

Université de Caen Basse-Normandie

Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Thèse de doctorat

Présentée et soutenue le 11 décembre 2014

Par

Marie Robert

Pour obtenir le

Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : Aspect moléculaire et cellulaire de la Biologie

Développement d'hydrolysats pour l'alimentation des animaux d'aquaculture : caractérisation moléculaire et fonctionnelle

Directeur de thèse : Joël Henry

Jury

Mr Vianney Pichereau	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Mme Sandrine Skiba-Cassy	Chargée de Recherche INRA, HDR	Rapporteur
Mr Jean-Yves Toullec	Maître de Conférences, UPMC, HDR	Examinateur
Mr Pascal Sourdaine	Professeur, Université de Caen	Examinateur
Mme Céline Zatylny-Gaudin	Maître de Conférences, Université de Caen, HDR	Examinateur
Mr Joël Henry	Professeur, Université de Caen	Directeur de thèse
Mr Vincent Fournier	PhD, Responsable du servive R&D de Diana SPF Aquativ	Examinateur invité

Université de Caen Basse-Normandie

Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Thèse de doctorat

Présentée et soutenue le 11 décembre 2014

Par

Marie Robert

Pour obtenir le

Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : Aspect moléculaire et cellulaire de la Biologie

Développement d'hydrolysats pour l'alimentation des animaux d'aquaculture : caractérisation moléculaire et fonctionnelle

Directeur de thèse : Joël Henry

Jury

Mr Vianney Pichereau	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Mme Sandrine Skiba-Cassy	Chargée de Recherche INRA, HDR	Rapporteur
Mr Jean-Yves Toullec	Maître de Conférences, UPMC, HDR	Examinateur
Mr Pascal Sourdaine	Professeur, Université de Caen	Examinateur
Mme Céline Zatylny-Gaudin	Maître de Conférences, Université de Caen, HDR	Examinateur
Mr Joël Henry	Professeur, Université de Caen	Directeur de thèse
Mr Vincent Fournier	PhD, Responsable du servive R&D de Diana SPF Aquativ	Examinateur invité

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE), dans l'UMR Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) à l'Université de Caen Basse-Normandie.



Cette thèse a été financée par le Conseil Régional de Basse-Normandie et par la société Diana-Aquativ (Groupe Symrise).



Avant-propos

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Joël Henry, Professeur à l'Université de Caen Basse-Normandie, pour la qualité de son encadrement scientifique et le partage de ses connaissances. Je souhaite aussi le remercier pour sa grande disponibilité, ses conseils et son soutien au quotidien.

J'exprime ma sincère gratitude à Céline Zatylsny-Gaudin, Maître de Conférences à l'Université de Caen Basse-Normandie, pour son implication dans mon travail et sa grande disponibilité. Ses précieux conseils et ses encouragements m'ont beaucoup apporté et m'ont permis de mener à bien ce travail dans les meilleures conditions. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement Vincent Fournier, responsable R&D chez Aquativ, pour m'avoir confié ce projet de recherche et pour m'avoir permis de le mener dans d'excellentes conditions. Merci de m'avoir offert la possibilité de voir et de faire tant de choses.

Je tiens à remercier le Professeur Pascal Sourdaine pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire PE2M puis BIOMÉA et maintenant BOREA et pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Vianney Pichereau, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, et à Sandrine Skiba-Cassy, Chargée de Recherche à l'INRA de St Péé sur Nivel, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Jean-Yves Toullec pour l'intérêt qu'il porte à mon travail et pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Pascal Favrel, Professeur à l'Université de Caen Basse-Normandie, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Je remercie infiniment Benoît Bernay, Ingénieur de Recherche sur la plateforme PROTEOGEN, pour les nombreuses heures qu'il a passées à analyser mes hydrolysats.

Je remercie également Magali Hervy, Ingénieur de Recherche chez Aquativ, pour s'être si bien occupée de « mes petits poissons ». Mes séjours à Brest ont toujours été très agréables, merci pour ton accueil et pour ton aide précieuse !

Je tiens à remercier vivement Erwan Corre et Gildas Le Corguillé de la plateforme ABiMS pour leur traitement bioinformatique de mes données transcriptomiques, plus qu'indispensable pour mon travail de thèse.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des membres du Laboratoire BIOMÉA, professeurs, maîtres de conférences ainsi que le personnel technique et administratif pour ces trois années passées parmi vous.

Et particulièrement, Béatrice Adeline pour m'avoir initiée à l'histologie, toujours dans une ambiance détendue et musicale, et pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée.

Christophe Roger, pour son sourire permanent et sa bonne humeur communicative, tu trouves toujours une solution à tout !

Merci à Sandra et à Fabienne pour nous faciliter la vie au quotidien ! Et à Marie-Pierre Dubos pour sa participation au bon déroulement des manips au laboratoire.

Evidemment un grand MERCI à la << Sepia Team >> Valérie, Baptiste, Max et Alex pour tous ces moments que l'on a passés ensemble ! J'ajouterais bien sûr, Benoît et Marion-de-la-Plateforme pour toutes ses conversations, parfois de geek (souvent de geek) mais toujours sympathiques autour d'un café ! Bonne chance aux petits nouveaux, vous savez ce qu'il vous reste à faire !! Un merci très spécial pour mon Tac !! On a partagé beaucoup de choses (parfois peut-être un peu trop !), je n'oublierai pas tous les excellents moments que l'on a passés au labo et en dehors, ces trois années (et demi) n'auraient pas été pareilles sans toi !!

Je remercie de tout cœur mes collègues du labo qui ont rendu ces trois années si particulières ! J'ai tant de choses à dire que je pourrai écrire un roman ! Je pense à Alex et ses penchants naturalistes (tu m'as beaucoup manqué pendant ma rédaction !), Maxou (tes talents artistiques –en tout genre- m'ont toujours épater !), Martin (t'as essayé de m'apprendre à courir vite mais j'ai jamais réussi !), Max (tu m'auras bien fait rire !!), Pauline (tu es une hôte hors pair !!), Adrien (je me rappellerai toujours des soirées tarots), Michael (on sait que tu fais semblant d'être désagréable, va !), Antoine (chercheur hors pair de vidéos culturelles), Yanouk, Cécile, Anne-Flore, Georges, Nico, Charles, Steph, Jerem, Jérôme, le petit Martin, Laetitia, Alexis, Christiane, Manu, Camille, Rémi, Virginie...

Et bien sûr, merci à toutes ces petites choses qui rendirent ces années inoubliables, alors en vrac, MERCI à nos essais cinématographiques, la crème fraîche, tous les Edward, Fauve, l'Abbaye aux Hommes, le Carnaval, le Molksky, la west coast, Georges RR Martin (faut écrire la suite maintenant !), les sushi, le justaucorps mauve, et celui à rayures, la maison de l'étudiant, les hiboux de la forêt lointaine, Vente Privée, Niagara, le Feuuuu, radio Bazarnaom, Ciel mon doctorat, au chocolat, Damon S., la voie de google, le fameux cocktail Caennais (ou pas !), la Bretagne, les Cobayes, les crêpes, la tarte tatin, la soupe angevine, la Belgique, les crocodiles les tortues et tout le reste, les voisins du dessus, rue des jardins, le sing star, Gouville, les moules-frites, et évidemment le BéaBar !!

Je ne terminerai pas sans remercier mes proches. Ma famille de Caen, ma famille de cœur, en particulier Françoise, Catherine Elodie et Elsa pour leur accueil en terre normande et leur gentillesse qui m'ont permis de me sentir comme chez moi !! Lulu et Coco, mes amies de toujours ! Et bien sûr, je remercie du fond du cœur mes parents pour leur soutien inconditionnel et leur confiance durant toutes ces années, je n'en serai pas là sans vous !

Enfin, Thomas, toi qui m'as toujours connue << comme ça >>, tu n'as pas idée comme les moments que l'on a passés ensemble m'ont été précieux. Merci pour cet espace << thèse-free >> que tu as préservé et bien sûr pour tout le reste !

Table des matières

I Introduction générale	1
1 L'aquaculture :	
Contexte socio-économique	3
1.1 L'aquaculture : une activité multi-facettes	3
1.2 Les enjeux socio-économiques de l'aquaculture	6
1.3 Les impacts environnementaux de l'aquaculture	11
1.3.1 L'aquaculture : une activité génératrice de rejets polluants	11
1.3.2 Impact sur les populations animales locales	14
1.3.3 Des liens étroits avec la pêche	15
1.3.4 Vers une aquaculture durable	18
2 L'alimentation en aquaculture	19
2.1 L'aliment aquacole : définition et évolution	19
2.1.1 L'aliment aquacole	19
2.1.2 Des aliments traditionnels aux aliments hautement énergétiques	22
2.1.3 Les farines et huiles de poisson	23
2.2 Introduction des farines d'origine végétale dans l'alimentation des poissons carnivores	25
2.2.1 Vers l'utilisation des farines d'origine végétale	25
2.2.2 Composition des farines d'origine végétale	28
2.2.3 Conséquences sur les poissons carnivores	29
2.3 Vers de nouveaux ingrédients et matières premières	32
2.3.1 Vers de nouvelles sources de protéines	32
2.3.2 Vers des ingrédients capables d'améliorer le bien-être et la santé animal .	34
3 Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique	37
3.1 Définition	37
3.1.1 Les co-produits et leur valorisation	37
3.1.2 L'hydrolyse enzymatique	39
3.2 Intérêt nutritionnel des hydrolysats	40
3.2.1 Composition des hydrolysats	40
3.2.2 Applications en alimentation humaine	42

3.2.3	Applications en aquaculture	43
3.3	Intérêt fonctionnel	43
3.3.1	Les peptides bioactifs	43
3.3.2	Régulation du système immunitaire	44
3.3.3	Régulation du système cardio-vasculaire	46
3.3.4	Autres bioactivités	47
4	Éléments de physiologie digestive	49
4.1	Anatomie du système digestif	49
4.1.1	Structure générale du système digestif	49
4.1.2	Histologie	52
4.2	Digestion et absorption des protéines	55
4.2.1	Digestion des protéines	55
4.2.2	Absorption	56
4.2.3	Digestion intra-cellulaire et passage dans le sang	57
4.3	Besoins nutritionnels des poissons	58
4.3.1	Besoins énergétiques	58
4.3.2	Besoins protéiques	60
5	Modèle d'étude :	
	Le bar <i>Dicentrarchus labrax</i>	63
5.1	Présentation générale	63
5.1.1	Position systématique	63
5.1.2	Aire de répartition	64
5.1.3	Éléments d'anatomie générale du bar commun	64
5.1.4	Biologie	65
5.2	Aquaculture du bar	66
6	Objectifs de la thèse	69
II	Matériels et méthodes	71
1	Matériels et méthodes	73
1.1	Approches peptidomique et protéomique	73
1.1.1	Extraction et pré-purification des peptides	73
1.1.2	HPLC	73
1.1.3	Extraction de protéines	74
1.1.4	Electrophorèse préparative (OFFGEL)	74
1.1.5	Réduction, alkylation et digestion trypsique	75

1.1.6	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS Page)	75
1.1.7	Spectrométrie de masse	76
1.2	Approche transcriptomique	77
1.2.1	Extraction des ARN totaux	77
1.2.2	Traitements à la DNase	78
1.2.3	Rétrotranscription des ARN en ADNc	78
1.2.4	Électrophorèse sur gel d'agarose	78
1.2.5	PCR quantitative en temps réel	78
1.2.6	Séquençage Illumina	80
1.3	Approche fonctionnelle	82
1.3.1	Tests d'activités antibactériennes	82
1.3.2	Test de conditionnement alimentaire <i>in vivo</i>	83
1.3.3	Histologie	85

III Caractérisation moléculaire des hydrolysats de crevette et de tilapia 87

1	Introduction	89
2	Démarche expérimentale	95
3	Chapitre 1 Caractérisation moléculaire de l'hydrolysat de crevette par une approche peptidomique associée à une approche transcriptomique	99
4	Chapitre 2 Caractérisation moléculaire de l'hydrolysat de tilapia par une approche peptidomique associée à une approche transcriptomique	109
5	Chapitre 3 Les co-produits de tilapia : protéome et peptides hydrolytiques	121
6	Conclusion	141

IV Caractérisation fonctionnelle des hydrolysats chez le bar commun *Dicentrarchus labrax* 143

1	Introduction	145
2	Démarche expérimentale	153

3 Chapitre 1 :	
Performances de croissance des deux hydrolysats et impact sur la physiologie digestive du bar commun <i>Dicentrarchus labrax</i>	155
4 Chapitre 2 :	
Impact des hydrolysats sur l'intégrité de la muqueuse intestinale et le système immunitaire inné du bar commun <i>Dicentrarchus labrax</i>	173
4.1 Introduction	175
4.2 Résultats	177
4.2.1 Etude histologique de l'intestin	177
4.2.2 Etude de l'expression de marqueurs de l'immunité	180
4.3 Discussion	185
4.3.1 Impact de l'alimentation sur le développement et la qualité de la muqueuse intestinale du bar commun	185
4.3.2 Impact de l'alimentation sur le système immunitaire inné du bar commun	186
4.4 Conclusion	187
5 Conclusions	189
V Conclusions générales et perspectives	191
VI Bibliographie	199

Table des figures

1	Les différents types d'aquaculture. A : Élevage piscicole dans le Péloponèse, Grèce (Dimitri Messinis). B : Algoculture C : Bassins d'élevage de crevettes, baie de Phang Nga, Thailande (Yann Arthus Bertrand). D : Parcs à huîtres, Ile de Ré, France.	4
2	Évolution de la production mondiale en produits de la mer issus de captures ou de l'aquaculture, exprimée en millions de tonnes (FAOSTAT)	6
3	Taux de conversion moyen des principaux animaux d'élevage	8
4	Répartition de la production aquacole mondiale en fonction des continents (A) et des espèces (B). Données de la FAO (2012).	8
5	Principales espèces produites en aquaculture dans le monde en 2012 (FAOSTAT)	9
6	Production aquacole des pays européens en 2012 exprimée en tonnes (FAOSTAT)	10
7	Production aquacole française en 2012 (FAOSTAT)	11
8	Les impacts environnementaux de l'aquaculture en milieu ouvert (Ocean Conservancy)	12
9	A : Consommation d'aliments aquacoles B : Répartition de la consommation de farines de poisson entre les principales espèces d'élevage en 2008 (Données FAO, 2012).	16
10	Principe de fabrication d'un granulé	20
11	Répartition de la consommation d'aliments aquacoles entre les principales espèces d'élevage en 2008 (Données FAO, 2012)	21
12	Développement des aliments aquacoles pour la salmoniculture en Norvège (Source : "Demand and supply of feed ingredient" (Tacon <i>et al.</i> , 2011))	22
13	Tonnages des principaux "poissons fourages" provenant de capture en 2012". FAOSTAT	24
14	Répartition de la consommation de farines de poisson entre les principales espèces d'élevage en 2008 (Données FAO, 2012)	25
15	Evolution du taux d'incorporation des farines de poisson dans les aliments destinés aux principales espèces aquacoles	26
16	Evolution du prix à la tonne des farines de poisson depuis 1998 (Indexmundi) . .	26
17	Les produits dérivés des co-produits de poisson (d'après Guerard, 2004)	37
18	Voies de valorisation des co-produits (Source : IFREMER)	38

19	Principe de fabrication des hydrolysats protéiques	39
20	Les classes de peptides bioactifs	44
21	Classement des peptides antibactériens selon leur structure secondaire et leur composition en acides aminés	45
22	Comparaison de l'anatomie interne d'un poisson perciforme, le bar commun, d'un salmonidé, la truite arc-en-ciel et d'un cyprinidé, la Brême (Source : Atlas anatomique d'ichtyologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes)	50
23	Représentation schématique de 4 types de systèmes digestifs (D' après Smith, 1989)	51
24	Représentation du repliement de l'intestin chez la carpe commune, <i>C. carpio</i> (Villanueva <i>et al.</i> , 1997)	52
25	Coupe histologique d'un intestin de bar commun : organisation des tuniques . .	53
26	Organisation histologique de l'intestin. Clichés de microscopie optique au grossissement x4 et x40 de la partie proximale (A et B), moyenne (C et D) et distale (E et F) de l'intestin. Clichés de MET mettant en évidence deux cellules caliciformes entourées d'entérocytes (H), un agrandissement des micro-villosités des entérocytes (G) une cellule sécrétrice (I), une "rodlet cell" (K) et deux lymphocytes (L)	54
27	Représentation schématique des mécanismes d'absorption des acides aminés et des di/tri-peptides dans les entérocytes (D'après Palacín <i>et al.</i> , 2005)	58
28	Distribution de l'énergie alimentaire chez les poissons (Guillaume <i>et al.</i> , 1999) .	59
29	Les 10 acides aminés indispensables chez les poissons (D'après Guillaume <i>et al.</i> , 1999)	61
30	Bar ou loup de mer (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	63
31	Aire de répartition du bar commun, <i>D. labrax</i> . (Source : www.fishbase.org) . .	64
32	Morphologie externe du bar (<i>D. labrax</i>)	64
33	Régime alimentaire des post-larves et juvéniles (A) et des adultes (B) <i>D. labrax</i> .	65
34	Tonnages français, européen et mondial de bar commun <i>D. labrax</i> (Source : FAOSTAT)	66
35	Principe de l'élevage intensif du bar commun (D'après la FAO)	68
36	Dispositif d'électrophorèse préparative, (3100 OFFGEL fractionnator, Agilent) .	75
37	Structure d'élevage de l'IFREMER de Brest	83

