et Einar, R. (2014). *Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. Wiley-Blackwell.

[Dawood *et al.*, 2016] Dawood, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M., Hossain, M., Nhu, T., Dossou, S. et Moss, A. (2016). Effects of dietary supplementation of Lactobacillus rhamnosus or/and Lactococcus lactis on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, Pagrus major. *Fish and Shellfish Immunology*, 49:275–285.

[Dawood *et al.*, 2017] Dawood, M. A., Koshio, S. et Esteban, M. Á. (2017). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture : A review. *Reviews in Aquaculture*, pages 1–25.

[De *et al.*, 2014] De, B. C., Meena, D. K., Behera, B. K., Das, P., Das , P. K. et Sharma, A. P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture : Immunomodulatory and ecophysiological responses.

[De Francesco *et al.*, 2004] De Francesco, M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S. J. et Poli, B. M. (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(1-4):413–429.

[De Francesco *et al.*, 2007] De Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., Gómez-Réqueni, P., Médale, F., Kaushik, S. J., Mecatti, M. et Poli, B. M. (2007). Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (Sparus aurata) on growth and body/fillet quality traits. *Aquaculture Nutrition*, 13(5):361–372.

[De Santis *et al.*, 2015] De Santis, C., Bartie, K. L., Olsen, R. E., Taggart, J. B. et Tocher, D. R. (2015). Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D : Genomics and Proteomics*, 15:1–11.

[de Silva et Anderson, 1994] de Silva, S. et Anderson, T. (1994). *Fish Nutrition in Aquaculture*. Aquaculture Series. Springer Netherlands.

[DePaola *et al.*, 1995] DePaola, A., Peeler, J. T. et Rodrick, G. E. (1995). Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram- negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6):2335–2340.

[Dias *et al.*, 1997] Dias, J., Gomes, E. F. et Kaushik, S. J. (1997). Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European seabass fed plant-protein rich diets. *Aquatic Living Resources*, 10(6):385–389.

[Direkbusarakom, 2011] Direkbusarakom, S. (2011). Application of Medicinal Herbs to Aquaculture in Asia. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 1(1):7–14.

[Dos Santos *et al.*, 2001] Dos Santos, N. M., Taverne-Thiele, J. J., Barnes, A. C., Van Muiswinkel, W. B., Ellis, A. E. et Rombout, J. H. (2001). The gill

is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (Dicentrarchus labrax, L.) in a Photobacterium damselae ssp. piscicida bacterin : An ontogenetic study. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(1):65–74.

[dos Santos *et al.*, 2000] dos Santos, N. M. S., Romano, N., de Sousa, M., Ellis, A. E. et Rombout, J. (2000). Ontogeny of B and T cells in sea bass (Dicentrarchus labrax, L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 10(7):583–596.

[Du Pasquier, 2001] Du Pasquier, L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1):1–15.

[Duarte *et al.*, 2009] Duarte, C. M., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marbà, N., Guiu, J., Black, K. et Karakassis, I. (2009). Will the Oceans Help Feed Humanity ? *BioScience*, 59(11):967–976.

[Dumitrescu *et al.*, 2011] Dumitrescu, G., Lavinia, ., Drinceanu, D., Julean, C., Stef, D., Ciochina, L. P. et Pandur, C. (2011). Control on the Wheat Non-Starch Polysaccharides (NSP)' Anti-Nutritional Effect on Intestinal Wall , by Introducing Xylanase in Broiler Feed. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2):155– 163.

[Elmada *et al.*, 2016] Elmada, C. Z., Huang, W., Jin, M., Liang, X., Mai, K. et Zhou, Q. (2016). The effect of dietary methionine on growth, antioxidant capacity, innate immune response and disease resistance of juvenile yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco). *Aquaculture Nutrition*, 22(6):1163–1173.

[Engin et Carter, 2005] Engin, K. et Carter, C. G. (2005). Fish meal replacement by plant and animal by-products in diets for the Australian short-finned eel, Anguilla australis australis (Richardson). *Aquaculture Research*, 36(5):445–454.

[Escaffre *et al.*, 2007] Escaffre, A.-M., Kaushik, S. et Mambrini, M. (2007). Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. *Aquaculture*, 273(1):127–138.

[Espe *et al.*, 2008] Espe, M., Hevrøy, E. M., Liaset, B., Lemme, A. et El-Mowafi, A. (2008). Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, Salmo salar. *Aquaculture*, 274(1):132–141.

[Espe *et al.*, 2006] Espe, M., Lemme, A., Petri, A. et El-Mowafi, A. (2006). Can Atlantic salmon (Salmo salar) grow on diets devoid of fish meal ? *Aquaculture*, 255(1-4):255–262.

[Espe *et al.*, 2007] Espe, M., Lemme, A., Petri, A. et El-Mowafi, A. (2007). Assessment of lysine requirement for maximal protein accretion in atlantic salmon using plant protein diets. *Aquaculture*, 263(1-4):168–178.

[Espe *et al.*, 2010] Espe, M., Rathore, R. M., Du, Z. Y., Liaset, B. et El-Mowafi, A. (2010). Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18 :1 to 18 :0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, Salmo salar. *Amino Acids*, 39(2):449–460.

[Espe *et al.*, 1999] Espe, M., Sveier, H., Hogoy, I. et Lied, E. (1999). Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed fish protein concentrate. *Aquaculture*, 174(1-2):119–137.

[Estévez *et al.*, 2011] Estévez, A., Treviño, L., Kotzamanis, Y., Karacostas, I., Tort, L. et Gisbert, E. (2011). Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (Argyrosomus regius) juveniles at low temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 17(2).

[FAO, 2006] FAO (2006). Cultured aquatic species fact sheets. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, 74(mode 70):1–10.

[FAO, 2010] FAO (2010). *Rapport de la Consultation mixte d'experts sur les risques et benefices de la consommation de poisson. Rome, 25-29 janvier 2010*, volume 978. FAO.

[FAO, 2012] FAO (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012.*

[FAO, 2014] FAO (2014). *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture*, volume Rome.

[FAO, 2016a] FAO (2016a). The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, pages 1–14.

[FAO, 2016b] FAO (2016b). *The state of world fisheries and aquaculture.* FAO.

[FAO - FIDA - WFP, 2015] FAO - FIDA - WFP (2015). *L'état de l'insécurité alimentaire dans le monde.*

[FEAP, 2016] FEAP (2016). Annual Report 2016. pages 1–38.

[Ferrara *et al.*, 2015] Ferrara, E., Gustinelli, A., Fioravanti, M. L., Restucci, B., Quaglio, F., Marono, S. et Piccolo, G. (2015). Histological and micro-/macro-morphological evaluation of intestine in sharpsnout seabream (Diplodus puntazzo) fed soybean meal-based diets added with MOS and inulin as prebiotics. *Aquaculture International*, 23(6):1525–1537.

[Floreto *et al.*, 2000] Floreto, E., Bayer, R. et Brown, P. (2000). The effects of soybean-based diets, with and without amino acid supplementation, on growth and biochemical composition of juvenile American lobster, Homarus americanus. *Aquaculture*, 189(3-4):211–235.

[Fontaínhas-Fernandes *et al.*, 1999] Fontaínhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M. A. et Coimbra, J. (1999). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia : Digestibility and growth performance. *Aquaculture International*, 7(1):57–67.

[Fournier *et al.*, 2004] Fournier, V., Huelvan, C. et Desbruyeres, E. (2004). Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 236(1-4):451–465.

[Francesco *et al.*, 2004] Francesco, M. d., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S. J. et Poli, B. M. (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(1–4):413 – 429.

[Francis *et al.*, 2001] Francis, G., Makkar, H. P. S. et Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3-4):197–227.

[Frigg *et al.*, 1990] Frigg, M., Prabucki, A. L. et Ruhdel, E. U. (1990). Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability of trout fillets. *Aquaculture*, 84(2):145–158.

[Gabriel Aguirre-Guzmán, 2012] Gabriel Aguirre-Guzmán (2012). The use of probiotics in aquatic organisms : A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(23).

[Ganguly *et al.*, 2013] Ganguly, S., Dora, K. C., Sarkar, S. et Chowdhury, S. (2013). Supplementation of prebiotics in fish feed : A review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(2):195–199.

[García Hernández *et al.*, 2001] García Hernández, M. P., Lozano, M. T., Elbal, M. T. et Agulleiro, B. (2001). Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax L*). Light and electron microscopic studies. *Anatomy and embryology*, 204(1):39–57.

[Gatlin *et al.*, 1992] Gatlin, D. M., Bai, S. C. et Erickson, M. C. (1992). Effects of dietary vitamin E and synthetic antioxidants on composition and storage quality of channel catfish, Ictalurus punctatus. *Aquaculture*, 106(3-4):323–332.

[Gatlin *et al.*, 2007] Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, \., Nelson, R. et others (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds : a review. *Aquaculture Research*, 38(6):551–579.

[Gaylord *et al.*, 2004] Gaylord, T. G., Rawles, S. D. et Gatlin, D. M. (2004). Amino acid availability from animal, blended, and plant feedstuffs for hybrid striped bass (Morone chrysops x M. saxatilis). *Aquaculture Nutrition*, 10(5):345–352.

[Geay *et al.*, 2011] Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J. L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C. L. et Mazurais, D. (2011). Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics*, 12(1):522.

[GESAMP, 1996] GESAMP (1996). MONITORING THE ECOLOGICAL EFFECTS OF COASTAL AQUACULTURE WASTES. *(IMO/FAO/Unesco-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*, 57:38p.

[Gibson Gaylord *et al.*, 2007] Gibson Gaylord, T., Barrows, F. T., Teague, A. M., Johansen, K. A., Overturf, K. E. et Shepherd, B. (2007). Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture*, 269(1-4):514–524.

[Gislason *et al.*, 1994] Gislason, G., Olsen, R. E. et Ringø, E. (1994). Lack of growth-stimulating effect of lactate on Atlantic Salmon, Salmo salar L. *Aquaculture Research*, 25(8):861–862.

[Goda *et al.*, 2007] Goda, A. M., El-Haroun, E. R. et Kabir Chowdhury, M. A. (2007). Effect of totally or partially replacing fish meal by alternative protein sources on growth of African catfish Clarias gariepinus (Burchell, 1822) reared in concrete tanks. *Aquaculture Research*, 38(3):279–287.

[Gomes *et al.*, 1995] Gomes, E. F., Rema, P. et Kaushik, S. J. (1995). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 130(2):177–186.

[Gómez-Requeni *et al.*, 2004] Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J., Médale, F., Martin, S., Houlihan, D., , S. et Pérez-Sánchez, J. (2004). 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*, 232(1):493–510.

[Gouveia *et al.*, 2008] Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A. et Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in Novel Food Products. *In* Konstantinos N. Papadopoulos, P., éditeur : *Food Chemistry Research Developments*, chapitre 2, page 107. Nova Science Publishers, Inc.

[Gravningen *et al.*, 1998] Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L. H., Nissen, B., Rikardsen, K. S., Greger, E. et Vigneulle, M. (1998). Bivalent vaccines for sea bass (Dicentrachus labrax) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4):159–162.

[Guérard *et al.*, 2001] Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D. et Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4-6): 1051–1059.

[Guillaume *et al.*, 1999] Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. et Métailler, R. (1999). *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés.*

[Haas *et al.*, 2013] Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N. et Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction

from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8):1494–1512.

[Hall *et al.*, 2017] Hall, F. G., Jones, O. G., O'Haire, M. E. et Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224:414–422.

[Hall *et al.*, 2013] Hall, S. J., Hilborn, R., Andrew, N. L. et Allison, E. H. (2013). Innovations in capture fisheries are an imperative for nutrition security in the developing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21):8393–8.

[Hansen *et al.*, 2011] Hansen, A. C., Hemre, G. I., Karlsen, Koppe, W. et Rosenlund, G. (2011). Do plant-based diets for Atlantic cod (Gadus morhua L.) need additions of crystalline lysine or methionine ? *Aquaculture Nutrition*, 17(2).

[Hansen *et al.*, 2007] Hansen, A. C., Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Koppe, W. et Hemre, G. I. (2007). Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (Gadus morhua L.) I - Effects on growth and protein retention. *Aquaculture*, 272(1-4):599–611.

[Hansen *et al.*, 2006] Hansen, A. C., Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Olsvik, P. A. et Hemre, G. I. (2006). The inclusion of plant protein in cod diets, its effects on macronutrient digestibility, gut and liver histology and heat shock protein transcription. *Aquaculture Research*, 37(8):773–784.

[Hansen *et al.*, 2015] Hansen, A. C., Waagbø, R. et Hemre, G. I. (2015). New B vitamin recommendations in fish when fed plant-based diets. *Aquaculture Nutrition*, 21(5):507–527.

[Hansen *et al.*, 2005] Hansen, J. D., Landis, E. D. et Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout : Implications for a distinctive b cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19):6919–6924.

[Hardy, 2010] Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets : Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41(5): 770–776.

[Harikrishnan *et al.*, 2011] Harikrishnan, R., Balasundaram, C. et Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4):1–15.

[Harpaz, 2005] Harpaz, S. (2005). L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition - A review. *Aquaculture*, 249(1-4):3–21.

[Harper, 2002] Harper, C. (2002). Chemical resistance of pathogens in aquaculture. *Aquaculture Magazine*, 28(1):51–55.

[Hatlen *et al.*, 2017] Hatlen, B., Berge, K., Nordrum, S., Johnsen, K., Kolstad, K. et Mørkøre, T. (2017). The effect of low inclusion levels of Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal on growth performance, apparent digestibility and slaughter quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, 23(4):721–729.

[Hisano *et al.*, 2016] Hisano, H., Pilecco, J. L. et de Lara, J. A. F. (2016). Corn gluten meal in pacu Piaractus mesopotamicus diets : effects on growth, haematology, and meat quality. *Aquaculture International*, 24(4):1049–1060.

[Hixson *et al.*, 2014] Hixson, S. M., Parrish, C. C. et Anderson, D. M. (2014). Full substitution of fish oil with camelina (Camelina sativa) oil, with partial substitution of fish meal with camelina meal, in diets for farmed Atlantic salmon (Salmo salar) and its effect on tissue lipids and sensory quality. *Food Chemistry*, 157:51–61.

[Hoffmann, 2005] Hoffmann, R. C. (2005). A brief history of aquatic resource use in medieval Europe. *Helgoland Marine Research*, 59(1):22–30.

[Hölker et Lenz, 2005] Hölker, U. et Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages ? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3):301–306.

[Holmberg, 2004] Holmberg, A. (2004). Ontogeny of the gut motility control system in zebrafish Danio rerio embryos and larvae. *Journal of Experimental Biology*, 207(23):4085–4094.

[Holmgren et Olsson, 2009] Holmgren, S. et Olsson, C. (2009). *Chapter 10 The Neuronal and Endocrine Regulation of Gut Function*, volume 28, pages 467–512.

[Hossain *et al.*, 2016] Hossain, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N., Dawood, M., Kader, M., Bulbul, M. et Fujieda, T. (2016). Efficacy of nucleotide related products on growth, blood chemistry, oxidative stress and growth factor gene expression of juvenile red sea bream, Pagrus major. *Aquaculture*, 464:8–16.

[Hu *et al.*, 2014] Hu, K., Feng, L., Jiang, W., Liu, Y., Jiang, J., Li, S. et Zhou, X. (2014). Oxidative damage repair by glutamine in fish enterocytes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(5):1437–1445.

[Hwang *et al.*, 2013] Hwang, J. H., Lee, S. W., Rha, S. J., Yoon, H. S., Park, E. S., Han, K. H. et Kim, S. J. (2013). Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, Sebastes schlegeli. *Aquaculture International*, 21(3):525–538.

[Irvine, 2003] Irvine, G. B. (2003). High-performance size-exclusion chromatography of peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 56(1-3):233–242.

[Islam *et al.*, 2004] Islam, M. S., Khan, S. et Tanaka, M. (2004). Waste loading in shrimp and fish processing effluents : Potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Marine Pollution Bulletin*, 49(1-2):103–110.

[Iwashita *et al.*, 2015] Iwashita, M., Addo, S. et Terhune, J. (2015). Use of pre- and probiotics in finfish aquaculture. *In Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, pages 235–249.

[Jabir *et al.*, 2012] Jabir, M., Razak, S. et Vikineswary, S. (2012). Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11(24).

[Jackson, 2009] Jackson, A. (2009). Fish in - Fish Out Ratios Explained. *Aquaculture Europe*, 34(3):5–10.

[Jackson et Newton, 2016] Jackson, A. et Newton, R. (2016). Project To Model the Use of Fisheries By-Products in the Production of Marine Ingredients With Special Reference To the Omega 3 Fatty Acids EPA and DHA. *IFFO and University of Stirling*, (July):1–14.

[Jennings *et al.*, 1992] Jennings, S., Jennings, S. et Pawson, M. G. (1992). The origin and recruitment of bass, *dicentrarchus labrax*, larvae to nursery areas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(1):199–212.

[Jensen *et al.*, 1991] Jensen, J., Axelsson, M. et Holmgren, S. (1991). Effects of Substance-P and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Gastrointestinal Blood-Flow in the Atlantic Cod Gadus-Morhua. *Journal of Experimental Biology*, 156: 361–373.

[Jensen et Holmgren, 1985] Jensen, J. et Holmgren, S. (1985). Neurotransmitters in the intestine of the atlantic cod, Gadus morhua. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 82(1):81–89.