38	Vue globale de la production de <i>L. vannamei</i> (A) et <i>O. niloticus</i> (C). Les cartes du monde mettent en évidence les principaux pays producteurs de ces deux espèces (source www.FAO.org). Les productions mondiales issues de l'aquaculture des crevettes penéides et des tilapia depuis les années 70s sont illustrées dans les deux graphiques en B et D (source : FAOSTAT)	90
39	Principe du MALDI-TOF/TOF (A) et de l'ESI-MS/MS (B) illustré d'après Même (2010) et Canon (2010)	94
40	L'électrophorèse préparative OFFGEL. A : Dispositif Agilent Fractionnator 3100. B : Schéma représentant le principe de séparation des peptides/protéines en fonction de leur point isoélectrique.	95
41	: Approche expérimentale mise en œuvre pour l'identification des peptides hydrolytiques composant les hydrolysats.	96
42	Approche expérimentale mise en œuvre pour l'étude du protéome des co-produits de tilapia	98
43	Séquence et structure de PepT1. (A) Séquence protéique de PepT1 chez le bar commun, les séquences en vert représentent les 12 domaines transmembranaires (D'après Terova, 2009). (B) Représentation 3D du transporteur PepT1 chez les mammifères (Rubio-Aliaga et Daniel, 2002).	147
44	Alignement des séquences des deux transporteurs d'acides aminés ciblés dans ce travail : le transporteur de la taurine et un transporteur de la famille des Y+L amino acid transporter. Les séquences partielles d'ARNm codant pour ces transporteurs sont disponibles dans SIGEN@E(TauT : FM014367; CaaT : FM005770), les séquences chez <i>S. salar</i> (TauT : AAM90737.1; CaaT : NP_001133512.1), <i>D. rerio</i> (TauT : AAX55331.1; CaaT : NP_001032648.1), et <i>H. sapiens</i> (TauT : AAC50443.1; CaaT : NP_001119578.1), sont disponibles sur NCBI. Les acides aminés conservés sont signalés en vert.	149
45	Coupes histologiques de l'intestin colorées par l'Hématoxyline-Eosine au grossissement x20. A : Nombre élevé de cellules caliciformes (indiquées par les flèches) au niveau d'une coupe d'intestin proximale du groupe FM20. B : Infiltration modérée de lymphocytes (flèches) dans la muqueuse de l'intestin distal du groupe FM20. D : Infiltration de granulocytes éosinophiles (flèches) dans la sous-muqueuse de l'intestin proximal du groupe SH.	179
46	Séquences et positionnement des amorces (flèches bleues) utilisées pour le suivi de l'expression en qPCR dans le foie ou l'intestin des marqueurs : (A) TFG- β (AM421619), (B) TCR- β (AJ493441), (C) lyzozyme (FN667957), (D) Complément C3 (HM563078)	182

47	Validation des amorces utilisées en qPCR dans l'intestin et dans le foie. La séquence des amorces, la taille de l'amplicon ainsi que l'efficacité de chaque couple sont présentées dans le tableau B pour les marqueurs de l'inflammation intestinale et dans le tableau D pour les marqueurs du système immunitaire dans le foie. Les fragments obtenus après amplification ont été déposés sur gel d'agarose pour vérifier l'absence de dimère d'amorces ainsi que la taille de l'amplicon obtenu (A et D).	183
48	Niveau d'expression de TGF- β et TCR- β dans la partie distale de l'intestin chez le bar commun nourri avec les régimes expérimentaux FM5, FM10, FM20, SH et FH pendant 65 jours. L'analyse statistique est réalisée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Student. Les colonnes partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.	184
49	Niveau d'expression du complément C3 et du lysozyme dans le foie chez le bar commun nourri avec les régimes expérimentaux FM5, FM10, FM20, SH et FH pendant 65 jours. L'analyse statistique est réalisée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Student. Les colonnes partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.	184

Liste des tableaux

1	Besoins en poissons sauvages (en tonnes) des principales espèces d'élevages (Jackson, 2009 d'après les données présentées par Tacon et Metian, 2008)	17
2	Composition (en % de la matière sèche) et valeur nutritive des farines de poisson	24
3	Composition et inconvénients des principales farines d'origine végétale (Medale et Kaushik, 2009)	27
4	Les différentes catégories de facteurs antinutritionnels et leurs propriétés (d'après Francis <i>et al.</i> , 2001)	28
5	Comparaison de la composition de la farine de krill et des farines de poisson (donnée FAO et Watanabe, 2002)- Médale et Kaushik, 2009	33
6	Composition d'hydrolysats provenant de diverses espèces aquatiques, d'après Chalamaiah, 2012	41
7	Hydrolysats de co-produits d'origine marine possédant une activité antibactérienne	45
8	Peptides antioxydants identifiés dans des hydrolysats de co-produits d'origine marine	46
9	Exemple de peptides antihypertensifs identifiés dans des hydrolysats d'origine marine	47
10	Sites de coupure des enzymes digestives protéolytiques (Guillaume <i>et al.</i> , 1999) .	56
11	Les différents systèmes intestinaux de transport d'acides aminés chez les mammifères (D'après Bröer, 2008)	57
12	Besoins protéiques pour une croissance maximale de quelques poissons d'élevage .	60
13	Composition des tampons d'électrophorèse	76
14	Présentation des amorceurs utilisés	79
15	Souches bactériennes et milieux utilisés pour les tests antibactériens	82
16	Formulation et composition proximale des régimes expérimentaux utilisés pour les expériences de conditionnement alimentaire	84
17	Exemples d'hydrolysats protéiques de poisson commercialisés à des fins nutraceutiques ou comme aliments fonctionnels pour promouvoir la santé (Chalamaiah <i>et al.</i> , 2012).	91
18	Effecteurs du système immunitaire des poissons	150

19	Etude morphométrique de coupes d'intestin proximal et distal de bar commun nourri pendant 65 jours avec cinq régimes expérimentaux (FM5, SH, FH, FM10 et FM20)*	177
20	Etude histologique de coupes d'intestin proximal et distal de bar commun nourri pendant 65 jours avec cinq régimes expérimentaux (FM5, SH, FH, FM10 et FM20)	178

Liste des abréviations

AA : acide aminé	HPSEC : High Performance Size Exclusion Chromatography
AAI : Acide Aminé Indispensable	MALDI-TOF/TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization tandem Time Of Flight
ACN : Acétonitrile	MET : Microscopie Électronique à Transmission
AcOH : Acide acétique	Milieu LB : Milieu de Luria-Bertoni
ADNc : Acide desoxyribonucléique complémentaire	M-MLV RT : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
AP : Phosphatase alcaline	Pb : Paire de bases
ARNm : Acide ribonucléique messager	PB : Poor Broth
BCP : Bromo-Chloro-Phénol	PBB : Poor Broth + Beef extract
BHI : Brain Heart Infusion	PBS : Phosphate Buffer Saline
CaaT : Cationic amino acid Transporter	PepT1 : Peptide Transporter 1
Da : Dalton	PMSF : Fluorure de phénylmethylsulfonile
DH : Degré d'hydrolyse	qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
DNase 1 RQ1 : Desoxyribonucléase 1 RNA-Qualified 1	rp-HPLC : reverse phase High Performance Liquid Chromatography
dNTP : DesoxyNucleotide	SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
DO : Densité optique	SGR : Specific Growth Rate
DTT : Dithiothreitol	SH : Hydrolysat de co-produits de crevette (Shrimp Hydrolsate)
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique	Tampon TAE : Tampon Tris-Acide acétique-EDTA
EPPI : Eau Pour Préparations Injectables	TauT : Taurine Transporter
ESI-MS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry	TCR-β : T-Cell Receptor- β
EST : Expressed Sequence Tag	TCS : Taux de croissance spécifique
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations	TFA : Acide trifluoroacétique
FCR : Food Conversion ratio	TGF-β : Transforming Growth Factor- β
FH : Hydrolysat de co-produits de Tilapia (Fish Hydrolysate)	
FM : Fish meal	

Première partie

Introduction générale

1 L'aquaculture : Contexte socio-économique

”Elle sait que son avenir n'est pas seulement lié à sa capacité de produire toujours plus, plus vite, à des prix plus serrés. Elle sait qu'elle doit aussi protéger l'environnement, dont elle tire sa richesse, offrir aux consommateurs la qualité qu'ils sont en droit d'attendre, laisser aux paysans pauvres une part raisonnable de valeur ajoutée sur ce qu'ils produisent pour l'export...” (Girin, 1991, "L'aquaculture adulte")

La production de ressources aquatiques marines et continentales (algues, crustacés, mollusques et poissons) a atteint 148 millions de tonnes en 2010 (FAO, 2012). Cette production, issue de la pêche et de l'aquaculture, est en pleine expansion, connaissant une croissance moyenne de 3.2% par an depuis les années 60s. L'aquaculture et la pêche sont deux activités étroitement liées puisqu'elles sont à la fois partenaires, concurrentes et interdépendantes. En effet, l'aquaculture qui fournit aujourd'hui près de 50% des ressources aquatiques peut constituer une réponse à la sécurité alimentaire dans le monde mais également aux problèmes d'appauvrissement des populations d'animaux aquatiques que connaît la planète. Cependant, l'aquaculture se pose également en concurrente à la demande humaine en ressources aquatiques car elle dépend directement des captures de la pêche pour la formulation des aliments. Ces liens multiples et complexes entre pêche, aquaculture, environnement et économie placent l'aquaculture au cœur des préoccupations actuelles de l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

1.1. L'aquaculture : une activité multi-facettes

L'aquaculture est définie par la FAO comme étant une activité d'« Élevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, plantes aquatiques) avec pour conditions d'une part une intervention humaine dans le processus d'augmentation de la production et d'autre part une propriété industrielle ou juridique du stock en élevage. »

Elle se distingue donc de la pêche par le fait qu'il y a une intervention humaine dans le cycle de vie et/ou dans l'alimentation des espèces concernées. Cette intervention peut parfois être mineure comme c'est le cas pour le thon rouge qui est engrangé après avoir été capturé.



Figure 1 – Les différents types d'aquaculture.

A : Élevage piscicole dans le Péloponèse, Grèce (Dimitri Messinis). B : Algoculture C : Bassins d'élevage de crevettes, baie de Phang Nga, Thailande (Yann Arthus Bertrand). D : Parcs à huîtres, Ile de Ré, France.

Cette forme d'aquaculture est probablement celle qui se pratiquait à ses débuts. L'apparition de cette activité n'est pas datée de manière certaine mais des témoignages montrent que l'aquaculture serait apparue depuis des millénaires en Chine, en Égypte ou en Mésopotamie (Beveridge et Little, 2002). Le traité de Fan Li, écrit en 475 av JC, constitue le plus ancien document écrit connu à ce jour relatif à l'aquaculture, il atteste de l'existence d'élevages de carpes en Chine à cette époque là. En Europe, les pionniers de l'aquaculture sont les Étrusques qui ont mis en place le système de la valliculture (système d'élevage piscicole en eaux saumâtres installé dans des lagunes) vers 400-500 av JC. Puis une aquaculture extensive s'est mise en place en Europe au Moyen Age dans les mares et les étangs en conséquence de crises environnementales comme la prise de conscience de la surpêche, l'exploitation des cours d'eau... (Hoffmann, 2005). Il est vraisemblable que l'aquaculture se soit développée indépendamment sur tous les continents donnant naissance à de multiples modèles techniques.

Mais c'est au 20^{ème} siècle, que l'aquaculture s'est considérablement développée pour atteindre une échelle industrielle. En effet, depuis les années 50s, l'aquaculture connaît une croissance exponentielle puisque sa production a été multipliée par 150 entre 1950 et 2012, fournissant maintenant près de la moitié des ressources aquatiques que l'on consomme.

Outre la diversité des techniques aquacoles, la multiplicité de l'aquaculture réside également dans le nombre d'organismes élevés, de lieux exploités ainsi que dans les différents types d'exploitations aquacoles. Le dernier rapport de la FAO (2012) dénombre 541 espèces exploitées dont 327 espèces de poissons, 102 espèces de mollusques, 62 espèces de crustacés, 6 espèces

d'amphibiens et reptiles, 9 espèces d'invertébrés aquatiques et enfin 35 espèces d'algues. La diversité de ces espèces est liée à la diversité des milieux exploités puisque l'aquaculture se pratique aussi bien en zone continentale (eau douce) dans des étangs ou des cours d'eau qu'en zone côtière, en eau de mer ou saumâtre (Figure 1). La pluralité de l'aquaculture réside, de plus, dans les différentes échelles de production où elle se place : des petites exploitations rurales destinées à la consommation locale aux exploitations industrielles tournées vers l'exportation.

Il existe ainsi différents types de production. L'aquaculture extensive est caractérisée par des élevages de faible densité et un apport en nourriture faible ou nul alors que l'aquaculture intensive se pratique en forte densité avec un apport total en nourriture. Selon les critères définis ici, une grande partie de l'aquaculture est extensive ou semi-extensive. C'est par exemple le cas de la conchyliculture pour laquelle il n'y a aucun apport de nourriture, les coquillages prélevant leur aliments directement dans le milieu naturel. De nombreux élevages de poissons d'eau douce en étang sont également pratiqués en système extensif. Cela peut même être le cas pour des poissons carnivores comme les saumons pour lesquels la technique du "sea ranching" a été développée. Il s'agit du déversement de smolts (jeunes saumons d'un an) dans une rivière, pêchés ensuite quelques années plus tard quand ils reviennent pondre dans cette même rivière après avoir engrangé en mer. L'aquaculture intensive concerne essentiellement l'élevage des salmonidés et des poissons marins en bassins ou en cages ainsi que l'élevage des crevettes en bassins qui nécessite de forts apports en nourriture. Il existe également des espèces qui peuvent passer d'un type d'élevage à un autre le long de leur cycle de développement. Par exemple, la coquille Saint Jacques (*P. maximus*) est produite en système intensif en écloserie, puis en système semi-intensif pendant la période de pré-grossissement et en système extensif pour le grossissement.

Enfin, l'aquaculture associe différentes finalités puisqu'elle ne se limite pas seulement à la production de ressources aquatiques pour la consommation humaine. Elle produit aussi des poissons ou des appâts pour la pêche professionnelle et sportive ainsi que des poissons d'ornement. Elle joue également un rôle dans le maintien ou le rétablissement des stocks naturels. Plusieurs programmes de ce type ont déjà été réalisés par le passé avec plus ou moins de succès. Citons l'exemple de l'esturgeon dont la surexploitation pour la production de caviar a entraîné un déclin alarmant des stocks dans la mer Caspienne et la mer d'Azov et a donné lieu à un programme de repeuplement dans les années 80s. L'élevage de plusieurs espèces d'esturgeons a ainsi été mis en place et permit le maintien de certaines espèces tel que le beluga (*H. huso*). Néanmoins, cela a également entraîné la dissémination de quelques espèces, notamment l'espèce sibérienne (*A. baeri*) hors de leur aire de répartition naturelle (Williot, 2004)

1.2. Les enjeux socio-économiques de l'aquaculture

Un secteur en fort développement

L'aquaculture est aujourd'hui le secteur de production vivrière qui connaît la plus forte croissance. Cet essor né dans les années 50s, s'est accéléré depuis les années 80s amenant le taux de croissance annuel moyen à 8.8% entre 1980 et 2010 (FAO, 2012). La production de ressources aquatiques issues de l'aquaculture s'élevait à 59.9 millions de tonnes en 2010 contre seulement 32.4 millions de tonnes en 2000 (Figure 2).

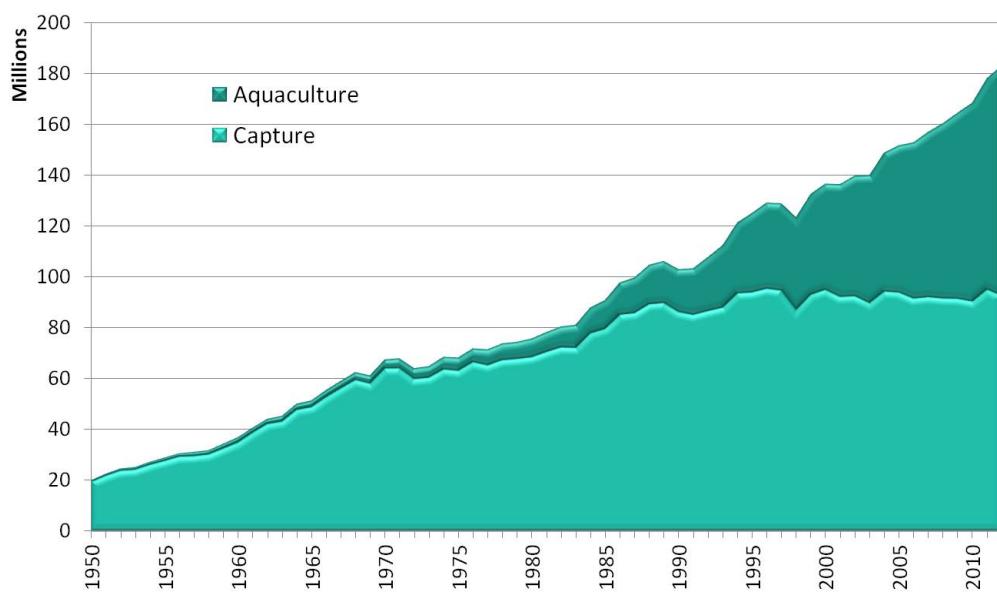


Figure 2 – Évolution de la production mondiale en produits de la mer issus de captures ou de l'aquaculture, exprimée en millions de tonnes (FAOSTAT)

Cette croissance très importante est en lien avec une augmentation de la demande en ressources aquatiques soutenue d'une part par l'augmentation de la population mondiale qui devrait atteindre 8 milliards de personnes en 2025 et d'autre part par l'augmentation de la consommation moyenne par habitant en ressources aquatiques. En effet, la consommation annuelle moyenne dans le monde de ces produits est passée de 9.9kg/habitant dans les années 60s à 18.8kg/habitant en 2010 et la FAO estime qu'elle sera de 20kg/habitant en 2030. Cet attrait croissant peut être relié à la qualité nutritionnelle de ce type de produits. Les poissons sont en effet reconnus pour être une source de protéines animales de qualité ainsi qu'une source de vitamines (D, A et B), de minéraux (calcium, zinc, fer, iodé, sélénium), d'oligoéléments et d'acides gras polyinsaturés (Projet Composition nutritionnelle des produits aquatiques - www.nutraqua.com, Pôle Aquimer). De plus, de nombreuses études scientifiques ont montré que la consommation régulière de poisson a des effets protecteurs contre des maladies comme les accidents vasculaires cérébraux (Chowdhury *et al.*, 2012) ou les maladies coronariennes (König *et al.*, 2005).