[Jensen *et al.*, 1987] Jensen, J., Holmgren, S. et Jönsson, A. C. (1987). Substance P-like immunoreactivity and the effects of tachykinins in the intestine of the Atlantic cod, Gadus morhua. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 20(1):25–33.

[Jensen *et al.*, 1993] Jensen, J., Karila, P., Jonsson, A. C., Aldman, G. et Holmgren, S. (1993). Effects of Substance-P and Distribution of Substance P-Like Immunoreactivity in Nerves Supplying the Stomach of the Cod, Gadus-Morhua. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(3):237–247.

[Jiang *et al.*, 2016] Jiang, J., Shi, D., Zhou, X. Q., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W. D., Wu, P., Tang, L., Wang, Y. et Zhao, Y. (2016). Effects of lysine and methionine supplementation on growth, body composition and digestive function of grass carp (Ctenopharyngodon idella) fed plant protein diets using high-level canola meal. *Aquaculture Nutrition*, 22(5):1126–1133.

[Jobling, 1980] Jobling, M. (1980). Gastric evacuation in plaice , *Pleuronectes plutessa* L . : effects of dietary energy level and food composition. *Journal of Fish Biology*, pages 187–196.

[Johnsen *et al.*, 2011] Johnsen, C. A., Hagen, O. et Bendiksen, E. Å. (2011). Long-term effects of high-energy, low-fishmeal feeds on growth and flesh characteristics of Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture*, 312(1-4):109–116.

[Johnson *et al.*, 2015] Johnson, R. B., Kim, S. K., Watson, A. M., Barrows, F. T., Kroeger, E. L., Nicklason, P. M., Goetz, G. W. et Place, A. R.

(2015). Effects of dietary taurine supplementation on growth, feed efficiency, and nutrient composition of juvenile sablefish (Anoplopoma fimbria) fed plant based feeds. *Aquaculture*, 445:79–85.

[Jönsson *et al.*, 1987] Jönsson, A. C., Holmgren, S. et Holstein, B. (1987). Gastrin/CCK-like immunoreactivity in endocrine cells and nerves in the gastrointestinal tract of the cod, Gadus morhua, and the effect of peptides of the gastrin/CCK family on cod gastrointestinal smooth muscle. *General and Comparative Endocrinology*, 66(2):190–202.

[Kaushik, 2002] Kaushik, S. J. (2002). European sea bass, Dicentrarchus labrax. *In* Webster, C. D. et Lim, C., éditeurs : *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*, pages 28–39. CABI.

[Kaushik *et al.*, 2004] Kaushik, S. J., Covès, D., Dutto, G. et Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 230(1-4):391–404.

[Kaushik *et al.*, 1995] Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., Fauconneau, B. et Laroche, M. (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(3):257–274.

[Kennedy *et al.*, 2016] Kennedy, D. A., Kurath, G., Brito, I. L., Purcell, M. K., Read, A. F., Winton, J. R. et Wargo, A. R. (2016). Potential drivers of virulence evolution in aquaculture. *Evolutionary Applications*, 9(2):344–354.

[Kennedy et Fitzmaurice, 1972] Kennedy, M. et Fitzmaurice, P. (1972). The Biology Of The Bass, *Dicentrarchus Labrax*, In Irish Waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 52(3):557–597.

[Khosravi *et al.*, 2015a] Khosravi, S., Bui, H., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Jeong, J. et Lee, K.-J. (2015a). Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Nutrition*, 21(3):321–331.

[Khosravi *et al.*, 2017] Khosravi, S., Bui, H. T. D., Herault, M., Fournier, V., Kim, K.-D., Lee, B.-J., Kim, K.-W. et Lee, K.-J. (2017). Supplementation of Protein Hydrolysates to a Low-fishmeal Diet Improves Growth and Health Status of Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*.

[Khosravi *et al.*, 2015b] Khosravi, S., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Lee, C.-R., Dio Bui, H. T., Jeong, J.-B. et Lee, K.-J. (2015b). Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2):858–868.

[King *et al.*, 2001] King, P., Aldridge, M., Kennedy-Stoskopf, S. et Stott, J. (2001). Immunology. *In* F.M.D., L. D. &. et (Eds.), G., éditeurs : *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 2nd Edition*, chapitre 12, pages 237–252. CRC Press LLC, L.A.

[Kitazawa *et al.*, 1986] Kitazawa, T., Kondo, H. et Temma, K. (1986). α2-Adrenoceptor-mediated contractile response to catecholamines in smooth muscle strips isolated from rainbow trout stomach (Salmo gairdneri). *British Journal of Pharmacology*, 89(2):259–266.

[Klein *et al.*, 1998] Klein, S., Cohn, S. et Alpers, D. (1998). The alimentary tract in nutrition. *Modern nutrition in health and disease*, 9:605–629.

[Knudsen *et al.*, 2008] Knudsen, D., Jutfelt, F., Sundh, H., Sundell, K., Koppe, W. et Frøkiær, H. (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.). *British Journal of Nutrition*, 100(01):120–9.

[Köprücü et Sertel, 2012] Köprücü, K. et Sertel, E. (2012). The effects of less-expensive plant protein sources replaced with soybean meal in the juvenile diet of grass carp (Ctenopharyngodon idella) : Growth, nutrient utilization and body composition. *Aquaculture International*, 20(3):399–412.

[Kortner *et al.*, 2012] Kortner, T. M., Skugor, S., Penn, M. H., Mydland, L. T., Djordjevic, B., Hillestad, M., Krasnov, A. et Krogdahl, Å. (2012). Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrige-

nomic interactions underlying enteropathy in Atlantic salmon (Salmo salar). *BMC Veterinary Research*, 8(1):1.

[Kotzamanis *et al.*, 2007] Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Zambonino Infante, J. et Cahu, C. (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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 147(1):205–214.

[Kousoulaki *et al.*, 2015] Kousoulaki, K., Sether, B. S., Albrektsen, S. et 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. *Aquaculture Nutrition*, 21(2):129–151.

[Kroeckel *et al.*, 2012] Kroeckel, S., Harjes, A. G., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A. et Schulz, C. (2012). When a turbot catches a fly : Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 364-365:345–352.

[Krogdahl *et al.*, 2000] Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, a. M., Røed, K. H. et Baeverfjord, G. (2000). Feeding Atlantic salmon Salmo salar L. soybean products : effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition*, 6(2):77–84.

[Krogdahl *et al.*, 2015] Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M. et Bakke, A. M. (2015). Soya Saponins Induce Enteritis in Atlantic Salmon (Salmo salar L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15):3887–3902.

[Krogdahl *et al.*, 2005] Krogdahl, A., Hemre, G. I. et Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition : Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11(2):103–122.

[Król *et al.*, 2016] Król, E., Douglas, A., Tocher, D. R., Crampton, V. O., Speakman, J. R., Secombes, C. J. et Martin, S. A. M. (2016). Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC genomics*, 17(1):156.

[Kum et Sekki, 2011] Kum, C. et Sekki, S. (2011). The Immune System Drugs in Fish : Immune Function, Immunoassay, Drugs. *Recent Advances in Fish Farms*, (May 2017).

[Kumar *et al.*, 2017] Kumar, R., Sahoo, P. K. et Barat, A. (2017). Transcriptome profiling and expression analysis of immune responsive genes in the liver of Golden mahseer (*Tor putitora*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 67:655–666.

[Kumar *et al.*, 2012] Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P., De Boeck, G. et Becker, K. (2012). Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3):335–364.

[Kuz'mina, 1996] Kuz'mina, V. V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148(1):25–37.

[Lall, 1991] Lall, S. (1991). Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. *In* Cowey CB, C. C., éditeur : *Nutritional Strategies and Aquaculture Wastes.*, pages 21–36. University of Guelph, Ontario.

[Léauté, 1984] Léauté, J.-P. (1984). Approche du regime alimentaire des juveniles de bars et de limandes en baie de Somme. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 48:55–63.

[Leduc *et al.*, 2018] Leduc, A., Zatylny-gaudin, C., Robert, M., Corre, E., Corguille, G. L., Castel, H., Lefevre-scelles, A., Fournier, V., Gisbert, E., Andree, K. B. et Henry, J. (2018). Dietary aquaculture by-product hydrolysates : impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets. *BMC Genomics*, 19(396):1–20.

[Lee et Gao, 2012] Lee, J. Y. et Gao, Y. (2012). Review of the Application of Garlic, Allium sativum, in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(4):447–458.

[Lee *et al.*, 2010] Lee, K. J., Powell, M. S., Barrows, F. T., Smiley, S., Bechtel, P. et Hardy, R. W. (2010). Evaluation of supplemental fish bone meal made from Alaska seafood processing byproducts and dicalcium phosphate in plant protein based diets for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture*, 302(3-4):248–255.

[Lemos *et al.*, 2000] Lemos, D., Ezquerra, J. M. et Garcia-Carreño, F. L. (2000). Protein digestion in penaeid shrimp : Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186(1-2):89–105.

[Li *et al.*, 2016] Li, M., Lai, H., Li, Q., Gong, S. et Wang, R. (2016). Effects of dietary taurine on growth, immunity and hyperammonemia in juvenile yellow catfish Pelteobagrus fulvidraco fed all-plant protein diets. *Aquaculture*, 450:349–355.

[Li *et al.*, 2013] Li, M. H., Oberle, D. F. et Lucas, P. M. (2013). Apparent digestibility of alternative plant-protein feedstuffs for channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque). *Aquaculture Research*, 44(2):282–288.

[Li et Gatlin, 2006] Li, P. et Gatlin, D. M. (2006). Nucleotide nutrition in fish : Current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251(2-4):141–152.

[Liaset *et al.*, 2000] Liaset, B., Lied, E. et Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry ; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5):581–589.

[Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999] Liceaga-Gesualdo, a. M. et Li-Chan, E. C. Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64(6):1000–1004.

[Lie *et al.*, 2011] Lie, K. K., Hansen, A. C., Eroldogan, O. T., Olsvik, P. A., Rosenlund, G. et Hemre, G. I. (2011). Expression of genes regulating protein metabolism in Atlantic cod (Gadus morhua L.) was altered when including high diet levels of plant proteins. *Aquaculture Nutrition*, 17(1):33–43.

[Lilleeng *et al.*, 2009] Lilleeng, E., Penn, M. H., Haugland, y., Xu, C., Bakke, A. M., Krogdahl, s., Landsverk, T. et Frøystad-Saugen, M. K. (2009). Decreased expression of TGF-beta, GILT and t-cell markers in the early stages of soybean enteropathy in atlantic salmon (*Salmo salar* l.). *Fish & Shellfish Immunology*, 27(1):65–72.

[Lin *et al.*, 2011] Lin, S., Pan, Y., Luo, L. et Luo, L. (2011). Effects of dietary β-1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (Cyprinus carpio koi). *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6):788–794.

[Liti *et al.*, 2006] Liti, D. M., Waidbacher, H., Straif, M., Mbaluka, R. K., Munguti, J. M. et Kyenze, M. M. (2006). Effects of partial and complete replacement of freshwater shrimp meal (Caridinea niloticus Roux) with a mixture of plant protein sources on growth performance of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.) in fertilized ponds. *Aquaculture Research*, 37(5):477–483.

[Litman *et al.*, 2005] Litman, G. W., Cannon, J. P. et Dishaw, L. J. (2005). Reconstructing immune phylogeny : new perspectives. *Nature Reviews Immunology*, 5(11):866–879.

[Lückstädt, 2008] Lückstädt, C. (2008). The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews : Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3(044).

[Lund *et al.*, 2011] Lund, I., Dalsgaard, J., Rasmussen, H. T., Holm, J. et Jokumsen, A. (2011). Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (Oncorhynchus mykiss) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. *Aquaculture*, 321(3-4):259–266.

[Lundin *et al.*, 1984] Lundin, K., Holmgren, S. et Nilsson, S. (1984). Peptidergic functions in the dogfish rectum. *Acta Physiol. Scand.*, 121(46A).

[Lygren *et al.*, 1999] Lygren, B., Sveier, H., Hjeltness, B. et Waagbø, R. (1999). Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to atlantic salmon (Salmo salar) for a short-term period. *Fish and Shellfish Immunology*, 9(2):95–107.

[Mancini *et al.*, 2017] Mancini, S., Medina, I., Iaconisi, V., Gai, F., Basto, A. et Parisi, G. (2017). Impact of black soldier fly larvae meal on the chemical and nutritional characteristics of rainbow trout fillets. *Animal*, pages 1–10.

[Marcouli *et al.*, 2006] Marcouli, P., Alexis, M., Andriopoulou, A. et Iliopoulou-Georgudaki, J. (2006). Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream Sparus aurata L. *Aquaculture Nutrition*, 12(1):25–33.

[Margheritis *et al.*, 2013] Margheritis, E., Terova, G., Cinquetti, R., Peres, A. et Bossi, E. (2013). Functional properties of a newly cloned fish ortholog of the neutral amino acid transporter B0AT1 (SLC6A19). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 166(2):285–292.

[Martin *et al.*, 2016] Martin, S. A. M., Dehler, C. E. et Król, E. (2016). Transcriptomic responses in the fish intestine. *Developmental and Comparative Immunology*, 64:103–117.

[Martin *et al.*, 2010] Martin, S. A. M., Douglas, A., Houlihan, D. F. et Secombes, C. J. (2010). Starvation alters livers transcriptome of the innate immune response in Atlantic salmon (Salmo salar). 11(1):418.

[Martínez Cruz *et al.*, 2012] Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A. et Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012:1–13.

[Matos *et al.*, 2012] Matos, E., Gonçalves, A., Bandarra, N., Colen, R., Nunes, M. L., Valente, L. M., Dinis, M. T. et Dias, J. (2012). Plant proteins and vegetable oil do not have detrimental effects on post-mortem muscle instrumental texture, sensory properties and nutritional value of gilthead seabream. *Aquaculture*, 358-359:205–212.

[Matsuda *et al.*, 2000] Matsuda, K., Kashimoto, K., Higuchi, T., Yoshida, T., Uchiyama, M., Shioda, S., Arimura, A. et Okamura, T. (2000). Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its relaxant activity in the rectum of a teleost, the stargazer, Uranoscopus japonicus. *Peptides*, 21(6):821–827.

[Médale *et al.*, 2013] Médale, F., Boucher, R. L. E., Quillet, E., Aubin, J., Panserat, S. et Ouest, A. (2013). Des aliments à base de végétaux pour les poissons d ' élevage. *Productions Animales*, 26(4):303–315.

[Médale et Kaushik, 2009] Médale, F. et Kaushik, S. (2009). Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. *Cahiers Agricultures*, 18(2):103–111.

[Meena *et al.*, 2013] Meena, D. K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S. C., Prusty, A. K., Singh, S. K., Akhtar, M. S., Behera, B. K., Kumar, K., Pal, A. K. et Mukherjee, S. C. (2013). Beta-glucan : An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(3):431–457.

[Merrifield *et al.*, 2010] Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøgwald, J., Castex, M. et Ringø, E. (2010). The cur-

rent status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2):1–18.

[Metian, 2009] Metian, A. G. J. T. M. (2009). Fishing for Feed or Fishing for Food : Increasing Global Competition for Small Pelagic Forage Fish. *AMBIO : A Journal of the Human Environment*, 38(6):294–302.

[Minjarez-Osorio *et al.*, 2016] Minjarez-Osorio, C., Castillo-Alvarado, S., Gatlin, D. M., González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M. et Rossi, W. (2016). Plant protein sources in the diets of the sciaenids red drum (Sciaenops ocellatus) and shortfin corvina (Cynoscion parvipinnis) : A comparative study. *Aquaculture*, 453:122–129.

[Mohapatra *et al.*, 2013] Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G. et Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management : A review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3):405–430.

[Montero *et al.*, 2005] Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Ginés, R. et Izquierdo, M. S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils : A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248(1):121–134.

[Mony et Duclos-Vallée, 2014] Mony, C. et Duclos-Vallée, P. J.-C. (2014). Les Fonctions du Foie. *www.centre-hepato-biliaire.org*.

[Morais *et al.*, 2012a] Morais, S., Edvardsen, R. B., Tocher, D. R. et Bell, J. G. (2012a). Transcriptomic analyses of intestinal gene expression of juvenile Atlantic cod (Gadus morhua) fed diets with Camelina oil as replacement for fish oil. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 161(3):283–293.

[Morais *et al.*, 2012b] Morais, S., Silva, T., Cordeiro, O., Rodrigues, P., Guy, D. R., Bron, J. E., Taggart, J. B., Bell, J. G. et Tocher, D. R. (2012b). Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (Salmo salar). *BMC Genomics*, 13(1).

[Moreira *et al.*, 2014] Moreira, N., Soares, S., Valente, L., Castro-Cunha, M., Cunha, L. et Guedes de Pinho, P. (2014). Effect of two experimental diets (protein and lipid vegetable oil blends) on the volatile profile of senegalese sole (*Solea senegalensis* kaup, 1858) muscle. *Food Chemistry*, 153:327–333.

[Mroz *et al.*, 2000] Mroz, Z., Jongbloed, A. W., Partanen, K. H., Vreman, K., Kemme, P. A. et Kogut, J. (2000). The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity/apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. *Journal of Animal Science*, 78(10):2622–2632.