Traditionnellement, la pêche est la source d'approvisionnement principale en ressources aquatiques et celle-ci fournissait encore 53% de la production en 2010 (FAO, 2012). Bien que ce secteur ait également connu une forte croissance, multipliant les captures par un facteur 5 entre les années 50s et les années 90s, les débarquements stagnent aujourd'hui autour de 90 millions de tonnes par an (FAO, 2012). La prise de conscience des problèmes environnementaux et les mesures d'encadrement qui en résultent laissent une faible marge de progression à cette activité. En effet, d'après la FAO, en 2009, la grande majorité des stocks était exploitée à leur maximum (57.4%) ou surexploitée (29.9%). Une réglementation s'est donc mise en place depuis les années 70s imposant des quotas (TAC : Total Autorisé de Capture) et des tailles minimum aux professionnels de la pêche. Dans ce contexte, l'aquaculture apparaît donc comme une solution pour compléter l'approvisionnement halieutique et maintenir l'offre en ressources aquatiques.

Importance de l'aquaculture dans la sécurité alimentaire

La sécurité alimentaire, selon la définition de la FAO, est garantie quand tout être humain a accès physiquement et économiquement à une nourriture saine, suffisante et nutritive pour mener une vie saine et active. La FAO estime que le nombre de personnes sous-alimentées est en régression, mais aujourd'hui encore, 1 personne sur 8 souffre de faim chronique dans le monde. Dans ce contexte où la lutte contre la faim est un problème mondial majeur, la pêche et l'aquaculture ont un rôle à jouer. Grâce à l'apport important en ressources aquatiques généré par la pêche et l'aquaculture, la quantité moyenne de ces ressources était de 18.4kg/habitant assurant ainsi 15% des apports en protéines animales à plus de 4.3 milliards de personnes (FAO, 2012). Ce secteur est également une source de revenu pour 55 millions de personnes. En effet, 12% de la population mondiale dépendent directement ou indirectement des pêches et de l'aquaculture (déclaration de José Graziano da Silva, Directeur général de la FAO) et 17% de la population mondiale a pour source principale de protéines animales le poisson, ce chiffre atteignant 25% dans les pays à faible revenu et déficit vivrier. Le maintien du développement de la pêche et de l'aquaculture constitue donc un enjeu important. Or, les capacités d'évolution de la pêche sont très limitées et une proportion non négligeable de celle-ci appelée pêche minotière, n'est pas destinée à la consommation humaine mais à l'alimentation des animaux d'élevage. Les conflits sur l'utilisation des ressources aquatiques engendrent donc des défis que l'aquaculture se doit de résoudre. L'aquaculture présente par ailleurs un avantage par rapport à l'agriculture grâce à des taux de conversion bien plus faibles (Figure 3). Le taux de conversion représente la quantité d'aliment nécessaire pour produire 1 kg d'un animal d'élevage. Or, il faut en moyenne 0.7 à 3 kg d'aliments pour produire 1 kg de poisson (Tacon et Metian, 2008) alors qu'il faut 10 kg d'aliments pour produire 1 kg de boeuf (Smil, 2002).

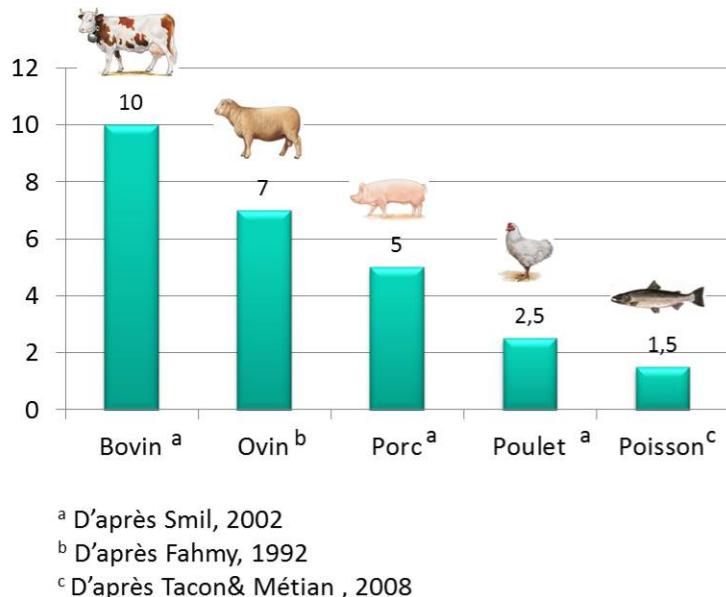


Figure 3 – Taux de conversion moyen des principaux animaux d'élevage

L'aquaculture dans le monde

L'aquaculture mondiale a produit 59.9 millions de tonnes de ressources aquatiques en 2010 (FAO, 2012). L'Asie est le principal continent producteur puisque qu'elle totalise à elle seule 89% en volume et 79% en valeur de la production en 2010 (FAO, 2012) dont 40% du tonnage rien que pour la Chine. La production aquacole des autres continents apparaît ainsi presque anecdotique : le continent Américain et l'Europe fournissent respectivement 4.3 et 4.2% de la production mondiale, l'Afrique fournit 2.2% et enfin l'Océanie, 0.3% (Figure 4 A). Parmi les différentes catégories d'aquacultures, la pisciculture est très majoritaire en terme de production représentant à elle seule 59.5% de la production en 2010 alors que la conchyliculture et l'élevage de crustacés représentent respectivement 23.6% et 9.6% de la production (FAO, 2012) (Figure 4 B).

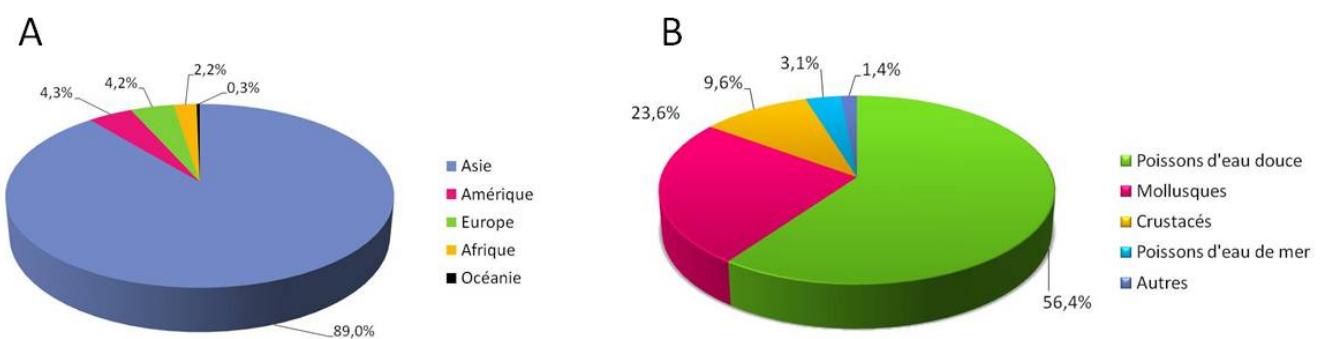


Figure 4 – Répartition de la production aquacole mondiale en fonction des continents (A) et des espèces (B). Données de la FAO (2012).

En pisciculture, les élevages réalisés en eau douce sont très majoritaires totalisant près de 95% de la production piscicole totale. Ceux-ci concernent diverses espèces de cyprinidés (dont les carpes) et de cichlidés ainsi que des espèces de mollusques et de crustacés (Figure 5). On trouve également une espèce diadrome, le saumon, à la 11^{ème} place en terme de production représentant environ 2 millions de tonnes en 2012 (FAOSTAT).

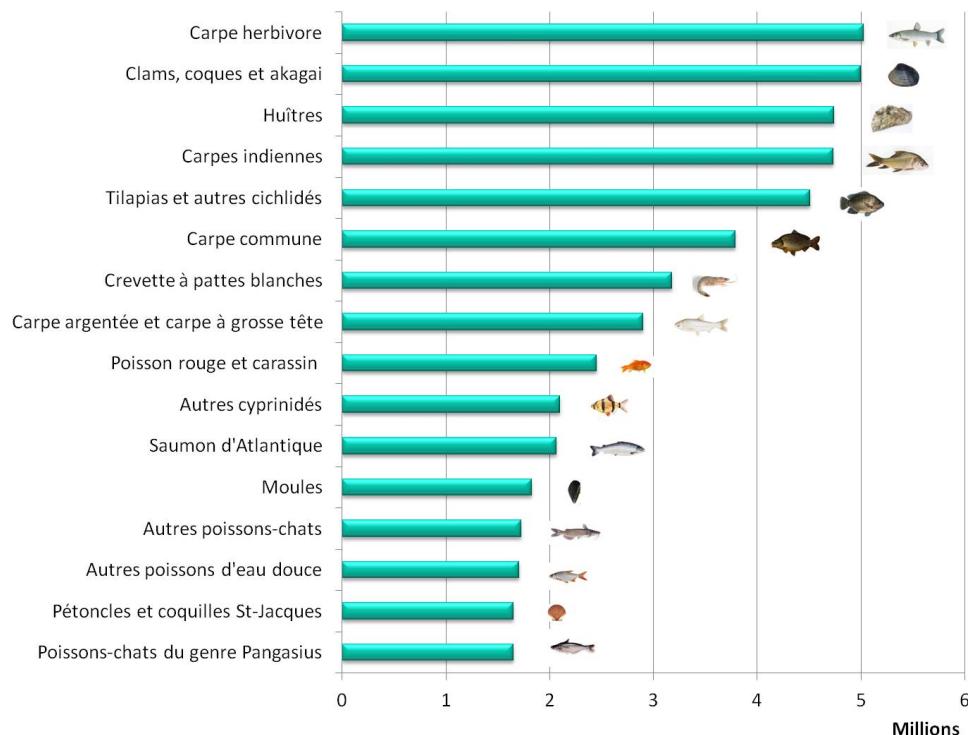


Figure 5 – Principales espèces produites en aquaculture dans le monde en 2012 (FAOSTAT)

L'aquaculture européenne et française

La production européenne, bien que représentant une faible part de la production mondiale, est essentiellement tournée vers des espèces à haute valeur ajoutée. Elle révèle ainsi un prix au kilo presque 2 fois supérieur à la moyenne mondiale.

En Europe, les principaux pays producteurs sont la Norvège qui totalise près de la moitié de la production européenne (45%), puis l'Espagne, la France, le Royaume-Unis et l'Italie (Figure 6). La Norvège et le Royaume-Unis sont essentiellement tournés vers la salmoniculture qui représente 93% de la production norvégienne et 80% de la production anglaise. La conchyliculture représente également une grande part de la production européenne grâce à l'élevage de moules en Espagne (77% de la production espagnole), l'élevage d'huîtres et de moules en France (respectivement 40% et 37% de la production française) et l'élevage de moules et de palourdes en Italie (respectivement 48% et 20%). L'Espagne est également un pays producteur de poissons marins, principalement bar, daurade et turbot à hauteur de 17% de sa production totale.

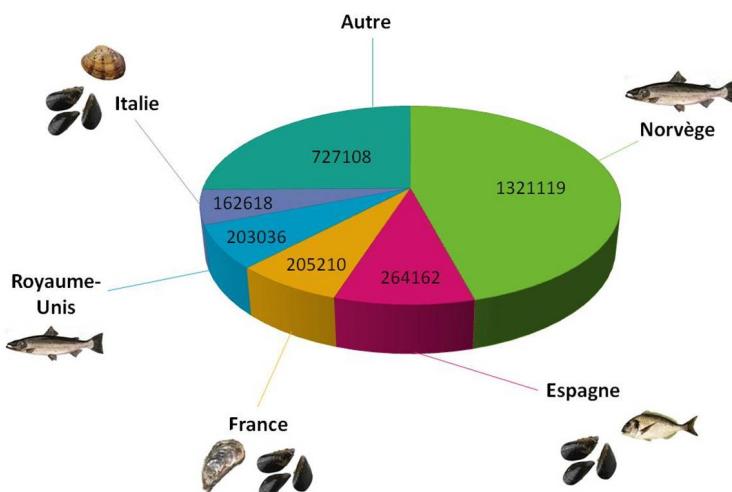


Figure 6 – Production aquacole des pays européens en 2012 exprimée en tonnes (FAOSTAT)

La France a une production aquacole diversifiée héritée d'une aquaculture ancienne. La conchyliculture, principalement d'huîtres et de moules est implantée sur l'ensemble des côtes françaises depuis l'antiquité. Ce secteur représente plus de 75% de la production française. La France possède également des exploitations piscicoles issues de la tradition d'élevage de poisson en étang (carpes, gardons, tanches) développée au Moyen-Age dans le sud-ouest, le centre et l'est de la France. Il s'agit de polycultures extensives où plusieurs espèces cohabitent. Une pisciculture intensive tournée vers la salmoniculture (truite arc-en-ciel et truite de mer) s'est parallèlement développée dans la seconde moitié du 19^{ème} siècle avec la (re)découverte de la reproduction artificielle de la truite fario. Cette activité s'est fortement développée, autour de la truite arc-en-ciel entre 1975 et 1990, la production atteignant 50 000 tonnes par an. Aujourd'hui, elle est en recul (de 20% entre 1997 et 2007; AGREST, 2009) mais la France reste le 4^{ème} pays producteur mondial de truites derrière le Chili, la Norvège et l'Italie. Une salmoniculture marine a été expérimentée mais s'est heurtée à des problèmes de pollution et de température d'eau trop élevée en été. La France a également développé l'élevage de deux espèces diadromes : l'anguille européenne et l'esturgeon de Sibérie pour la production de caviar. Enfin, des élevages de crevettes pénéides se sont développés dans les TOM, notamment en Nouvelle-Calédonie et des élevages d'huîtres perlières sont fortement implantée en Polynésie. Les tonnages des différents types d'élevages sont présentés dans la Figure 7. La conchyliculture est de loin le domaine le plus développé représentant 87% de la production française, suivie par la salmoniculture à hauteur de 15%. Les autres domaines restent anecdotiques en terme de tonnage.

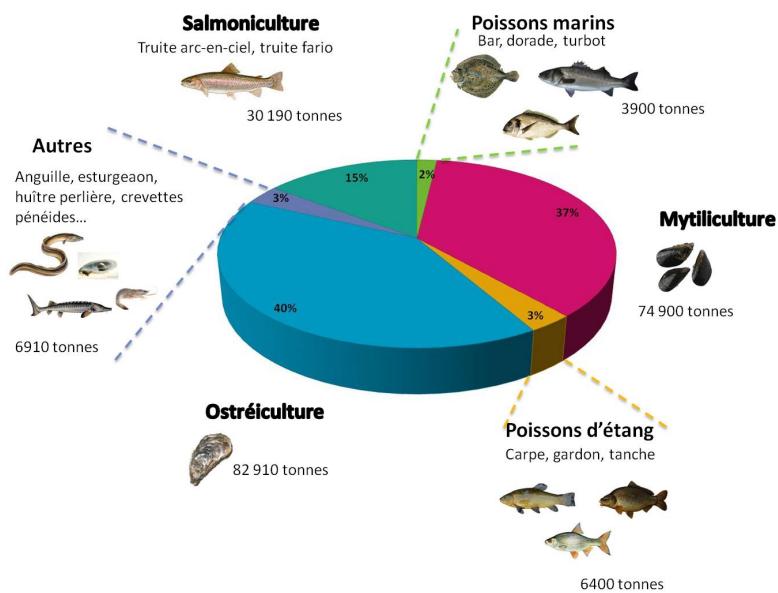


Figure 7 – Production aquacole française en 2012 (FAOSTAT)

1.3. Les impacts environnementaux de l'aquaculture

L'aquaculture, comme toutes activités industrielles, ne peut se pratiquer sans un certain nombre d'impacts sur l'environnement. Elle est tout d'abord, très constrainte par le milieu aquatique dans lequel elle se pratique. Elle génère, en effet, de nombreux déchets (aliments non ingérés, matière fécale, produits chimiques) complexes à traiter car ils peuvent se dissoudre ou rester en suspension dans l'eau. L'élevage en milieu aquatique ouvert est également propice à la propagation de maladies infectieuses ou à l'implantation d'espèces exogènes ou OGM dans le milieu naturel. De plus, l'aquaculture est fortement dépendante de la pêche minotière et plus généralement du poisson sauvage pour alimenter les élevages participant ainsi à l'appauvrissement des stocks d'espèces aquatiques.