[Mullally *et al.*, 1995] Mullally, M. M., O'callaghan, D. M., Fitzgerald, R. J., Donnelly, W. J. et Dalton, J. P. (1995). Zymogen Activation in Pancreatic Endoproteolytic Preparations and Influence on Some Whey Protein Hydrolysate Characteristics. *Journal of Food Science*, 60(2):227–233.

[Nandeesha *et al.*, 2002] Nandeesha, M. C., Gangadhara, B. et Manissery, J. K. (2002). Further studies on the use of mixed feeding schedules with plant- and animal-based diets for common carp Cyprinus carpio (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 33(14):1157–1162.

[Navarrete et Tovar-Ramrez, 2014] Navarrete, P. et Tovar-Ramrez, D. (2014). Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. *In* Hernandez-Vergara, M. et Perez-Rostro, C., éditeurs : *Sustainable Aquaculture Techniques*, pages 135–172. IntechOpen, instituto édition.

[Ng et Koh, 2017] Ng, W. K. et Koh, C. B. (2017). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 9(4):342–368.

[Norambuena *et al.*, 2015] Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J. A., Sharon, Y., Beard, A. et Turchini, G. M. (2015). Algae in fish feed : Performances and fatty acid metabolism in juvenile Atlantic Salmon. *PLoS ONE*, 10(4):1–17.

[Ohta et Flajnik, 2006] Ohta, Y. et Flajnik, M. (2006). IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28):10723–10728.

[Oliva-Teles, 2000] Oliva-Teles, A. (2000). Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International*, 8(6):477–492.

[Olli *et al.*, 1995] Olli, J. J., Krogdahl, . et Våbenø, A. (1995). Dehulled solvent-extracted soybean meal as a protein source in diets for atlantic salmon, *Salmo salar*l. *Aquaculture Research*, 26(3):167–174.

[Olsson *et al.*, 1999] Olsson, C., Aldman, G., Larsson, a. et Holmgren, S. (1999). Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout Oncorhynchus mykiss. *The Journal of experimental biology*, 202(Pt 2):161–70.

[Olsson *et al.*, 2008] Olsson, C., Holbrook, J. D., Bompadre, G., Jönsson, E., Hoyle, C. H., Sanger, G. J., Holmgren, S. et Andrews, P. L. (2008). Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (Danio rerio) by ghrelin and motilin. *General and Comparative Endocrinology*, 155(1):217–226.

[Øverland *et al.*, 2000] Øverland, M., Granli, T., Kjos, N. P., Fjetland, O., Steien, S. H. et Stokstad, M. (2000). Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 78(7):1875–1884.

[Overturf *et al.*, 2012] Overturf, K., Vallejo, R. L., Palti, Y., Barrows, F. T. et Parsons, J. E. (2012). Microarray analysis of differential utilization of plant-based diets by rainbow trout. *Aquaculture International*, 20(2):213–232.

[Ozorio, 2009] Ozorio, R. O. (2009). Dietary L-Carnitine Supplementation to Cultivated Fish : A Mini-Review. *Current Nutrition & Food Science*, 5(1):40–48.

[Palacín *et al.*, 2005] Palacín, M., Nunes, V., Font-Llitjós, M., Jiménez-Vidal, M., Fort, J., Gasol, E., Pineda, M., Feliubadaló, L., Chillarón, J. et Zorzano, A. (2005). The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 20(2):112–24.

[Pandey *et al.*, 2012] Pandey, G., Sharma, M. et Mandloi, A. K. (2012). Medicinal plants useful in fish diseases. *Plant Archives*, 12(1):1–4.

[Papatryphon et Soares, 2001] Papatryphon, E. et Soares, J. H. (2001). The effect of phytase on apparent digestibility of four practical plant feedstuffs fed to striped bass, Morone saxatilis. *Aquaculture Nutrition*, 7(3):161–167.

[Penn *et al.*, 2011] Penn, M. H., Bendiksen, E. A., Campbell, P. et Krogdahl, A. S. (2011). High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture*, 310(3-4):267–273.

[Pérez-Sánchez *et al.*, 2014] Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I. et Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture : A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3):133–146.

[Picariello *et al.*, 2012] Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F. et Ferranti, P. (2012). Novel mass spectrometry-based applications of the 'omic' : Sciences in food technology and biotechnology. *Food Technology and Biotechnology*, 50(3):286–305.

[Pohlenz *et al.*, 2012] Pohlenz, C., Buentello, A., Mwangi, W. et Gatlin, D. M. (2012). Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(5):762–768.

[Poston *et al.*, 1977] Poston, H. A., Riis, R. C., Rumsey, G. L. et Ketola, H. G. (1977). The effect of supplemental dietary amino acids, minerals and vitamins on salmonids fed cataractogenic diets. *Cornell Veterinarian*, 67(4):472–509.

[Qian *et al.*, 1996] Qian, H., Kornegay, E. T. et Conner, D. E. (1996). Adverse Effects of Wide Calcium :Phosphorus Ratios on Supplemental Phytase Efficacy for Weanling Pigs Fed Two Dietary Phosphorus Levels. *Journal of Animal Science*, 74(6):1288–1297.

[Qian *et al.*, 2014] Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q. et Zhong, G. (2014). RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics : a journal of integrative biology*, 18(2):98–110.

[R Cerezuela, 2011] R Cerezuela, J Meseguer, M. E. (2011). Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture : A Review. *Journal of Aquaculture Research & Development*, s1.

[Raa et Gildberg, 1982] Raa, J. et Gildberg, A. (1982). Fish Silage : A Reveiw.

[Rai *et al.*, 2012] Rai, A. K., Swapna, H. C., Bhaskar, N. et Baskaran, V. (2012). Potential of seafood industry byproducts as sources of recoverable lipids : Fatty acid composition of meat and nonmeat component of selected indian marine fishes. *Journal of Food Biochemistry*, 36(4):441–448.

[Ramudu et Dash, 2013] Ramudu, K. R. et Dash, G. (2013). A review on herbal drugs against harmfull pathogens in aquaculture. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 3(4):209–219.

[Rauta *et al.*, 2012] Rauta, P. R., Nayak, B. et Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study : A model for higher organisms. *Immunology Letters*, 148(1):23–33.

[Ravindran et Kornegay, 1993] Ravindran, V. et Kornegay, E. T. (1993). Acidification of weaner pig diets : A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(4):313–322.

[Refstie *et al.*, 2004] Refstie, S., Olli, J. J. et Standal, H. (2004). Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 239(1-4):331–349.

[Reite, 2005] Reite, O. B. (2005). The rodlet cells of teleostean fish : Their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(3):253–267.

[Reverter *et al.*, 2014] Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. et Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy : Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433:50–61.

[Ribeiro *et al.*, 2014] Ribeiro, L., Moura, J., Santos, M., Colen, R., Rodrigues, V., Bandarra, N., Soares, F., Ramalho, P., Barata, M., Moura, P., Pousão-Ferreira, P. et Dias, J. (2014). Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (Argyrosomus regius). *Aquaculture*, 447:116–128.

[Richard *et al.*, 2011] Richard, L., Surget, A., Rigolet, V., Kaushik, S. J. et Geurden, I. (2011). Availability of essential amino acids, nutrient utilisation and growth in juvenile black tiger shrimp, Penaeus monodon, following fishmeal replacement by plant protein. *Aquaculture*, 322-323:109–116.

[Riche *et al.*, 2004] Riche, M., Haley, D. I., Oetker, M., Garbrecht, S. et Garling, D. L. (2004). Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia Oreochromis niloticus (L.). *Aquaculture*, 234(1-4):657–673.

[Rico *et al.*, 2013] Rico, A., Phu, T. M., Satapornvanit, K., Min, J., Shahabuddin, A. M., Henriksson, P. J., Murray, F. J., Little, D. C., Dalsgaard, A. et Van den Brink, P. J. (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412-413:231–243.

[Ringø *et al.*, 2011] Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J. L. et Wadsworth, S. (2011). Use of Immunostimulants and Nucleotides in Aquaculture : A Review. *Journal of Marine Science : Research & Development*, 02(01).

[Ringø *et al.*, 2010a] Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R. E. et Mayhew, T. M. (2010a). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish : A review. *Aquaculture Research*, 41(4):451–467.

[Ringø *et al.*, 2010b] Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I. et Bakke, A. M. (2010b). Prebiotics in aquaculture : A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2):117–136.

[Ringø *et al.*, 2014] Ringø, E., Olsen, R. E., Jensen, I., Romero, J. et Lauzon, H. L. (2014). Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture : possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(4).

[Ringø et Song, 2016] Ringø, E. et Song, S. K. (2016). Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β-glucans) in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*, 22(1):4–24.

[Robert, 2014] Robert, M. (2014). *Développement d'hydrolysats pour l'alimentation des animaux d'aquaculture : caractérisation moléculaire et fonctionnelle.* Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie.

[Robert *et al.*, 2014] Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B. et Henry, J. (2014). Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*). *Journal of Biotechnology*, 186:30–37.

[Robert *et al.*, 2015] Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B. et Henry, J. (2015). Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochemistry*, 50(3):487–492.

[Rodiles *et al.*, 2015] Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., Cordero, M. L., Lall, S. P. et Alarcón, F. J. (2015). Tissue composition, blood biochemistry and histology of digestive organs in Senegalese sole (Solea senegalensis) juveniles fed diets containing different plant protein ingredients. *Aquaculture Nutrition*, 21(6):767–779.

[Rolland *et al.*, 2015] Rolland, M., Larsen, B. K., Holm, J., Dalsgaard, J. et Skov, P. V. (2015). Effect of plant proteins and crystalline amino acid supplementation on postprandial plasma amino acid profiles and metabolic response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture International*, 23(4):1071–1087.

[Rønnestad *et al.*, 2017] Rønnestad, I., Gomes, A. S., Murashita, K., Angotzi, R., Jönsson, E. et Volkoff, H. (2017). Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in Endocrinology*, 8(APR):1–24.

[Roos *et al.*, 2007] Roos, N., Wahab, M., Chamnan, C. et Thilsted, S. (2007). The role of fish in food-based strategies to combat vitamin a and mineral deficiencies in developing countries. *Journal of Nutrition*, 137(4):1106–1109.

[Rumsey *et al.*, 1994] Rumsey, G. L., Siwicki, A. K., Anderson, D. P. et Bowser, P. R. (1994). Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(3-4):323–339.

[Rurangwa *et al.*, 2015] Rurangwa, E., Sipkema, D., Kals, J., ter Veld, M., Forlenza, M., Bacanu, G. M., Smidt, H. et Palstra, A. P. (2015). Impact of a novel protein meal on the gastrointestinal microbiota and the host transcriptome of larval zebrafish Danio rerio. *Frontiers in Physiology*, 6(APR):1–16.

[Ryo *et al.*, 2010] Ryo, S., Wijdeven, R. H. M., Tyagi, A., Hermsen, T., Kono, T., Karunasagar, I., Rombout, J. H. W. M., Sakai, M., Kemenade, B. M.

L. V.-v. et Savan, R. (2010). Common carp have two subclasses of bonyfish specific antibody IgZ showing differential expression in response to infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(11):1183–1190.

[Sahlmann *et al.*, 2013] Sahlmann, C., Sutherland, B. J. G., Kortner, T. M., Koop, B. F., Krogdahl, Å. et Marie, A. (2013). Fish & Shell fi sh Immunology Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (Salmo salar L .) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(2):599–609.

[Sánchez-Muros *et al.*, 2014] Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G. et Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding : A review. *Journal of Cleaner Production*, 65:16–27.

[Santigosa *et al.*, 2011a] Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentín, J. M., Navarro, I., Pérez-Sánchez, J. et Gallardo, M. Á. (2011a). Plant oils' inclusion in high fish meal-substituted diets : Effect on digestion and nutrient absorption in gilthead sea bream (Sparus aurata L.). *Aquaculture Research*, 42(7): 962–974.

[Santigosa *et al.*, 2011b] Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentin, J. M., Pérez-Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S. et Gallardo, M. A. (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(1-4):146–154.

[Santigosa *et al.*, 2008] Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. et Gallardo, M. A. (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(1-4):68–74.

[Sarker *et al.*, 2012a] Sarker, M. S. A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y. et Yamamoto, Y. (2012a). Partial replacement of fish meal with plant protein sources using organic acids to practical diets for juvenile yellowtail, Seriola quinqueradiata. *Aquaculture Nutrition*, 18(1):81–89.

[Sarker *et al.*, 2012b] Sarker, M. S. A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y. et Yamamoto, Y. (2012b). Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to

plant protein-based diets on juvenile yellowtail, Seriola quinqueradiata Temminck et Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. *Aquaculture Research*, 43(4):538–545.

[Sarker *et al.*, 2016] Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K. P. et Coley, M. L. (2016). Towards sustainable aquafeeds : Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium sp.* improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS ONE*, 11(6):1–17.

[Saroglia *et al.*, 2012] Saroglia, T., Verri, G., Terova, A., Romano, A., Barca, P., Pisani, C. et Storelli, M. (2012). *The SoLute Carrier (SLC) Family Series in Teleost Fish*, pages 1–40. Wiley-Blackwell.

[Sealey *et al.*, 2011] Sealey, W. M., Gaylord, T. G., Barrows, F. T., Tomberlin, J. K., McGuire, M. A., Ross, C. et St-Hilaire, S. (2011). Sensory Analysis of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed Enriched Black Soldier Fly Prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(1):34–45.

[Serrano, 2005] Serrano, P. H. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 469:97 pp.

[Shahbazi *et al.*, 2002] Shahbazi, F., Holmgren, S., Larhammar, D. et Jensen, J. (2002). Neuropeptide Y effects on vasorelaxation and intestinal contraction in the Atlantic cod Gadus morhua. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 282(5):R1414–21.

[Shahbazi *et al.*, 1998] Shahbazi, F., Karila, P., Olsson, C., Holmgren, S., Conlon, J. M. et Jensen, J. (1998). Primary structure, distribution, and effects on motility of CGRP in the intestine of the cod Gadus morhua. *The American journal of physiology*, 275(1 Pt 2):R19–28.

[Sheikhzadeh *et al.*, 2012] Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Oushani, A. K. et Enferadi, M. H. N. (2012). Effects of Haematococcus Pluvialis Supplementation on Antioxidant System and Metabolism in Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2):413–419.

[Silva *et al.*, 2010] Silva, F. C., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M.-M., Kaushik, S. et Gatesoupe, F.-J. (2010). Influence of partial

substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306(1-4):233–237.

[Sissener *et al.*, 2013] Sissener, N. H., Hemre, G. I., Espe, M., Sanden, M., Torstensen, B. E. et Hevrøy, E. M. (2013). Effects of plant-based diets on glucose and amino acid metabolism, leptin, ghrelin and GH-IGF system regulation in Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture Nutrition*, 19(3):399–412.

[Sissener *et al.*, 2011] Sissener, N. H., Hemre, G.-i., Lall, S. P., Sagstad, A., Petersen, K., Williams, J., Rohloff, J. et Sanden, M. (2011). Are apparent negative effects of feeding GM MON810 maize to Atlantic salmon , Salmo salar , caused by confounding factors ? *British Journal of Nutrition*, (106):42–56.

[Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005] Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S. et Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 249(1-4):387–400.

[Smil, 2002] Smil, V. (2002). Eating meat : Evolution, patterns, and consequences. *Population and development review*, 28(December):599–639.

[Snyder *et al.*, 2012] Snyder, G. S., Gaylord, T. G., Barrows, F. T., Overturf, K., Cain, K. D., Hill, R. A. et Hardy, R. W. (2012). Effects of carnosine supplementation to an all-plant protein diet for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture*, 338-341:72–81.

[Song *et al.*, 2014] Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D. et Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture : A review. 40(1):40–48.

[Spolaore *et al.*, 2006] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. et Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87–96.

[Srichanun *et al.*, 2014] Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T. M., Krogdahl, Å. et Chotikachinda, R. (2014). Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer Bloch*) larvae. *Aquaculture*, 428-429:195–202.

[St-Hilaire *et al.*, 2007] St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Irving, S., Newton, L., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Hardy, R. W. et Sealey, W. (2007). Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(1):59–67.

[Storebakken *et al.*, 1999] Storebakken, T., Kvien, I. S., Shearer, K. D., Grisdale-Helland, B. et Helland, S. J. (1999). Estimation of gastrointestinal evacuation rate in atlantic salmon (Salmo salar) using inert markers and collection of faeces by sieving : Evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. *Aquaculture*, 172(3-4):291–299.

[Sudhagar *et al.*, 2018] Sudhagar, A., Kumar, G. et El-Matbouli, M. (2018). Transcriptome analysis based on RNA-Seq in understanding pathogenic mechanisms of diseases and the immune system of fish : A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1).

[Sugiura *et al.*, 2000] Sugiura, S. H., Babbitt, J. K., Dong, F. M. et Hardy, R. W. (2000). Utilization of fish and animal by-product meals in low-pollution feeds for rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31(7):585–593.

[Suleria *et al.*, 2015] Suleria, H. A. R., Osborne, S., Masci, P. et Gobe, G. (2015). Marine-based nutraceuticals : An innovative trend in the food and supplement industries. *Marine Drugs*, 13(10):6336–6351.

[Sunyer *et al.*, 2003] Sunyer, J. O., Boshra, H., Lorenzo, G., Parra, D., Freedman, B. et Bosch, N. (2003). Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 27(2):549–564.