1.3.1. L'aquaculture : une activité génératrice de rejets polluants

La matière organique

Comme toute activité de production, l'aquaculture est génératrice de pollution, notamment par les déchets organiques. La nature et la quantité de ces déchets sont variables selon le type d'aquaculture pratiquée. Ainsi, l'algoculture produit très peu de déchets organiques alors que la conchyliculture et la pisciculture sont de plus gros générateurs de pollution. En effet, les mollusques filtreurs produisent des pseudo-fèces responsables de problèmes de sédimentation. Une étude a montré qu'en Suède, un élevage de 100 tonnes de moules produisait 7 kg de matière sèche par m² sur une période de 2 ans (Dahlbäck et Gunnarsson, 1981).

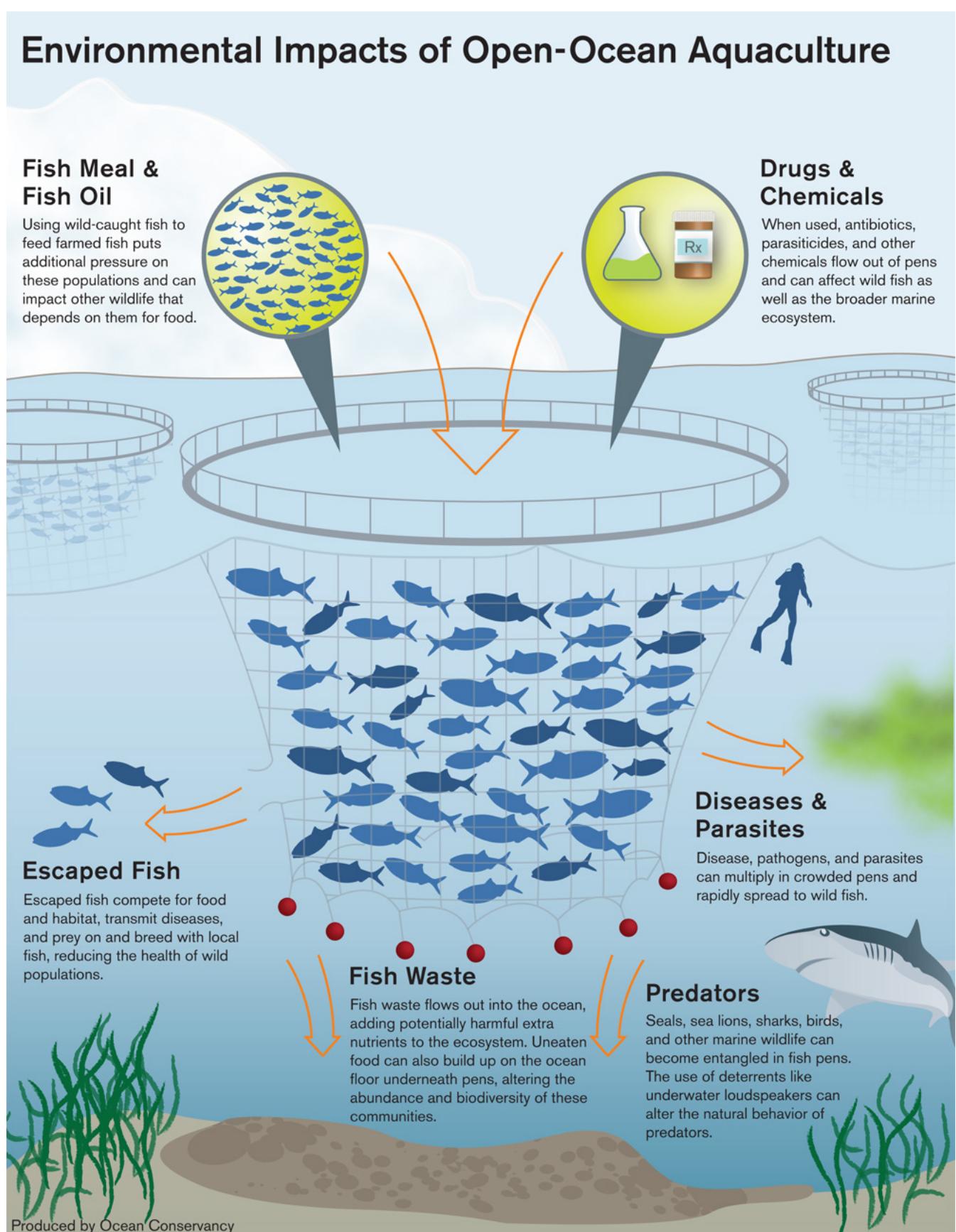


Figure 8 – Les impacts environnementaux de l'aquaculture en milieu ouvert (Ocean Conservancy)

La pisciculture et la crevetticulture génèrent autant de déchets qu'une exploitation agricole terrestre et plus l'activité est intensive plus la quantité de déchets est importante. Le rapport de l'Agence Norvégienne de Contrôle de la Pollution (SFT) fait état de pollutions alarmantes provenant de la salmoniculture en Norvège. Il compare la pollution générée par un élevage de 3 120 tonnes par an à celle d'une ville de 50 000 habitants. Les impacts environnementaux sont lourds car de nombreux élevages ont lieu en milieu ouvert (conchyliculture, élevages en cage ou bénéficiant d'une prise d'eau sur une rivière...) et les effluents sont évacués directement dans le milieu aquatique naturel et ne peuvent ainsi pas être traités. Néanmoins des solutions pour une aquaculture durable se mettent peu à peu en place. Les élevages en bassin peuvent par exemple installer des unités de dégrillage et d'épuration en sortie pour traiter leurs effluents. Le développement d'une aquaculture intégrée est également en pleine expansion. Il s'agit de développer l'aquaculture dans des environnements propices ou encore d'associer plusieurs espèces pour optimiser le nourrissage. On peut citer en exemple le développement d'élevage de poissons dans des rizicultures. Les poissons sont utilisés pour combattre les insectes nuisibles aux plantes, cela permet d'augmenter le rendement en riz mais également de récolter les poissons.

Les composés chimiques et les médicaments

Une seconde source importante de pollution est celle des produits chimiques. Leur utilisation est très répandue en aquaculture pour désinfecter les structures d'élevage ou traiter les animaux. Parmi ces substances, les antibiotiques font parties des plus utilisées. En 1999, on estime que 35% des antibiotiques étaient destinés aux animaux d'élevage (y compris les animaux terrestres), cela représente 4700 tonnes d'antibiotiques utilisés en une année (Serrano, 2005). Certains antibiotiques comme l'amoxicilin ou l'erytromycine peuvent être libérés dans l'eau *via* les granulés non-ingérés ou les excréptions des animaux (Aarestrup, 2006) et persister dans l'environnement en s'accumulant dans les sédiments (Armstrong *et al.*, 2005). Cela peut avoir des effets négatifs sur le phytoplancton et le zooplancton (Ferreira *et al.*, 2007) se répercutant sur tout le réseau trophique. Cependant, l'impact majeur de l'utilisation massive d'antibiotiques est l'apparition de bactéries résistantes. Harper (2002) a mis en évidence la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques à proximité des élevages piscicoles utilisant beaucoup d'antibiotiques ainsi que dans les poissons provenant de ces élevages. Dès les années 90s, plusieurs souches ont été détectées résistantes : *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *E. tarda*, *E. ictaluri*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *P. piscida* et *Y. ruckeri* (Depaola *et al.*, 1995). La tendance est à l'aggravation et la FAO qualifie cet état de fait comme "l'un des risques les plus graves pour la santé humaine à échelle mondiale".

L'utilisation des antibiotiques est très réglementée dans l'Union Européenne et dans certains pays (Serrano, 2005). En effet, il existe un faible nombre de médicaments avec une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) vétérinaire et ils ne peuvent être délivrés que sur pres-

cription vétérinaire en cas d'infection bactérienne avérée. Cependant, à l'échelle mondiale, ils restent très utilisés en prévention particulièrement lors des phases critiques que sont les stades précoces, la métamorphose ou les transferts. Des agents anti-parasitaires sont également couramment utilisés pour traiter les infections parasitaires telle que le pou du saumon. Parmi les plus utilisés, on trouve l'avermectine administré dans l'alimentation, les pyrethroïdes, le peroxyde d'hydrogène et des organophosphates utilisés en balnéation. Ces traitements peuvent perdurer dans l'environnement et affecter des organismes indigènes, notamment des crustacés (pour revue, Burridge *et al.*, 2010). Une pollution par les métaux est également rapportée. L'aquaculture peut rejeter dans l'environnement des métaux (cuivre, zinc, fer, manganèse) par l'intermédiaire de la nourriture utilisée, de la peinture des bassins et des agents nettoyants et anti-fouling. Enfin, l'utilisation fréquente, en faibles doses, d'anesthésiants pour la manutention des poissons est réglementée et considérée comme ayant un impact faible sur l'environnement.

1.3.2. Impact sur les populations animales locales

La propagation des maladies

Les maladies infectieuses constituent un problème majeur en aquaculture particulièrement dans les élevages intensifs où les fortes densités favorisent la transmission des pathogènes. Ces pathogènes peuvent être transmis *via* les populations sauvages locales ou par l'introduction d'individus contaminés dans l'élevage. Il existe des mesures de prévention visant à réduire l'apparition de ces maladies. Ces mesures consistent essentiellement à limiter les densités d'individus et à assurer la qualité de l'eau utilisée si cela est possible. En effet, tout déséquilibre physico-chimique tel qu'une modification de la température, du pH, une anoxie, un excès de matière azotée ou de particules en suspension peut engendrer des stress chez les animaux d'élevage favorisant l'apparition de maladies.

Quand les élevages sont situés en milieu ouvert, il existe un risque de transmission de ces maladies aux populations sauvages locales favorisé par le milieu aquatique. Ces transmissions peuvent également se faire par rejet d'effluents contaminés en sortie d'élevage ainsi que par échappement ou libération d'individus (Kurath et Winton, 2011). Ce risque est cependant peu élevé car la faible densité des espèces sauvages limite la propagation des agents infectieux. Néanmoins, des cas de transmission d'agents pathogènes d'animaux d'élevage vers des animaux sauvages sont connus et peuvent mener à la diminution des populations sauvages (Wallace *et al.*, 2008; Bain *et al.*, 2008; Diamant *et al.*, 2007).

L'introduction d'espèces "exotiques"

L'aquaculture peut également impacter les populations animales locales par l'introduction d'espèces exogènes nouvelles. Celle-ci peut être provoquée de manière involontaire notamment *via* les bateaux qui transportent avec eux de l'eau chargée en plancton dont des larves d'ani-

maux aquatiques. La crépidule, introduite sur les côtes Normandes par les navires américains lors du débarquement en 1944, en est un exemple. Mais, elle peut également être volontaire lorsqu'il s'agit d'une espèce étrangère importée dans le but d'exploiter ses propriétés. L'écrevisse américaine (*P. clarcki*) ou l'huître creuse (*C. gigas*) ont été implantées pour leurs performances de croissance intéressante. Ces pratiques peuvent avoir des effets néfastes sur les populations autochtones car il existe un risque de colonisation des niches écologiques par les espèces importées. La disparition des espèces autochtones suite à l'introduction de la perche du nil dans le lac Victoria en est un exemple très médiatique (Goudswaard *et al.*, 2008).

Les OGM

Il n'existe pas à l'heure actuelle de poissons d'élevage OGM destinés à la consommation. Cependant, il existe des animaux d'élevage génétiquement modifiés, les animaux polyploïdes qui ne sont pas considérés à proprement parler comme des OGM et ne sont donc pas soumis à la même législation. En Europe, seuls les salmonidés et l'huître creuse sont concernés. L'enjeu de ces modifications est de rendre les animaux stériles pour améliorer leurs performances de croissance, éviter la laitance chez les huîtres et la dégradation des qualités gustatives des poissons qui ont atteint la maturité sexuelle. Aujourd'hui, 80% de la production de truites arc-en-ciel en eau douce concerne des truites monosexes femelles stériles. Ces animaux sont obtenus en croisant des femelles normales avec des néomales, c'est à dire des individus au sexe génétique femelle mais au phénotype mâle (Piferrer, 2001). Il existe également des élevages de truites triploïdes monosexes femelles, qui représentent une production de 15 000 tonnes par an en Europe (Piferrer *et al.*, 2009). En France, l'introduction d'huîtres creuses triploïdes date des années 90s. Ces huîtres sont obtenues par reproduction d'huîtres tétraploïdes mâles avec des huîtres diploïdes femelles (Guo et Allen Jr, 1994). Cependant, bien que théoriquement stériles, l'INRA fait état de la reproduction de certaines huîtres triploïdes pouvant à terme remplacer les huîtres diploïdes.

Un saumon génétiquement modifié a été créé par une société américaine qui a déposé une autorisation de mise sur le marché aux USA. Ce saumon, capable d'avoir une croissance deux fois plus rapide grâce à la modification du gène de l'hormone de croissance a été déclaré sans conséquences sur l'environnement et la santé par la "Food and Drug Administration" (FDA) américaine en 2013. Sa mise sur le marché pourrait être prochainement autorisée.

1.3.3. Des liens étroits avec la pêche

Une forte dépendance envers les produits de la pêche

Outre les impacts environnementaux décrits précédemment, l'aquaculture est accusée de consommer une part importante des captures pour la fabrication des aliments aquacoles. En effet, une partie des espèces d'élevages est nourrie avec des aliments contenant des farines et

des huiles de poisson. Cela concerne les poissons omnivores (tilapias, poissons chats, carpe commune et poisson-lait), les poissons carnivores (saumons, truites, anguilles, bars, dorades et thon) et les crustacés (crevettes, crabes et homards). Or ces espèces représentaient 41.6% de la production aquacole mondiale en 2008 (FAO, 2012).

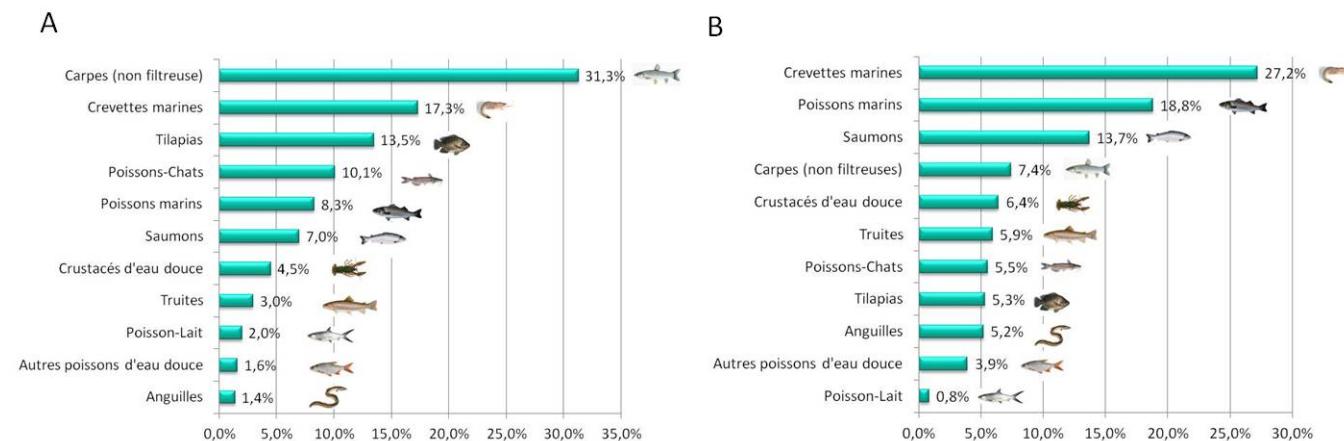


Figure 9 – A : Consommation d'aliments aquacoles B : Répartition de la consommation de farines de poisson entre les principales espèces d'élevage en 2008 (Données FAO, 2012).

Le rapport de la FAO, mentionne que seulement 8 espèces (ou groupes d'espèces) consomment 62.2% des aliments produits (Figure 9) et beaucoup parmi elles font partie des 15 espèces (ou groupes d'espèces) les plus produites. La production d'aliments industriels atteignait 708 millions de tonnes en 2008 dont 29.1 millions (4.1%) destinées à l'aquaculture. La production augmente de 11% par an depuis 1995 et la FAO estime les besoins de l'aquaculture à 71 millions de tonnes en 2020 (FAO, 2012). Or ces aliments sont produits à partir des captures de la pêche minotière, ou "fourrage", qui concerne les espèces de faible valeur marchande ou des déchets (co-produits) des espèces destinées à l'alimentation humaine.

La dépendance en poissons sauvages des principales espèces d'élevage est exposée dans le Tableau 1. Le ratio correspond à la quantité de poissons sauvages nécessaire pour produire 1 kg de poissons ou crustacés d'élevage. Ainsi, 5.16 kg de poissons sauvages sont nécessaires pour produire 1 kg de poissons marins. L'élevage de ces espèces, ainsi que des crevettes marines, des espèces diadromes et des tilapias consomment plus de ressources aquatiques qu'il n'en produit. A l'inverse, l'élevage des carpes, poissons-lait et poissons-chats produit plus de ressources aquatiques qu'il n'en consomme. De manière évidente, l'une des solutions à la réduction de la dépendance en poissons sauvages est de favoriser les espèces ayant le plus faible ratio. Néanmoins, les espèces marines et diadromes ainsi que les crevettes marines font parties des espèces les plus consommées au monde (FAO, 2012) et représentent donc un marché très rentable.

Tableau 1 – Besoins en poissons sauvages (en tonnes) des principales espèces d'élevages (Jackson, 2009 d'après les données présentées par Tacon et Metian, 2008)

Espèces produites	Production ^a	Besoin en poissons sauvages	ratio ^b
Saumon ^c	1 465 000	7 220 000	4.9
Anguille ^d	266 000	927 000	3.5
Truites ^e	632 000	2 180 000	3.4
Poissons marins ^f	1 536 000	3 316 000	2.2
Crevettes marines ^g	3 164 000	4 399 000	1.4
Poisson-Chat ^h	1 809 000	856 000	0.5
Tilapia ⁱ	2 326 000	854 000	0.4
Poisson-Lait ^j	585 000	94 000	0.2
Carpes ^k	10 225 000	1 881 000	0.2

a. Exprimés en tonnes

b. Quantité de poissons sauvages utilisée pour fabriquer les aliments sur la quantité de poissons d'élevage produits

c. *S. salar*, *O. kisutch*, *O. tshawytscha*

d. *A. japonica*, *A. anguilla*, *A. australis*

e. *O. mykiss*, *S. fontinalis*, *S. trutta*

f. *S. quiqueiradiata*, *L. japonicus*, *S. aurata*, *P. auratus*, *D. labrax*, *Bothidae*, *S. ocellatus*, *P. olivaceus*, *S. schlegeli*, *Tetraodontidae*, *R. canadun*, *S. scalaripinnis*, *G. morhua*, *P. maxima*...

g. *P. vannamei*, *P. merguiensis*, *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. stylirostris*...

h. *Pangasius* spp., *I. punctatus*, *S. asotus*, *C. gariepinus* x *C. macrocephalus*, *P. fulvidraco*, *C. gariepinus*...

i. *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *O. aureus*, *O. andersonii*, *O. spilurus*...

j. *C. chano*

k. *C. idellus*, *C. carpio*, *C. carassius*, *P. pekinensis*, *M. piceus*; espèces filtreuses

L'aquaculture : une solution à la surpêche ?

Le développement de la pêche ainsi que celui de l'aquaculture sont étroitement liés. L'aquaculture a été présentée à ses débuts comme une "révolution bleue" capable de limiter la pression de pêche et donc la surpêche. Il est vrai que le développement d'élevage de poissons de haute valeur commerciale a permis de diminuer la pression de pêche sur les populations sauvages de ces espèces *via* une diminution des prix sur le marché. C'est par exemple, le cas de l'Esturgeon de Sibérie évoqué dans un paragraphe précédent. Or, de par la faible marge de progression de la pêche, l'aquaculture est "chargée" de maintenir l'offre en ressources aquatiques et ainsi de contribuer à la sécurité alimentaire mondiale. L'effet pervers de sa croissance est la demande de plus en plus importante en poissons issus de captures pour l'alimentation des poissons d'élevages, créant ainsi une surexploitation des espèces à faible valeur commerciale, les poissons "fourrage". La FAO estime qu'aujourd'hui, 17% des espèces exploitées sont victimes de surpêche et 8% sont même épuisées. Cela concerne en grande majorité, la sardine, l'anchois, la morue et le hareng (FAO, 2012), principaux ingrédients des farines et huiles de poisson (hors morue). Ainsi, bien que 20 à 25% des farines et huiles de poisson sont produites à partir de co-produits (IFREMER), l'aquaculture n'a fait que déplacer les problèmes de surexploitation

vers des espèces à plus faible valeur commerciale.

Cependant, l'aquaculture n'est pas responsable pour autant à elle seule de la surpêche. En effet, certaines techniques tel que le chalutage en eaux profondes ainsi que le non respect des réglementations par la pêche professionnelle ont une grande part de responsabilité dans l'extinction de certaines espèces du milieu naturel. Le chalutage de fond, très décrié en Europe, détruit les écosystèmes des fonds marins sur de grandes surfaces, capture des espèces non consommées et des individus n'ayant pas atteint leur maturité sexuelle qui seront rejetés (20 à 40% des captures) souvent blessés ou morts entraînant de graves conséquences sur le stock, notamment les géniteurs de ces populations.

1.3.4. Vers une aquaculture durable

L'aquaculture s'est considérablement développée dans les dernières décennies et les prévisions indiquent qu'elle est vouée à se développer encore d'avantage dans le futur. D'une part, car les techniques d'élevage ne cessent de progresser et le nombre d'espèces concernées ne cesse de croître et d'autre part, car la demande augmente soutenue par la hausse de la population mondiale. Néanmoins, les impacts de cette activité sur l'environnement sont multiples et aujourd'hui bien connus. Les autorités telles que la FAO insistent sur la prise de conscience de ces conséquences par les aquaculteurs mais aussi par les consommateurs. Depuis les années 2000, des programmes pour promouvoir une aquaculture durable se mettent en place. La composante essentielle de ces programmes porte sur la limitation de l'impact environnemental de la pisciculture et crevetticulture au travers de 3 aspects : l'amélioration de la qualité des aliments, l'utilisation de matières premières de substitution (d'origine végétale et animale) pour remplacer les farines de poissons dans les aliments, ainsi que le développement d'élevages en circuit fermé pour limiter la pollution issue des effluents. L'alimentation en aquaculture est un secteur clé pour développer une aquaculture durable.

2 L'alimentation en aquaculture

L'alimentation est un secteur clé pour l'aquaculture car elle est au cœur de problématiques aussi bien économiques qu'environnementales. Elle représente en effet la charge financière la plus élevée pour les aquaculteurs, soit au minimum 60% du coût de production (Kaushik, 2009). Mais comme cela a été évoqué dans le chapitre précédent, elle est également dépendante de la pêche professionnelle et participe aux problèmes d'épuisement des stocks. Pour développer une aquaculture durable, il est ainsi fondamental de pouvoir disposer d'aliments garantissant à la fois une croissance maximale des animaux et la gestion durable des stocks de poissons sauvages tout en ayant de faibles coûts de production. Cet objectif donne naissance à de nombreuses études scientifiques sur la nutrition des poissons et crustacés d'élevage et crée un riche domaine de recherche en évolution constante. L'objet de ce chapitre est de définir ce qu'est un aliment aquacole et de montrer l'évolution de sa formulation ainsi que les pistes actuelles de recherche.

2.1. L'aliment aquacole : définition et évolution

2.1.1. L'aliment aquacole

Formulation et fabrication

Un aliment aquacole complet est composé de plusieurs ingrédients, mélangés dans des proportions déterminées pour se compléter les uns les autres et former un régime alimentaire nutritionnellement complet. Différentes contraintes doivent être prises en compte autant à l'étape de la formulation qu'à celle de la fabrication. En effet, l'aliment aquacole doit être adapté aux animaux ciblés. Il doit prendre en compte l'espèce, le stade physiologique, les besoins nutritionnels ainsi que le comportement alimentaire de chaque animal. Ainsi, il doit non seulement être adapté en terme de composition nutritionnelle mais aussi en terme de texture et de taille. Pour répondre à ces contraintes, le choix des matières premières ainsi que celui du procédé de fabrication sont primordiaux. La formulation des aliments aquacoles est fondée en premier lieu sur l'apport des nutriments nécessaires à l'animal. Ils contiennent une source de protéines (farines de poisson et/ou d'origine végétale et/ou d'origine animale), une source de lipides (huiles de poisson et/ou d'origine végétale et/ou d'origine animale) une source de glucides ainsi que des mélanges de vitamines et de minéraux. Outre ces ingrédients principaux, les aliments aquacoles contiennent des additifs visant à compléter le profil nutritionnel, à améliorer l'appétence de l'aliment, à assurer sa stabilité et à améliorer sa texture. On trouve notamment des agents

attractants (acides aminés L, glycine-bétaïne, nucléoside...), des agents antioxydants (acide ascorbique, BHT, BHA...) ou des agents liants (alginate, pectine...).

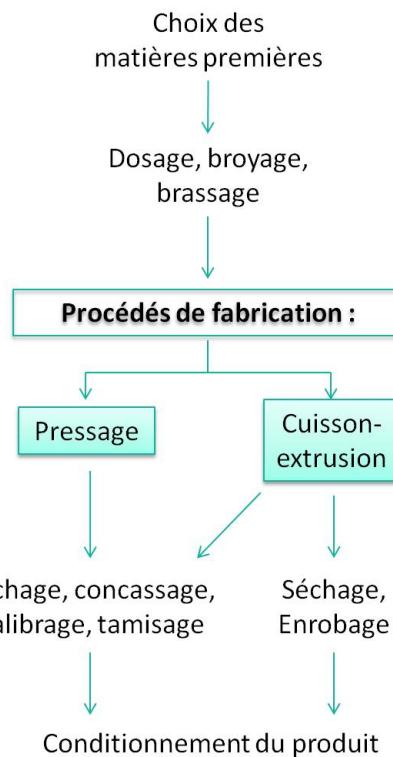


Figure 10 – Principe de fabrication d'un granulé

La texture de l'aliment, déterminant son comportement dans l'eau est également un critère important lors de sa fabrication.

Il existe trois types principaux d'aliments : les aliments pressés, les aliments extrudés et les aliments expensés. Les granulés pressés sont très denses et ont une teneur limitée à 14% en huile, 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" ou "coulants", l'ajout de matière grasse y est bien plus important (25 à 30%) (Guillaume *et al.*, 1999). Ces deux types de granulés sont obtenus par des procédés de fabrication différents : le pressage et la cuisson-extrusion (Figure 10). Ils consistent chacun en une série d'opération visant à associer plusieurs matières premières et à les mettre en forme pour obtenir des granulés. Les premières étapes, communes aux deux procédés, sont donc le choix des matières premières, leur dosage, leur broyage puis leur homogénéisation pour obtenir un mélange solide ou liquide. La mise en forme de l'aliment diffère quant à elle entre les deux procédés. 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 petits cylindres de longueur et de diamètre déterminés. La cuisson-extrusion repose quant à elle sur les effets de la température (90 à 120 °C) et de la pression (30 à 120 bar). Le mélange déposé dans un extrudeur est ainsi chauffé et mis sous pression pendant un temps court (moins de 30s) puis forcé à travers d'une filière et coupé par un couteau "granulateur". Pour certains mélanges, la vaporisation de

l'eau lors du retour à pression atmosphérique confère une structure alvéolaire (expansion) aux granulés. Pour les deux procédés, les granulés sont ensuite séchés et refroidis puis éventuellement enrobés. L'enrobage consiste à ajouter de la matière grasse contenant des acides gras essentiels, des vitamines liposolubles ou hydrosolubles en émulsion et des agents attractants. Il permet également de ralentir le délitement des granulés dans l'eau.

Production

Le secteur de la production d'aliments aquacoles est en pleine expansion, connaissant une croissance de 11% par an entre 1995 et 2008. Cette année là, la production d'aliments industriels atteignait 29.1 millions de tonnes. Elle est en grande partie réalisée en Chine qui fournit à elle seule près d'un tiers des aliments aquacoles. Bien que ces aliments ne soient destinés qu'à seulement 41.6% des élevages, la FAO estime que le besoin en aliments atteindra 71.0 millions de tonnes en 2020.

En effet, ces aliments sont destinés principalement aux poissons carnivores (saumon, truite, anguille, bar, daurade...), omnivores (tilapia, poissons-chats, carpes, poissons-Laits...) ainsi qu'aux crustacés (crevettes, crabes et homards), l'élevage des plantes aquatiques, des mollusques et des poissons "filtreurs" ne demandant pas d'apports d'aliments. En réalité, 8 espèces ou groupes d'espèces consomment à eux seuls 62.2% des aliments aquacoles produits (Figure 11).

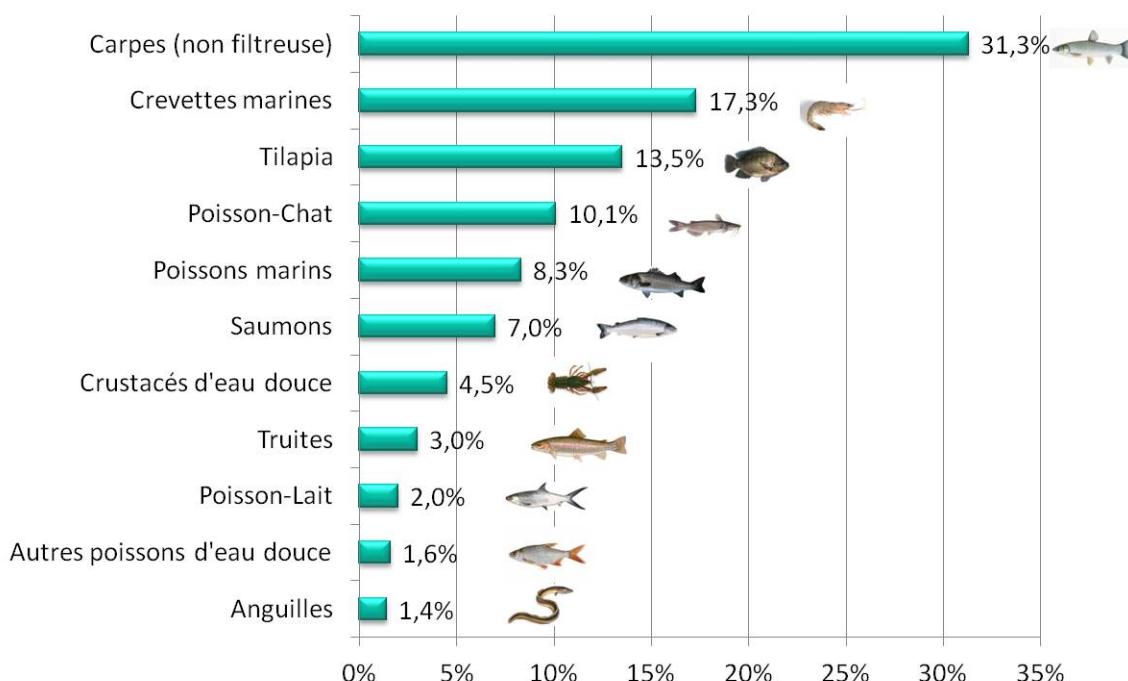
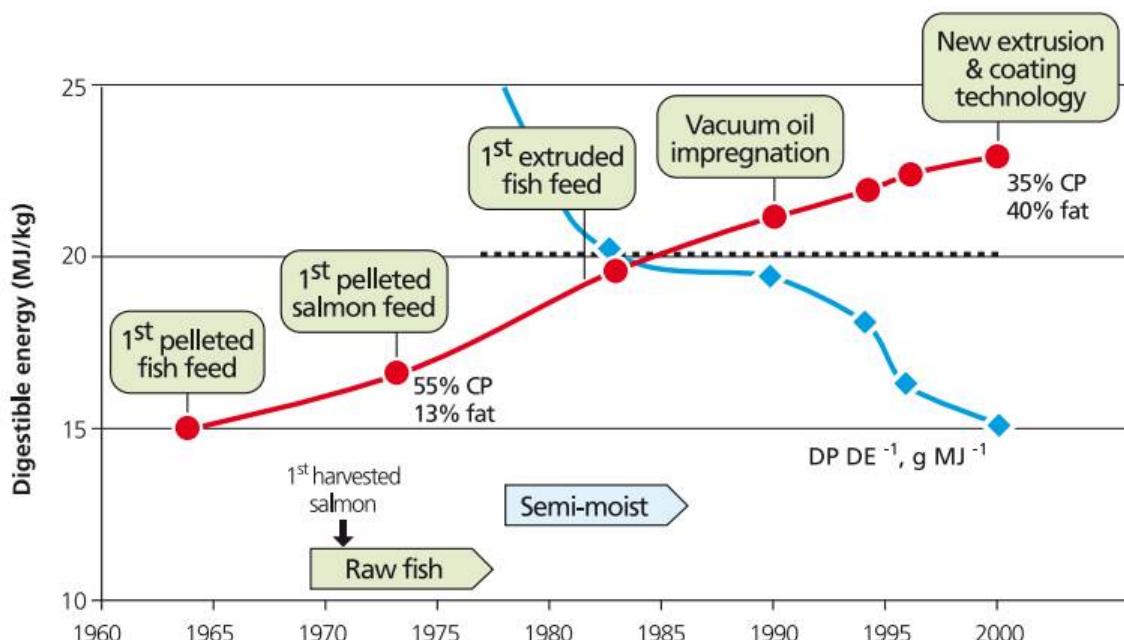


Figure 11 – Répartition de la consommation d'aliments aquacoles entre les principales espèces d'élevage en 2008 (Données FAO, 2012)

2.1.2. Des aliments traditionnels aux aliments hautement énergétiques

Traditionnellement, la pisciculture se déroulait en système extensif sans apports de nourriture. C'est avec l'apparition de la pisciculture intensive, spécialement la salmoniculture que sont nés les premiers aliments industriels. Les premiers saumons d'élevage sont apparus en Norvège dans les années 70s, ils étaient alors nourris avec des poissons entiers (Talbot et Rosenlund, 2002). Le développement des premiers aliments a été initié au début des années 60s et a été appliqué à la salmoniculture dans les années 80s. Il s'agissait de granulés semi-humides ou secs. Puis les granulés extrudés sont apparus dans les années 90s.



Note: CP = crude proteins; DE = digestible energy (MJ/kg); DP = digestible protein (g/kg).
Source: Talbot & Rosenlund (2002).