[Suprayudi *et al.*, 2015] Suprayudi, M. A., Inara, C., Ekasari, J., Priyoutomo, N., Haga, Y., Takeuchi, T. et Satoh, S. (2015). Preliminary nutritional evaluation of rubber seed and defatted rubber seed meals as plant protein sources for common carp Cyprinus carpio L. juvenile diet. *Aquaculture Research*, 46(12):2972–2981.

[Sveier *et al.*, 2001] Sveier, H., Nordås, H., Berge, G. E. et Lied, E. (2001). Dietary inclusion of crystalline D- and L-methionine : Effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (Salmon salar L.). *Aquaculture Nutrition*, 7(3):169–181.

[Syahidah *et al.*, 2015] Syahidah, A., Saad, C. R., Daud, H. M. et Abdelhadi, Y. M. (2015). Status and potential of herbal applications in aquaculture : A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1):27–44.

[Tacchi *et al.*, 2012] Tacchi, L., Secombes, C. J., Bickerdike, R., Adler, M. A., Venegas, C., Takle, H. et Martin, S. A. (2012). Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (Salmo salar). *BMC Genomics*, 13(1):363.

[Tacon et Metian, 2008] Tacon, A. G. et Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds : Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4):146–158.

[Tacon *et al.*, 2011] Tacon, A. G. J., Hasan, M. R. et Metian, M. (2011). *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans : Trends and prospects*, volume 564.

[Tang *et al.*, 2008] Tang, H. G., Wu, T. X., Zhao, Z. Y. et Pan, X. D. (2008). Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea R.*). *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(9):684–690.

[Tanphaichitr *et al.*, 1971] Tanphaichitr, V., Horne, D. W. et Broquist, H. P. (1971). Lysine, a precursor of carnitine in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 246(20):6364–6366.

[Terova *et al.*, 2009] Terova, G., Corà, S., Verri, T., Rimoldi, S., Bernardini, G. et Saroglia, M. (2009). Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 294(3-4):288–299.

[Thilsted *et al.*, 2013] Thilsted, S. H., James, D., Toppe, J., Iddya, K. et Subasinghe, R. (2013). Maximizing the contribution of fish to human nutrition. *ICN2 Second International Confrence on Nutrition : better nutrition better lives*, (November):16.

[Tibaldi *et al.*, 2006] Tibaldi, E., Hakim, Y., Uni, Z., Tulli, F., de Francesco, M., Luzzana, U. et Harpaz, S. (2006). Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance,

nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 261(1):182–193.

[Tibaldi *et al.*, 1994] Tibaldi, E., Tulli, F. et Lanari, D. (1994). Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling sea bass (Dicentrarchus labrax). *Aquaculture*, 127(2-3):207–218.

[Tocher *et al.*, 2003] Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R. et Crampton, V. O. (2003). Effects of Dietary Vegetable Oil on Atlantic Salmon Hepatocyte Fatty Acid Desaturation and Liver Fatty Acid Compositions. *Lipids*, 38(7):723–732.

[Tonheim *et al.*, 2005] Tonheim, S. K., Espe, M., Hamre, K. et Rønnestad, I. (2005). Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321(1):19–34.

[Torstensen *et al.*, 2008] Torstensen, B. E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbø, R., Hemre, G. I., Fontanillas, R., Nordgarden, U., Hevrøy, E. M., Olsvik, P. et Berntssen, M. H. G. (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(1-4):193–200.

[Twibell et Wilson, 2004] Twibell, R. G. et Wilson, R. P. (2004). Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish, Ictalurus punctatus. *Aquaculture*, 236(1-4):539–546.

[Urán *et al.*, 2008] Urán, P. A., Gonçalves, A. A., Taverne-Thiele, J. J., Schrama, J. W., Verreth, J. A. J. et Rombout, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(6):751–760.

[Valente *et al.*, 2016] Valente, L. M., Cabral, E. M., Sousa, V., Cunha, L. M. et Fernandes, J. M. (2016). Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. *Aquaculture*, 453:77–85.

[van den Ingh *et al.*, 1991] van den Ingh, T. S. G. A. M., Krogdahl, Å., Olli, J. J., Hendriks, H. G. C. J. M. et Koninkx, J. G. J. F. (1991). Effects of

soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (Salmo salar) : a morphological study. *Aquaculture*, 94(4):297–305.

[Van Hai, 2015] Van Hai, N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture : A review. *Aquaculture*, 446:88–96.

[Vandenberg *et al.*, 2012] Vandenberg, G. W., Scott, S. L. et De La Noüe, J. (2012). Factors affecting nutrient digestibility in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed a plant protein-based diet supplemented with microbial phytase. *Aquaculture Nutrition*, 18(4):369–379.

[Vaseeharan et Thaya, 2014] Vaseeharan, B. et Thaya, R. (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants : An alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(3):1079–1091.

[Vielma et Lall, 1997] Vielma, J. et Lall, S. P. (1997). Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 3(4):265–268.

[Vigliano *et al.*, 2006] Vigliano, F. A., Aleman, N., Quiroga, M. I. et Nieto, J. M. (2006). Ultrastructural characterization of gills in juveniles of the Argentinian silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei : Atheriniformes). *Journal of Veterinary Medicine Series C : Anatomia Histologia Embryologia*, 35(2):76–83.

[Vilhelmsson *et al.*, 2004] Vilhelmsson, O. T., Martin, S. A. M., Médale, F., Kaushik, S. J. et Houlihan, D. F. (2004). Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *British Journal of Nutrition*, 92(01):71.

[Vogel et Marcotte, 2012] Vogel, C. et Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13:227.

[Waagboø *et al.*, 2010] Waagboø, R., Trösse, C., Koppe, W., Fontanillas, R. et Breck, O. (2010). Dietary histidine supplementation prevents cataract development in adult Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, in seawater. *British Journal of Nutrition*, 104(10):1460–1470.

[Walton *et al.*, 1984a] Walton, M., Cowey, C. et Adron, J. (1984a). The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British journal of nutrition*, 52(01):115–122.

[Walton *et al.*, 1984b] Walton, M. J., Cowey, C. B. et Adron, J. W. (1984b). The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 52:115–122.

[Wang *et al.*, 2017] Wang, J., Yan, X., Lu, R., Meng, X. et Nie, G. (2017). Peptide transporter 1 (PepT1) in fish : A review. *Aquaculture and Fisheries*, 1(5):193–206.

[Wang *et al.*, 2016] Wang, P., Wang, J., Su, Y. Q., Mao, Y., Zhang, J. S., Wu, C. W., Ke, Q. Z., Han, K. H., Zheng, W. Q. et Xu, N. D. (2016). Transcriptome analysis of the *Larimichthys crocea* liver in response to *Cryptocaryon irritans*. *Fish and Shellfish Immunology*, 48:1–11.

[Watts *et al.*, 2017] Watts, J. E., Schreier, H. J., Lanska, L. et Hale, M. S. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture : Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6):1–16.

[Welker *et al.*, 2016] Welker, T., Barrows, F., Overturf, K., Gaylord, G. et Sealey, W. (2016). Optimizing zinc supplementation levels of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed practical type fishmeal- and plant-based diets. *Aquaculture Nutrition*, 22(1):91–108.

[Weng et Chen, 2010] Weng, T. M. et Chen, M. T. (2010). Changes of Protein in Natto (a fermented soybean food) Affected by Fermenting Time. *Food Science and Technology Research*, 16(6):537–542.

[Wilson, 1989] Wilson, R. (1989). Amino acids and proteins. *In* Halver, J., éditeur : *Fish Nutrition*, pages 112–151. Academic Press, Inc, San Diego.

[Wu *et al.*, 2016] Wu, N., Song, Y. L., Wang, B., Zhang, X. Y., Zhang, X. J., Wang, Y. L., Cheng, Y. Y., Chen, D. D., Xia, X. Q., Lu, Y. S. et Zhang, Y. A. (2016). Fish gut-liver immunity during homeostasis or inflammation revealed by integrative transcriptome and proteome studies. *Scientific Reports*, 6(October):1–17.

[Wu, 1995] Wu, R. (1995). The environmental impact of marine fish culture : Towards a sustainable future. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12):159–166.

[Yang *et al.*, 2012] Yang, S. D., Liu, F. G. et Liou, C. H. (2012). Effects of dietary l-carnitine, plant proteins and lipid levels on growth performance, body composition, blood traits and muscular carnitine status in juvenile silver perch (Bidyanus bidyanus). *Aquaculture*, 342-343(1):48–55.

[Yazawa *et al.*, 2008] Yazawa, R., Cooper, G. A., Hunt, P., Beetz-Sargent, M., Robb, A., Conrad, M., McKinnel, L., So, S., Jantzen, S., Phillips, R. B., Davidson, W. S. et Koop, B. F. (2008). Striking antigen recognition diversity in the atlantic salmon t-cell receptor α/δ locus. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3):204–212.