Figure 12 – Développement des aliments aquacoles pour la salmoniculture en Norvège
(Source : "Demand and supply of feed ingredient" (Tacon *et al.*, 2011))

La formulation d'aliments aquacoles pour une espèce cible repose sur les connaissances acquises sur ses besoins nutritionnels. Ceux-ci sont établis à partir de l'étude du régime alimentaire de cette espèce à l'état sauvage ainsi que sur l'étude de la composition chimique de cette espèce. Ces connaissances en nutrition des poissons ont considérablement évolué depuis les 50 dernières années permettant avec les progrès technologiques une amélioration importante des aliments aquacoles. Talbot et Rosenlund (2002) montrent que l'évolution des aliments destinés à la salmoniculture s'accompagne d'une augmentation de l'énergie digestible des aliments (Figure 12). Beaucoup d'études ont été réalisées sur les salmonidés et leurs besoins nutritionnels sont ainsi bien documentés. L'élevage des poissons marins carnivores est apparu plus tard et les aliments aquacoles destinés à ces espèces se sont d'abord appuyés sur ceux des salmonidés. Néanmoins,

les besoins nutritionnels des poissons marins sont de mieux en mieux cernés et la formulation des aliments s'est peu à peu affinée (Guillaume *et al.*, 1999).

Les premiers aliments aquacoles étaient élaborés avec des farines et des huiles de poisson. Ces farines contiennent en effet une teneur élevée en protéines (l'une des sources d'énergie principale chez les poissons) ainsi que tous les acides aminés indispensables (AAI). Les huiles de poisson sont quant à elles, une source de lipides et notamment d'acides gras essentiels.

Dans les années 70s, des études ont été menées pour diminuer le taux de protéines dans les aliments dans l'objectif de diminuer la dépendance en farine de poisson ainsi que la quantité de déchets azotés produits par les animaux d'élevage (Medale et Kaushik, 2009). La teneur en protéines a donc progressivement diminué dans les aliments en faveur de l'utilisation de lipides hautement caloriques (Corraze et Kaushik, 1999). Une telle substitution a eu pour conséquence une augmentation des dépôts lipidiques dans la chair des poissons (Watanabe, 1982; Greene et Selivonchick, 1987; Arzel *et al.*, 1994; Corraze, 1999). Elle s'est également accompagnée d'une augmentation de l'utilisation d'autres composants comme les co-produits d'abattoir (farine de plume, de viande, d'os, de sang) de l'industrie laitière (bactéries, lactosérum) et de brasserie (drèche de brasserie, malt) (Medale et Kaushik, 2009).

En 2000, l'utilisation de farines issues d'animaux terrestres dans les aliments y compris aquacoles a été interdite en Europe en raison de la crise sanitaire de la vache folle (Arrêté du 14 novembre 2000, LegiFrance 2000). Ces sources de protéines restent cependant utilisées dans de nombreux pays. Certains produits ont été réintroduits en 2006 (farines de plumes et de sang) mais leur utilisation reste très restreinte en France. Toutefois 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). Ces PAT sont produites à partir de co-produits d'animaux destinés à l'alimentation humaine (sous-produits de catégories 3) contrairement aux farines animales qui provenaient d'animaux destinés à l'incinération ou à l'utilisation comme matières fertilisantes (sous-produits de catégorie 1 et 2).

2.1.3. Les farines et huiles de poisson

Qualités nutritionnelles

Les farines et huiles de poisson sont les premières sources de protéines et de lipides pour la fabrication des aliments aquacoles. Leur utilisation tend à diminuer en faveur d'autres sources de nutriments mais elles font, aujourd'hui encore, partie des ingrédients principaux. Les farines de poisson sont riches en protéines, selon leur origine, elles en contiennent entre 58 et 70%. La quantité de protéines dépend du type d'organes et de l'espèce utilisés pour son élaboration.

Tableau 2 – Composition (en % de la matière sèche) et valeur nutritive des farines de poisson

Matière brute	Protéine	Matière grasse	Cendre	Énergie (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

Production

Les farines de poisson sont produites par cuisson, presse-séchage et broyage de poissons ou de co-produits. Il faut environ 4 à 5 kg de poisson frais pour obtenir 1 kg de farine de poisson. L'huile de poisson est un sous produit de ce processus, 100g d'huile sont produits pour 1 kg de farine (De Silva et Anderson, 1995). Les poissons utilisés pour cette production sont des poissons de faible valeur commerciale souvent appelés poissons fourrages, pêchés dans le but de faire de la farine de poisson (pêche minotière) ou en capture accessoire résultant du chalutage de poisson de consommation.

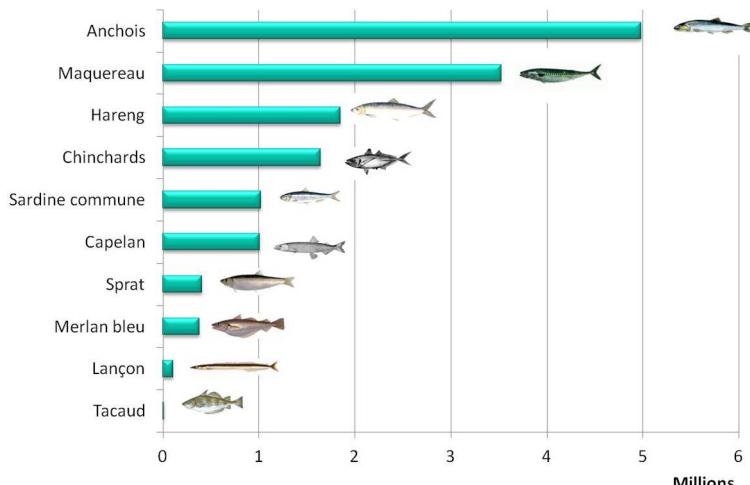


Figure 13 – Tonnages des principaux "poissons fourrages" provenant de capture en 2012". FAOSTAT

La production mondiale de farine de poisson se partage entre les pays de l'Europe du Nord et de l'Amérique du sud. L'Europe (Norvège, Danemark, Islande, Royaume-Unis) capture essentiellement le hareng (*C. harengus*), le capelan (*M. villosus*), le sprat (*S. sprattus*), le merlan bleu (*M. poutassou*), le lançon (*Amodytes spp*) et le tacaud (*T. luscus*). Quant à l'Amérique du sud (Pérou, Chili), elle cible d'avantage l'anchois (*Engraulis spp*), le maquereau (*Scomber spp*), le chincharde (*Trachurus spp*) et la sardine (*S. pilcharus*).

Dans certains pays (France, Allemagne, Italie, Espagne, Canada, Namibie, Sénégal) la totalité de la production est issue de co-produits (Jackson, 2009). Néanmoins, au niveau mondial, cela représente seulement 24.8% de la production de farine de poisson (Jackson, 2009). De plus, les principaux pays producteurs, le Pérou et le Chili, utilisent très peu de co-produits, seulement 2 et 12% respectivement de leur production en sont issus. Même si la plupart des poissons fourrage sont très peu destinés à la consommation humaine directe (moins de 2% à l'exception

du merlan bleu, 25% ; IFREMER, 2008), la FAO estime que 33 à 50% de ces ressources (9.23 à 13.97 million de tonnes) sont exploitées (Figure 13).

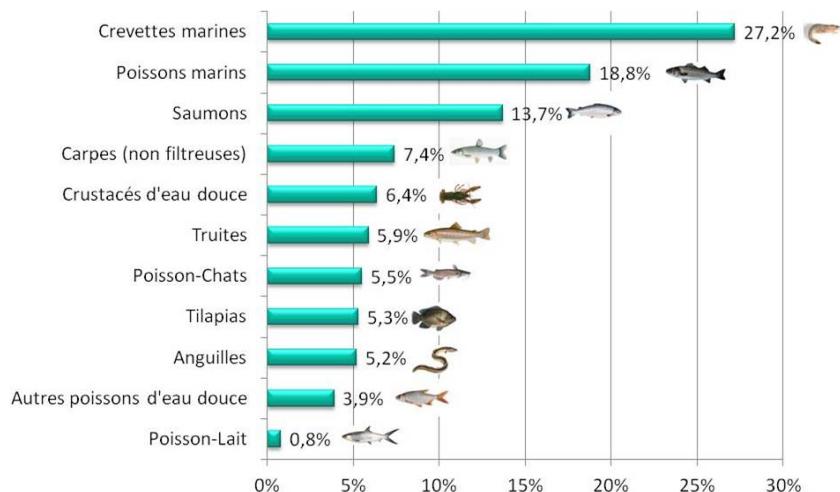


Figure 14 – Répartition de la consommation de farines de poisson entre les principales espèces d'élevage en 2008 (Données FAO, 2012)

La figure 14 illustre les principales espèces de poissons ou crustacés bénéficiant des farines de poisson. Elles sont bien sûr destinées aux espèces les plus demandeuses en aliments aquacoles. Néanmoins, le taux d'incorporation de farines de poisson dans l'aliment est très différent selon les espèces, ainsi, la crevetticulture est le domaine qui consomme le plus de farines de poisson suivi par l'élevage des poissons marins et des saumons.

2.2. Introduction des farines d'origine végétale dans l'alimentation des poissons carnivores

2.2.1. Vers l'utilisation des farines d'origine végétale

L'utilisation des farines et huiles de poisson dans l'alimentation des animaux d'aquaculture se réduit peu à peu et la tendance devrait se confirmer dans les prochaines années (Tacon *et al.*, 2011). La proportion de farines de poisson dans les aliments a diminué entre 1995 et 2010 (Figure 15). Elle était comprise entre 10% pour des espèces comme les carpes et les tilapias et 50% pour les poissons marins carnivores en 1995. En 2010, elle était comprise entre 2 et 26% pour ces mêmes espèces. Les estimations prévoient un taux d'incorporation compris entre 1 et 12% en 2020 (Tacon *et al.*, 2011).

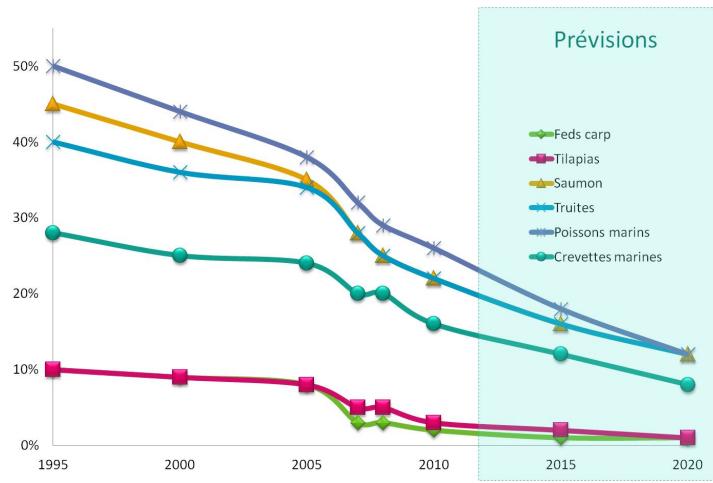


Figure 15 – Evolution du taux d'incorporation des farines de poisson dans les aliments destinés aux principales espèces aquacoles

Cette diminution s'explique par l'augmentation du prix de cette ressource (Figure 16) résultant de l'augmentation de la demande et de la diminution de la disponibilité en poissons fourrage. Les sources de protéines et de lipides d'origine marine ont donc été partiellement remplacées par des sources d'origine végétale. Aujourd'hui les ingrédients principaux sont les farines ou dérivés d'origine végétale (farine de soja, tourteaux et farines de graines oléagineuses, céréales et sous produits ainsi que les huiles végétales)(Hasan et Halwart, 2009). Actuellement, les aliments destinés au bar peuvent contenir jusqu'à 80% de protéines d'origine végétale (/protéines totales).



Figure 16 – Evolution du prix à la tonne des farines de poisson depuis 1998 (Indexmundi)

Tableau 3 – Composition et inconvénients des principales farines d'origine végétale (Medale et Kaushik, 2009)

Produits végétaux	Teneurs en protéines (%)	AAI limitants	Substances indésirables	Commentaires
Tourteau de soja	45	Met Lys Thr	Antitrypsiques Phosphore phytique Phyto-estrogène Oligosaccharides	Disponible sur le marché Profil en AAI Proche de la farine de poisson Peu d'amidon Provoque des entérites
Tourteau de colza	35	Lys Met	Polysaccharides non amy lacés Phosphore phytique Fibres (12%) Glucosinolates	Nouvelles variétés avec moins de glucosinolates
Tourteau de coton	40-42	Lys Met Cys	Gossypol Fibres (teneur élevée)	Faible prix Nouvelles variétés moins de gossypol
Tourteau de tournesol	36	Lys	Polyphénols Fibres	Peu de facteurs antinutritionnels
Tourteau d'arachide	48-50	Lys Met	Aflatoxine	Peu de facteurs antinutritionnels
Pois	26	Lys Met	Amidon (55%) Oligosaccharides (5%)	Substances indésirables enlevées avec la peau
Lupin	39	Lys Met	Alcaloïdes Oligosaccharides (8%) Polysaccharides non amy lacés	Peu d'amidon 10% de lipides

2.2.2. Composition des farines d'origine végétale

Inconvénients par rapport aux farines de poisson

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 farines de poissons. 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 (Medale 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 (Medale et Kaushik, 2009).

Pour la plupart des farines d'origine végétale, le taux de protéines (30-40%) est bien plus faible que celui des farines de poisson. Il existe néanmoins des exceptions, les concentrés de soja et de colza ainsi que le gluten de blé et de maïs, qui contiennent 60 à 80% de protéines (Medale et Kaushik, 2009) mais dont le prix est élevé. Outre, une teneur en protéines plus faible, ces matières premières possèdent un profil en AAI moins adapté aux besoins des poissons. En effet, elles ont généralement une teneur plus faible en méthionine et en lysine, voire parfois en cystéine ou en thréonine (Medale et Kaushik, 2009).

Tableau 4 – Les différentes catégories de facteurs antinutritionnels et leurs propriétés (d'après Francis et al., 2001)

Catégories	Facteurs antinutritionnels	Stabilité	Commentaires
1	Lectines	Thermolabiles	Inhibent la trypsine (voir la chymotrypsine). Très présents dans les tourteaux de soja.
	Facteurs antitrypsiques	Thermolabiles	
2	Tanins	Thermolabiles	Peut diminuer la digestibilité des protéines. Très stable.
	Polysaccharides non-amylés	Thermostables	
	Antivitamines	Thermolabiles	
3	Acide phytique	Thermolabile	Diminue l'appétence car amer
	Gossypol	(-)	
	Oxalates	(-)	
	Glucosinolates	Thermolabiles	
4	Saponine	Thermostable	
	Phytoestrogènes	Thermostables	
	Mycotoxines	Thermostables	
	Mimosine	Thermostable	
	Cyanogènes	Thermostables	
	Nitrates	Thermostables	
	Alcaloïdes	Thermostables	
	Antigènes protéiques	Thermostables	

De plus, les farines d'origine végétale contiennent des éléments nocifs pour les poissons et les crustacés. Il s'agit d'une part des glucides, présents en grande quantité et d'autre part des facteurs antinutritionnels. Les végétaux contiennent en effet, des taux élevés d'amidon, faiblement digestibles pour les poissons ainsi que de nombreux glucides pariétaux complexes (pectines, cellulose, hemicellulose, lignines, pentosanes) (Guillaume *et al.*, 1999). Ils contiennent également de nombreuses molécules qui freinent la digestion ou l'utilisation métabolique des nutriments, appellées facteurs antinutritionnels (Makkar, 1993).

Ces facteurs antinutritionnels peuvent être classés en 4 catégories en fonction de leur activité (Tableau 4). Il existe des facteurs nutritionnels agissant sur l'utilisation et la digestion des protéines (Catégorie 1), sur l'utilisation des minéraux (Catégorie 2), les antivitamines (Catégorie 3) et enfin les autres facteurs antinutritionnels (Catégorie 4).

Certains facteurs antinutritionnels sont thermolabiles, ils peuvent ainsi être détruits totalement ou en partie grâce à une étape de chauffage lors du processus de transformation en farine ou en aliment. Les autres facteurs antinutritionnels peuvent être éliminés par extraction ou traitement enzymatique.

Améliorations apportées

Les premières études sur la substitution des farines de poisson par des farines d'origine végétale révélaient une baisse des performances de croissance (Dabrowski et Kozak, 1979; Abel *et al.*, 1984; Shiao *et al.*, 1987). Cependant, depuis les années 80s, des améliorations ont été apportées à ce type de matière première permettant ainsi d'augmenter la part des farines d'origine végétale dans les aliments sans modification des performances. Aujourd'hui, les aliments commerciaux peuvent contenir jusqu'à 80% (des protéines totales) de matières d'origine végétale grâce à différentes évolutions techniques.

Les processus de fabrication des farines d'origine végétale ont évolué et permettent désormais d'augmenter la teneur en protéines et de limiter la concentration en facteurs antinutritionnels dans ces ingrédients. Par exemple, le concentré protéique de soja, obtenu par extraction aqueuse ou au méthanol de la farine de soja contient un taux supérieur de protéines, il est également plus pauvre en polysaccharides non amylosés, en fibres et en saponines que la farine de soja. De plus, les carences en méthionine et lysine des farines d'origine végétale sont compensées par l'ajout d'acides aminés de synthèse. Enfin, les facteurs antinutritionnels peuvent être totalement ou en partie éliminés grâce à des traitements spécifiques.