[Ye *et al.*, 2006] Ye, J., Fang, L., Zheng, H., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Li, R., Bolund, L. et Wang, J. (2006). WEGO : A web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.).

[Young *et al.*, 2010] Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K. et Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq : accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2).

[Yousefian et Amiri, 2009] Yousefian, M. et Amiri, M. S. (2009). A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology*, 8(25):7313–7318.

[Yun *et al.*, 2012] Yun, B., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Qi, G. et Luo, Y. (2012). Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (Scophthalmus maximus L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture*, 324-325:85–91.

[Yun *et al.*, 2011] Yun, B., Mai, K., Zhang, W. et Xu, W. (2011). Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (Scophthalmus maximus L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture*, 319(1-2).

[Yun *et al.*, 2014] Yun, B., Xue, M., Wang, J., Sheng, H., Zheng, Y., Wu, X. et Li, J. (2014). Fishmeal can be totally replaced by plant protein blend at two protein levels in diets of juvenile Siberian sturgeon, Acipenser baerii Brandt. *Aquaculture Nutrition*, 20(1):69–78.

[Zambonino Infante *et al.*, 1997] Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L. et Peres, A. (1997). Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of nutrition*, 127(4):608–614.

[Zamora-Sillero *et al.*, 2018] Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A. et Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties : an Overview. *Marine Biotechnology*, 20(2):118–130.

[Zatylny-Gaudin *et al.*, 2016] Zatylny-Gaudin, C., Cornet, V., Leduc, A., Zanuttini, B., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Garderes, J., Kraut, A., Couté, Y. et Henry, J. (2016). Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia officinalis : Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *Journal of Proteome Research*, 15(1):48–67.

[Zhang *et al.*, 2016] Zhang, H., Yi, L., Sun, R., Zhou, H., Xu, W., Zhang, W. et Mai, K. (2016). Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker Larimichthys crocea (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. *Aquaculture*, 453:147–153.

[Zhang *et al.*, 2012] Zhang, Y., Øverland, M., Shearer, K. D., Sørensen, M., Mydland, L. T. et Storebakken, T. (2012). Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by a mixture model. *Aquaculture*, 360-361:25–36.

[Zheng *et al.*, 2014] Zheng, K., Xu, T., Qian, C., Liang, M. et Wang, X. (2014). Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) fed high plant protein diets. *Aquaculture Nutrition*, 20(4):372–380.

[Zhou et Yue, 2010] Zhou, Q. C. et Yue, Y. R. (2010). Effect of replacing soybean meal with canola meal on growth, feed utilization and haematological indices of juvenile hybrid tilapia, Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus. *Aquaculture Research*, 41(7):982–990.

[Zhou et Wang, 2012] Zhou, X. et Wang, Y. (2012). *Probiotics in Aquaculture – Benefits to the Health , Technological Applications and Safety*, chapitre Probiotics, pages 215–226. InTech Europe, Rijeka.

Résumé

L'aquaculture est en pleine expansion et fournit aujourd'hui la moitié des produits aquatiques destinés à la consommation humaine. Elle constitue ainsi un secteur clé pour le maintien et l'amélioration de la sécurité alimentaire dans le monde. Le développement de l'aquaculture est étroitement lié à celui des formules alimentaires. Ces dernières années, la part des farines de poisson dans la formulation des aliments a particulièrement diminué au profit des farines d'origine végétale pour répondre aux nombreuses contraintes économiques et environnementales. Néanmoins, ces matières premières sont moins adaptées aux besoins nutritionnels des poissons carnivores et leur utilisation peut entraîner une baisse des performances de croissance et d'efficacité alimentaire. L'ajout d'additifs et d'ingrédients fonctionnels devient alors indispensable. Les hydrolysats protéiques issus des co-produits de la pêche et de l'aquaculture sont des ingrédients à fort potentiel appétence, nutritionnel et bioactif. Ces ingrédients sont des mélanges complexes riches en peptides hydrolytiques et en acides aminés libres, mais dont la composition varie en fonction de l'origine de la matière première et des paramètres d'hydrolyse appliqués lors de leur fabrication. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé et mis en pratique des outils permettant d'approfondir la caractérisation structurale et les propriétés fonctionnelles des hydrolysats de protéines. Dans un premier temps, nous avons développé une méthode analytique basée sur une normalisation des échantillons suivie d'une détermination de l'abondance et de la richesse en peptides par chromatographie d'exclusion stérique et chromatographie liquide couplée à la spéctrométrie de masse de type electro-spray, respectivement. Les résultats présentés sous forme d'un diagramme 2D permettant de classer et comparer facilement les hydrolysats de protéines de forme galénique, d'origine et de process différents. Nous avons également développé un outil *in vitro* sur l'intestin de bar européen, *Dicentrarchus labrax*, permettant de déterminer les activités myotropes des hydrolysats. Nous avons pu notamment démontrer que l'hydrolysat de crevettes possède une plus forte activité myotrope que les hydrolysats de poissons et que cette activité est portée par un pentapeptide KNPEQ clivé à partir de l'hémocyanine lors du process d'hydrolyse appliqué sur les co-produits de crevette. Enfin, dans un second temps, un conditionnement alimentaire de 65 jours a été conduit chez le bar européen nourri avec un aliment pauvre en farine de poisson supplémenté en hydrolysat de différentes origines et couplé à une analyse d'expression génique (approche en RNA-Seq Illumina). Cette étude a permis de montrer que les hydrolysats de protéines appliqués sur un aliment faible en farine de poisson (5%) sont capables de restaurer des performances de croissance équivalentes à celles d'un régime contenant 20% de farine de poisson mais qu'ils portent par ailleurs des propriétés fonctionnelles spécifiques. Il a également été montré que le mélange des deux hydrolysats permet de moduler les transcriptomes intestinal et hépatique de façon plus profonde que lorsque que les hydrolysats sont utilisés séparément. Ces résultats confirment l'intérêt des hydrolysats de protéines pour la formulation d'aliment à faible teneur en farines de poisson et apportent de nouveaux outils de caractérisation de ces ingrédients complexes, qui seront utiles pour leur optimisation et leur standardisation ainsi que pour la compréhension de leurs mécanismes d'action chez les poissons.

By-product hydrolysates for aquafeed : structural standardization and functional optimization.

Abstract

Aquaculture is a key sector for supporting and improving the food security worldwide. The global production of farmed fish and shrimp has grown dramatically over the past decades and now contributes to half of the aquatic products intended for human consumption. Aquaculture will require feeds to support its growth but availability of some raw materials such as fish meal are limited. The use of fish meal in aquafeed has particularly declined in favor of plant protein sources to fit with economic and environmental constraints. But plant proteins do not meet perfectly the nutritional requirements of carnivorous fish and their utilization often results in lower growth and feed performances. Protein hydrolysates manufactured from fishing and aquaculture co-products are ingredients with a high palatable, nutritional and bioactive potential. They are rich in hydrolytic peptides and free amino acids, but they are complex mixtures whose composition could vary according to raw material origin and hydrolysis parameters. During this PhD study, we developed and implemented tools to further characterize the structure and functional properties hydrolysates. On a first step, we developed a fast methodological tool based on sample standardization, followed by the determination of the abundance and richness of peptides using size exclusion chromatography and liquid chromatography coupled to electro-spray mass spectrometry, respectively. We merged the results into a 2D diagram that made it easy to classify and compare hydrolysates having different galenic, origin and process. We also developed a tool on isolated intestine from European seabass (*Dicentrarchus labrax*) to rank protein hydrolysates according to their myotropic property. We demonstrated that shrimp hydrolysate showed a higher myotropic activity than fish hydrolysates and that this activity was carried by a unique pentapeptide KNPEQ produced by the enzymatic clivage of haemocyanin during the hydrolysis process applied on shrimp co-products. On a second step, a 65-day feeding trial was conducted in European seabass fed a low fish meal diet supplemented with protein hydrolysates of different origin, and coupled to a study of the intestine and liver transcriptomic response (Illumina RNA sequencing). It has been shown that protein hydrolysates included in a low fish meal diet (5%) restored growth performances to the same level than a diet containing 20% of fishmeal, and that they exhibited very specific functional properties. These results showed that a mixture of two hydrolysates impacted more deeply the intestine and liver transcriptomes than hydrolysate tested alone. This phD study confirmed that protein hydrolysates are very interesting candidates for formulating low fish meal feed and offer new tools for characterizing such complex ingredients, which will be useful to optimize and standardize protein hydrolysate while understanding their mechanisms of action in fish.

Mots clés : Pisciculture, Hydrolysat protéique, Transcriptomique, Peptidomique, Dicentrarchus labrax, Performances de croissance, Physiologie digestive.

UMR BOREA Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques MNHM, UCBN, CNRS-7208, IRD-207