2.2.3. Conséquences sur les poissons carnivores

Il existe un grand nombre d'études scientifiques visant à étudier l'effet de la substitution de la farine de poisson par des farines d'origine végétale. Ces études menées sur des modèles animaux différents, avec diverses sources d'intrants végétaux, utilisant différentes approches méthodologiques aboutissent à des résultats contradictoires. Cependant, grâce aux

améliorations décrites dans le paragraphe précédent, il semble qu'il existe un taux de substitution limite en dessous duquel aucun effet néfaste sur les performances de croissance n'est observé. Néanmoins, pour les forts taux de substitution appliqués actuellement, des conséquences sur le métabolisme et la santé des animaux sont rapportées par un certain nombre d'auteurs.

Sur la croissance

Les effets de la substitution des farines de poisson par les farines d'origine végétale ont beaucoup été étudiés chez les salmonidés. Il existe aujourd'hui des méta-analyses portant sur des dizaines d'études réalisées chez *S. salar* et *O. mykiss*.

Les travaux de Collins *et al.* (2013) s'attachent à l'étude de 6 sources de protéines d'origine végétale chez les salmonidés, incluant la farine de pois, de soja et de colza ainsi que les concentrés protéiques correspondants. Les résultats indiquent une diminution de la croissance sauf pour la farine et le concentré protéique de pois qui n'ont pas d'influence sur le taux de croissance spécifique. L'étude conclut ainsi sur un impact négatif de la substitution des farines de poisson par certaines matières premières d'origine végétale. Cependant, cette étude soulève différents points intéressants. Premièrement, il y a une influence des processus de fabrication sur la qualité des aliments (non inclus dans cette étude). Deuxièmement, ces résultats portent sur des études menées depuis au moins 25 ans, elles sont donc à pondérer avec les progrès techniques des dernières décennies. Les auteurs soulignent l'importance de la qualité du régime témoin ainsi que de l'équilibre nutritionnel entre les différents régimes expérimentaux d'une même étude. Ces deux facteurs peuvent expliquer les résultats de certaines études qui montrent des performances de croissance identiques voire supérieures des matières d'origine végétale.

Ainsi, de nombreuses études récentes rapportent des performances de croissance maintenues pour des taux de substitution par des matières d'origine végétale autour de 60 à 80% (Gomes *et al.*, 1995; Médale *et al.*, 1998; Glencross *et al.*, 2004). Chez *D. labrax*, aucune diminution des performances de croissance n'est observée pour des taux de substitution de 65% (Oliva-Teles et Gonçalves, 2001), 77% (Messina *et al.*, 2010), 95% (Kaushik *et al.*, 2004).

Sur l'appétence

L'impact de la substitution de la farine de poisson par des farines d'origine végétale n'est pas clairement établi. Plusieurs auteurs observent une diminution de la prise alimentaire (Gómez-Requeni *et al.*, 2004; Fowler, 1980; Smith *et al.*, 1988; Wilson, 1992) alors que d'autres ne rapportent pas d'impact d'une telle substitution sur la prise alimentaire (Montero *et al.*, 2005; Carter et Hauler, 2000) et ce même pour une substitution presque totale (Kaushik *et al.*, 2004).

Sur le métabolisme

Le métabolisme des lipides est affecté par l'utilisation de farines d'origine végétale. Une réduction du taux plasmatique de cholestérol a été rapportée chez *S. aurata* (Gómez-Requeni *et al.*, 2004) et *O. mykiss* (Kaushik *et al.*, 1995b).

La présence de farines d'origine végétale a aussi une incidence sur l'activité des protéases. Santigosa *et al.* (2008) montrent que l'introduction de matières d'origine végétale dans l'alimentation annule le pic d'activité des protéases 3 heures après la prise alimentaire chez *O. mykiss* et diminue le pic d'activité à 6 heures post-prandiale chez *S. aurata*.

Les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes ainsi que les transporteurs d'acides aminés 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 matières d'origine végétale 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 (Bureau *et al.*, 1998; Bakke-McKellep *et al.*, 2000b; Olli *et al.*, 1995) ainsi que l'activité de la γ -glutamyltranspeptidase chez *D. labrax* (Tibaldi *et al.*, 2006). Ces 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 *S. aurata* ainsi qu'une baisse de l'activité de la maltase chez *C. auratus*. La farine de colza entraîne quant à elle, une diminution de l'activité de phosphatase alkaline et de la γ -glutamyltranspeptidase chez *S. aurata* mais aucune modification chez *C. auratus* (Silva *et al.*, 2010).

Une altération de l'absorption des acides aminés par les entérocytes a été mise en évidence chez *O. mykiss* et *S. aurata* (Santigosa *et al.*, 2011). La substitution totale de la farine de poisson entraîne une diminution de l'absorption globale chez ces deux espèces. Cependant, pour une substitution de 75%, l'absorption globale des acides aminés est maintenue chez *O. mykiss* contrairement à *S. aurata*. Il semble que *O. mykiss* soit capable de mettre en place des mécanismes pour limiter les effets délétères des matières d'origine végétale. En effet, les auteurs observent 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.

Des études plus récentes réalisées par qPCR et micro-array rapportent que la substitution des farines de poisson entraîne relativement peu de modification du profil d'expression des gènes. Panserat *et al.* (2009) montrent que la substitution totale de la farine et de l'huile de poisson entraîne une modifications du profil d'expression dans le foie chez *O. mykiss*. Environ 200 gènes sont concernés, soit moins de 2% des gènes testés, impliqués notamment dans le métabolisme protéique et lipidique. Chez *H. hippoglossus*, le profil d'expression dans l'intestin varie peu lors de la substitution de 30% des farines de poisson par de la farine de soja (Murray *et al.*, 2010).

Sur la composition de la chair

La substitution des farines de poisson par les farines d'origine végétale semble n'entraîner que peu de modifications au niveau de la composition de la chair et des qualités organoleptiques jusqu'à un certain seuil. Moreira *et al.* (2014) montrent qu'une substitution jusqu'à 75% n'entraîne pas de modification du profil des molécules volatiles du muscle chez la sole sénégalaise (*Solea senegalensis*). Néanmoins, la substitution totale des farines de poisson entraîne une modification de la couleur et de l'odeur de la chair (Francesco *et al.*, 2004).

Sur la santé

L'utilisation des farines d'origine végétale a également des conséquences sur la santé des poissons. La farine de soja est connue pour engendrer une inflammation dans la partie distale de l'intestin chez les salmonidés (Van den Ingh *et al.*, 1991; Baeverfjord et Krogdahl, 1996). Cette entérite est caractérisée par des altérations de la muqueuse intestinale se traduisant par une diminution de la longueur des replis intestinaux, un amincissement de la lamina propria et de la sous-muqueuse, une diminution du nombre de vacuoles supranucléaires ainsi qu'une infiltration de leucocytes dans la lamina propria et la sous-muqueuse (Baeverfjord et Krogdahl, 1996). Des effets similaires ont été rapportés chez *C. carpio* (Urán *et al.*, 2008). Hormis les salmonidés les effets sont peu connus chez d'autre poissons. Des essais menés chez *G. morhua*, *I. punctatus*, *H. hypoglossus* et *S. aegyptiaca* ne révèlent pas d'altérations histologiques au terme de 9 semaines avec un aliment contenant du soja. Néanmoins, de récentes études transcriptomiques revèlent une modification de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Lilleeng *et al.* (2009) montrent qu'il y a une diminution de l'expression de TGF- β (Transforming Growth Factor β) et de GILT (Interferon γ inducible lysosomal thiol reductase) dans les stades précoce de l'entérite chez *S. salar*.

2.3. Vers de nouveaux ingrédients et matières premières

De nombreuses sources de protéines et nouveaux ingrédients sont utilisés ou à l'étude pour venir améliorer les qualités nutritionnels des aliments actuels. Ils peuvent être utilisés dans l'objectif d'améliorer les performances de croissance et/ou la santé des animaux d'élevage.

2.3.1. Vers de nouvelles sources de protéines

Le Krill

Le krill est intéressant comme source de protéines d'origine marine car son profil en AAI est proche de celui des farines de poisson (Tableau 5). La substitution totale de la farine de poisson par la farine de krill a été réalisée avec succès chez la truite arc-en-ciel et la morue (Moren

et al., 2007). Néanmoins, la farine de krill est très riche en fluor (1000 à 6000 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.

Tableau 5 – Comparaison de la composition de la farine de krill et des farines de poisson (donnée FAO et Watanabe, 2002)- Médale et Kaushik, 2009

AAI	Farine de Krill	Farine de poisson
Protéines brutes	60	66-72
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
Phenylalanine-Tyrosine	8.7	7.0
Thrénanine	4.3	4.2
Tryptophane	1.2	1.0
Valine	5.4	5.1

Aujourd’hui, la farine de Krill est plutôt utilisée comme ingrédient à hauteur de 5 à 10% dans les aliments pour exploiter ses propriétés de stimulation de l’appétit dans des aliments à base de farines d’origine végétale (Palti *et al.*, 2006). La farine de krill est également très adaptée à l’alimentation des larves et des juvéniles de poissons marins grâce à sa richesse en phospholipides (Salze *et al.*, 2005). Cependant les ressources mondiales sont limitées, la biomasse est estimée à 44 millions de tonnes, et d’importants quotas de pêche sont imposés (Hewitt *et al.*, 2002) rendant l’utilisation de cette matière première limitée.

Les insectes

L’utilisation de protéines animales provenant d’insectes est un domaine émergeant tant pour l’alimentation humaine qu’animale. Les insectes sont depuis très longtemps utilisés comme source complémentaire de nourriture en Asie, Afrique et Amérique du Sud. L’idée de les utiliser en alimentation animale est apparue il y a 40 ans (Calvert *et al.*, 1969) mais ce n’est que très récemment que leur utilisation en aquaculture a réellement attiré l’attention (Ogunji *et al.*, 2006). La plupart des espèces d’insectes ont une teneur en protéines comprise entre 34.6 et 66.0% (Barroso *et al.*, 2014), ce qui est équivalent à la farine de soja et inférieur à la farine de poisson. Il en est de même pour le profil en AAI qui est dépendant de l’espèce mais globalement plus proche de celui de la farine de soja (Barroso *et al.*, 2014). Néanmoins, plusieurs études ont été réalisées dans les dernières années pour évaluer l’impact de leur utilisation chez la truite arc-en-ciel (St-Hilaire *et al.*, 2007; Sealey *et al.*, 2011), le tilapia du nil (Jabir *et al.*, 2014), le mudfish (Achionye-Nzeh et Ngwudo, 2003) et le turbot (Kroeckel *et al.*, 2012). Elles tendent à montrer que la substitution de la farine de poisson jusqu’à 30% n’aurait pas d’impact négatif sur la croissance. Cette ressource, comparée aux farines d’origine végétale, reste intéressante car

elle n'est pas concurrencée par l'alimentation humaine et nécessite moins de ressources (surface, produits chimiques, eau) que la culture de soja. Des études complémentaires restent nécessaires pour vérifier le potentiel de cette source de protéines en alimentation aquacole. De plus, la production des insectes n'est pas actuellement développée à l'échelle industrielle et souffre de barrières réglementaires notamment en Europe.

Les co-produits d'origine marine

Les co-produits issus de la transformation des crustacés, mollusques et poissons sont également une source intéressante de protéines pour l'alimentation aquacole. Outre leur transformation en farines, ils peuvent être valorisés sous forme d'hydrolysat. Les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles ainsi que les conséquences de leur introduction dans les aliments aquacoles font l'objet du chapitre suivant.

Autres sources

D'autres sources de protéines sont également exploitées. Parmi elles, on trouve les SCP (Single Cell Proteins) regroupant les champignons, les levures, les bactéries et les micro-algues (Davies et Wareham, 1988). Les micro-algues sont riches en protéines(jusqu'à 70%) et en acides gras essentiels et possèdent un profil adapté en acides aminés (Becker, 2007). Elles constituent ainsi une matière première intéressante pour l'alimentation humaine et animale. On estime qu'environ 30% de la production mondiale de micro-algues est destinée à l'alimentation animale aujourd'hui (Becker, 2004). Les macro-algues sont également exploitées pour l'alimentation des poissons d'élevage. Comme pour les micro-algues, plusieurs études rapportent que leur incorporation dans l'alimentation a des effets bénéfiques chez plusieurs espèces (Sugita *et al.*, 2010; Nakagawa, 1997) probablement grâce à leur richesse en vitamines, en minéraux et en composés bioactifs (Mustafa *et al.*, 1995).

2.3.2. Vers des ingrédients capables d'améliorer le bien-être et la santé animal

Les probiotiques

A la base, les probiotiques sont des bactéries vivantes administrées pour coloniser le tractus digestif et améliorer la réponse immunitaire de l'hôte (Gatesoupe, 1999). Une définition plus élargie est proposée par Merrifield *et al.* (2010) : les probiotiques comprennent les cellules bactériennes mortes, vivantes ou fractionnées qui, administrées *via* l'alimentation ou l'eau, apportent des bénéfices à l'hôte en terme de résistance aux pathogènes, d'état global de santé, de performances de croissance, d'utilisation de l'aliment et de résistance au stress grâce à une action sur l'équilibre de la flore commensale intestinale ou sur la flore bactérienne des bassins.

L'utilisation des probiotiques est largement répandue en aquaculture (Gatesoupe, 1999; Vine *et al.*, 2006).

Le milieu aquatique est en équilibre entre des bactéries bénéfiques ou neutres et des bactéries pathogènes (Schulze *et al.*, 2006). Or, en élevage, des problèmes de qualité de l'eau peuvent rompre cet équilibre et engendrer le développement des bactéries pathogènes (Karunasagar *et al.*, 1994).

Les probiotiques sont considérés comme additifs alimentaires et répondent donc à une réglementation particulière (En Europe Réglementation EC n° 1831). Leur mise sur le marché est lourde et nécessite une identification précise de la souche, une caractérisation des effets *in vitro* ainsi qu'une évaluation de leur dangerosité *in vivo*. Elle fait également face à des difficultés techniques en terme de stabilité lors de la fabrication et du stockage des aliments.

Les prébiotiques

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non-digestibles apportant à l'hôte une stimulation de la croissance et/ou des bactéries intéressantes pour la santé de l'hôte (Gibson et Roberfroid, 1995). Ils ont été développés comme alternative ou pour l'utilisation conjointe avec des probiotiques (synbiotiques), s'affranchissant de certaines difficultés rencontrées avec les probiotiques (Merrifield *et al.*, 2010). Les principaux prébiotiques sont des oligosaccharides connus pour promouvoir la croissance des bactéries bénéfiques pour la santé de l'hôte dans le tractus digestif (Gibson *et al.*, 2005). On trouve l'inuline, le transgalactooligosaccharide (TOS), le lactulose, le fructooligosaccharide (Roberfroid, 2007). Les monooligosaccharides (MOS) ont également été introduits en aquaculture dans les années 2000s (Dimitroglou *et al.*, 2009). Il s'agit de glucomannoprotéine-complexe extrait de la paroi de la levure (*S. cerevisiae*). Son utilisation a montré une amélioration des performances de croissance chez plusieurs espèces dont le bar (*D. labrax*; Torrecillas *et al.* 2007), la daurade (*S. aurata*; Gürtepe *et al.* 2011), la carpe (*C. carpio*; Akrami *et al.* 2012) et la truite (*O. mykiss*; Yilmaz *et al.* 2007). Des effets bénéfiques sur la flore commensale intestinale, le développement de l'intestin, la réponse immunitaire sont également rapportés (pour revue Torrecillas *et al.*, 2014).

Autres ingrédients

D'autres ingrédients sont utilisés en aquaculture pour renforcer le système immunitaire des animaux d'élevage et prévenir ainsi l'apparition d'événements infectieux. Parmi ces ingrédients, les extraits de plantes semblent très intéressants. En effet, ces derniers possèdent de nombreuses activités biologiques, ils permettent de stimuler l'appétit et la croissance ainsi que le système immunitaire des animaux (Reverter *et al.*, 2014). De plus, certains extraits de plantes possèdent un activité antibactérienne et antiparasitaire (Reverter *et al.*, 2014). Leur richesse en principes actifs dont les alkaloïdes, les terpenoïdes, les flavonoïdes, ou les huiles essentielles serait responsable de leur activité biologique (Chakraborty et Hancz, 2011; Citarasu, 2010). Les acides or-

ganiques dont l'acide lactique, l'acide citrique ou l'acide formique sont également des molécules permettant de stimuler la croissance ou le système immunitaire des animaux d'élevage (Romano *et al.*, 2014).

3 Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique

3.1. Définition

3.1.1. Les co-produits et leur valorisation

Les co-produits de poissons et de crustacés sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Cela inclut la tête, les viscères, la chute de parage (filetage), les arêtes, la peau, les écailles et la queue (Figure 17). Ils représentent 30 à 60% de l'animal et sont générés par trois types de production : le mareyage, le salage-saurissage et la conservation.

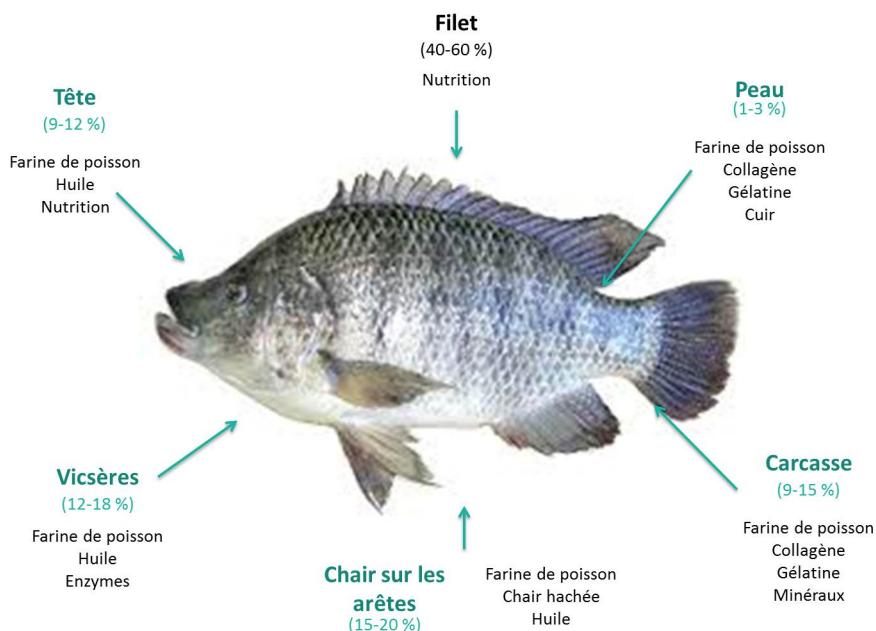


Figure 17 – Les produits dérivés des co-produits de poisson (d'après Guerard, 2004)

Ils sont ainsi obtenus à partir de la transformation des captures ou des animaux d'élevages destinés à la consommation humaine. La quantité de co-produits générés chaque année est très importante, elle est estimée à 63 millions de tonnes (Rai *et al.*, 2012). Elle provient des animaux d'élevage (environ 60 millions de tonnes/an) et des animaux issus de capture destinés à l'alimentation humaine (76% des captures totales, soit 68.4 millions de tonnes en 2010) (Olsen

et al., 2014). Or, la tendance actuelle est à la mise sur le marché des poissons transformés, notamment les filets, générant ainsi de plus en plus de co-produits.

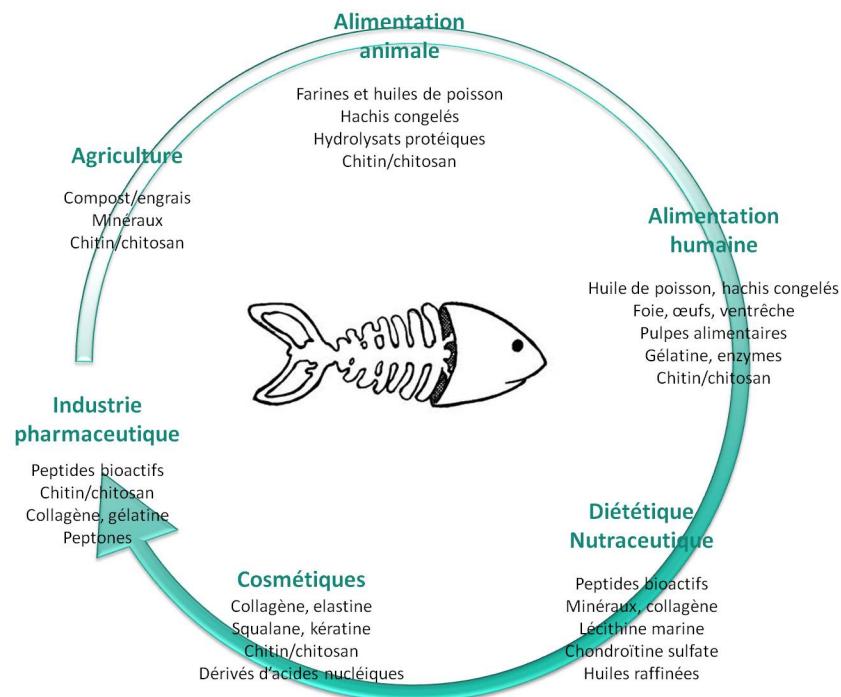


Figure 18 – Voies de valorisation des co-produits (Source : IFREMER)

Il est très intéressant d'un point de vue économique et environnemental de développer des voies de valorisation pour ce type de matières premières et de nombreuses études sur le sujet sont réalisées depuis une vingtaine d'années (FAO, 2012). Aujourd'hui, de nombreuses voies de valorisation ont été développées (Figure 18). Par exemple, l'agriculture et l'industrie de l'énergie utilisent les co-produits en les transformant principalement en engrais pour l'enrichissement des sols, en chitosan ou en biocarburant. Ces voies de valorisation apportent peu de valeur ajoutée aux produits mais sont majoritaires en terme de tonnage. Les co-produits sont également utilisés pour l'alimentation humaine et animale ainsi que par l'industrie nutraceutique en raison de leur forte teneur en protéines à haute valeur ajoutée, en acides gras insaturés, en minéraux ainsi qu'en vitamines et en antioxydants. Dans ce domaine, la principale voie de valorisation en terme de tonnage est la transformation en farine et huile brute de poisson utilisées en alimentation animale comme sources de protéines et de lipides. Les huiles peuvent aussi être raffinées à partir des huiles brutes pour être enrichies en acides gras insaturés dont les oméga3 EPA et DHA. La seconde voie de valorisation en terme de tonnage est la fabrication de hachis congelés. Ils sont fabriqués à partir de tous les co-produits à l'exception des viscères et sont utilisés en alimentation humaine et animale. Enfin, une troisième voie de valorisation importante est leur hydrolyse enzymatique menant à un ingrédient plus riche en protéines que les farines de poisson, leur bonne digestibilité ainsi que leur appétence les rendent intéressants pour l'alimentation animale. Il existe, de plus, des voies de valorisation à haute valeur ajoutée destinées aux industries cosmétique et pharmaceutique. Des molécules à haute valeur ajoutée peuvent être

isolées pour leurs propriétés bioactives telles que la chitine et le chitosan utilisés pour leurs propriétés floculantes, antioxydantes et immunostimulatrices, la gélatine et le collagène isolés dans la peau et les arêtes, la chodroïtine sulfate, des peptides bioactifs ou des enzymes.

3.1.2. L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est une des voies de valorisation des co-produits intéressante car elle permet de concentrer et valoriser les protéines d'origine marine sous la forme de farines solubles avec une granulométrie très fine. Les hydrolysats peuvent être obtenus de deux manières : l'autolyse ou l'hétérolyse. Dans le premier cas, l'hydrolyse est opérée par les enzymes endogènes d'origine gastrique et pancréatique (pepsine, trypsine, chymotrypsine) et lysosomale (cathépsine) (Raa *et al.*, 1982). Ce procédé est appliqué depuis l'antiquité, par exemple pour la fabrication des sauces de poisson en Asie. Néanmoins, il est difficile à contrôler car ce procédé dépend de nombreux facteurs : espèce, saison, quantité d'enzymes, température... (Benjakul et Morrissey, 1997). Dans le cas de l'hétérolyse, des enzymes exogènes sont ajoutées et les conditions de réaction sont contrôlées. De nombreuses protéases sont utilisées dans l'industrie alimentaire, elles sont d'origine végétale (papaïne, bromolaiïne), animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine) ou microbienne et sont classées parmi les exopeptidases ou les endopeptidases. Ce procédé permet un meilleur contrôle de la réaction générant ainsi des hydrolysats reproductibles en terme de qualité (Liaset *et al.*, 2000). Le choix de l'enzyme dépend des propriétés recherchées et de son coût, dans la majorité des cas, à l'échelle industrielle ce sont des mélanges enzymatiques qui sont utilisés. L'utilisation des enzymes d'origine microbienne extraites de bactéries, de levures ou de moisissures est de plus en plus commune du fait de leur faible coût de production et de leur diversité (Gupta *et al.*, 2002).



Figure 19 – Principe de fabrication des hydrolysats protéiques

Les hydrolysats sont caractérisés par leur degré d'hydrolyse (DH), paramètre représentant le nombre de liaisons peptidiques clivées par rapport au nombre de liaisons peptidiques initial. Ce dernier définit les propriétés physico-chimiques de l'hydrolysat (Mullally *et al.*, 1995). Le degré d'hydrolyse dépend directement du choix de l'enzyme (ou mélange d'enzymes) utilisée ainsi que de la température, du pH, de la durée de réaction et du rapport enzyme/substrat. La maîtrise de ces facteurs est essentielle pour obtenir des hydrolysats aux propriétés physico-chimiques, nutritionnelles et fonctionnelles reproductibles.

Différentes méthodes sont disponibles pour déterminer le DH d'un hydrolysat : 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 dernière méthode est la plus utilisée car c'est la plus facile et la plus rapide à mettre en place. Elle repose sur le principe du maintien du pH constant par titration continue automatique avec une solution alcaline. La libération des protons issus de la rupture des liaisons peptidiques, qui entraîne une baisse du pH, est compensée par l'ajout d'une base. Toutefois, la détermination seule de ce paramètre n'est pas suffisante pour caractériser un hydrolysat car pour un même DH, plusieurs profils de masse moléculaire peuvent être obtenus.

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

où 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)

3.2. Intérêt nutritionnel des hydrolysats

3.2.1. Composition des hydrolysats

La fraction protéique

Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique sont riches en protéines. Ils contiennent en moyenne 60 à 90% de protéines (Choi *et al.*, 2009) et sont donc plus riches que les farines de poisson (Tableau 6). La composition en protéines dépend directement des organes utilisés pour l'hydrolyse. Par exemple, la peau est connue pour générer beaucoup de peptides de collagène et de gélatine. Les protéines musculaires contenues dans les co-produits peuvent être classées en deux catégories. La première concerne les protéines extracellulaires. Ces protéines sont généralement insolubles en milieu salin. Il s'agit du collagène, de l'elastine, de la kératine, de la reticuline et de la connectine.

Tableau 6 – Composition d'hydrolysats provenant de diverses espèces aquatiques, d'après Chalamaiyah, 2012

Espèce	Particularité	Protéine (%)	Lipide (%)	Moisture	Ash	Référence
<i>Hareng (C. harengus)</i>	Entier - Alcalase	87.9	4.0	4.7	12.5	
	Entier - Papaine	85.3	4.7	4.8	9.6	(Hoyle et al., 1994)
	Press cake - Alcalase	82.3	3.7	3.9	7.5	
	Press cake - Papaine	83.4	3.6	3.2	9.9	
	extrait ethanol - Alcalase	83.7	1.8	3.3	12.0	
	Herring - Papaine	85.7	0.9	3.9	7.5	
	co-produit-HBH	77.0±0.2	0.77±0.1	3.98±0.02	21.7±0.1	(Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999)
	co-produit-HHH	87.0±0.2	0.4±0.1	3.0±0.1	10.1±0.1	(Sathivel et al., 2003)
	co-produit-HGH	85.2±0.4	1.2±0.2	3.5±0.2	10.1±0.1	
	Alcalase	77.4±0.4	1.5±0.2	6.2±0.32	15.3±0.1	
<i>Capelan (M. villosus)</i>	72.4±0.7	0.18±0.03	6.34±0.11	20.8±1.82		
	78.3±1.92	0.39±0.02	5.32±0.24	17.7±1.80		
	71.2±0.83	0.21±0.02	5.26±0.11	21.5±0.53		
<i>Merlu (M. productus)</i>	co-produits	82.25±0.05	3.94±0.13	-	13.82±0.08	(Benjakul et Morrissey, 1997)
	10% DH	88.6±0.3	0.1±0.1	3.6±1.9	11.9±0.1	
	15% DH	88.4±0.3	0.2±0.2	3.2±0.1	11.7±0.4	(Pacheco-Aguilar et al., 2008)
	20% DH	85.6±0.3	0.3±0.1	2.8±0.8	11.9±0.4	
	Muscles	85.6±2.3	0.3±0.1	2.5±0.6	16.6±0.3	(Mazorra-Manzano et al., 2012)
<i>Saumon (S. salar)</i>	Muscles	88.39±0.55	0.23±0.12	0.92±0.22	8.96±0.13	(Kristinsson et Rasco, 2000a)
	Tête	82.3±1.19	0.8±0.02	5.3±0.2	10.4±1.1	(Gbogouri et al., 2004)
<i>Pétonecle (C. islandica)</i>	waste	81.3	0.56	5.55	12.6	(Mukhin et al., 2001)
	pancréatique FM	73.1	0.80	8.67	17.4	
<i>Thon</i>	co-produits	66.40±0.27	2.37±0.52	7.25±0.09	25.94±0.04	(Nilsang et al., 2005)
	FMMH	97.57±0.12	0.67±0.04	1.2±0.02	2.25±0.13	(Foh et al., 2011)
	HWDH	85.4±0.62	1.24±0.05	3.17±0.04	9.85±0.14	
<i>Lizardfish (S. elongata)</i>	-	84.7	3.5	8.5	7.1	(Dong et al., 2008)

La seconde catégorie regroupe les protéines intracellulaires dont la fraction myogène soluble et la fraction myofibrillaire. La fraction myogène soluble regroupe les protéines sarcoplasmiques et représente 15 à 22% des protéines totales. Ce sont des protéines globulaires de faible masse moléculaire telles que la myoglobine, les albumines et les globulines. La fraction myofibrillaire est peu soluble, elle est composée de la myosine, l'actine et de protéines régulatrices telles que la tropomyosine, la troponine ou les protéines C.

L'hydrolyse enzymatique va conduire à un mélange d'acides aminés, de peptides et de protéines. La composition et la taille des peptides obtenus sont directement liées aux enzymes utilisées et aux conditions d'hydrolyse. La forte teneur en protéines résulte du fait que les protéines sont solubilisées pendant l'hydrolyse et que les éléments insolubles sont évacués par la centrifugation (Chalamaiyah *et al.*, 2010).

Les autres fractions

Les hydrolysats sont pauvres en lipides car cette fraction est éliminée par centrifugation en même temps que les protéines insolubles. Ils contiennent en général moins de 5% de lipides (Tableau 6). Néanmoins, certains auteurs rapportent des taux en lipides bien plus importants dans certains hydrolysats, allant jusqu'à 50% (Yin *et al.*, 2010).

Les hydrolysats contiennent également une fraction azotée composée des molécules non protéiques, de faible masse moléculaire et solubles dans l'eau. Il s'agit des acides aminés libres, des nucléotides ainsi que leurs dérivés, comme la créatinine, l'oxyde de triméthylamine et l'ammoniac. Enfin, la fraction minérale représente entre 0.45 et 26% (Bhaskar et Mahendrakar, 2008; Nilsang *et al.*, 2005).

3.2.2. Applications en alimentation humaine

Les protéines hydrolysées présentent des avantages en nutrition car elles ont une meilleure digestibilité. Les hydrolysats ont ainsi des applications en alimentation humaine notamment pour des personnes en malnutrition (Nesse *et al.*, 2014) ou présentant des dysfonctionnements du système digestif (Clemente, 2000). Ils sont également utilisés pour leurs propriétés bioactives et rentrent ainsi dans la composition de nombreux produits nutraceutiques visant par exemple à améliorer le transit intestinal (Marchbank *et al.*, 2009), à favoriser la prise de masse musculaire chez les sportifs (Nesse *et al.*, 2014), ou à améliorer la mémoire et les fonctions cognitives (Guerard, 2010). Néanmoins, les hydrolysats protéiques sont connus pour leur amertume due à la présence de peptides hydrolytiques hydrophobes et/ou d'acides aminés libres amers. En effet, ceux-ci sont habituellement au cœur des protéines globulaires et n'interagissent donc pas avec les papilles gustatives (Adler-Nissen, 1986). Ce goût amer limite leur application en alimentation humaine (Kristinsson et Rasco, 2000b), ils sont ainsi principalement utilisés en alimentation animale.

3.2.3. Applications en aquaculture

Effets sur la croissance

L'introduction d'hydrolysat dans l'alimentation est connue pour améliorer la croissance chez plusieurs espèces : chez *O. mykiss* (Aksnes *et al.*, 2006), *L. calcarifer* (Srichanun *et al.*, 2014), *S. salar* (Refstie *et al.*, 2004), *D. labrax* (Cahu *et al.*, 1999), *H. hippoglossus* (Kvale *et al.*, 2009)... Plusieurs études montrent également une augmentation de la prise alimentaire (Refstie, 2004), une amélioration de l'efficacité alimentaire (Aksnes *et al.*, 2006) ainsi que de la digestibilité des protéines (Bui *et al.*, 2014). L'utilisation d'hydrolysats montre également une amélioration de la maturation du système digestif chez les larves (Zambonino-Infante *et al.*, 1997) et permet d'améliorer la digestion et l'assimilation des nutriments (Tonheim *et al.*, 2005).

Effets sur le système immunitaire

Les hydrolysats d'origine marine ont également une action sur le système immunitaire. Plusieurs études montrent que les hydrolysats permettent d'améliorer la survie lors de challenge bactériens. Cela a été montré chez *D. labrax* (Kotzamanis *et al.*, 2007) et *P. major* (Bui *et al.*, 2014). De plus, des études plus approfondies montrent une influence sur des marqueurs immunitaires. Tang *et al.* (2008) montrent que l'inclusion de 10 à 15% d'un hydrolysat chez *P. crocea* entraîne l'augmentation de l'activité du lysozyme ainsi que des taux plasmatiques de complément C3 et d'IgM. L'augmentation du taux d'immunoglobuline est également rapportée chez *P. major* accompagnée d'une augmentation de l'activité de la SOD et des antiprotéases (Bui *et al.*, 2014).

3.3. Intérêt fonctionnel

3.3.1. Les peptides bioactifs

Les peptides bioactifs sont des fragments de protéines pouvant être libérés par hydrolyse enzymatique lors de la digestion gastro-intestinale ou lors des traitements industriels. En général, les peptides bioactifs comptent 2 à 20 acides aminés. Ils peuvent exercer de nombreuses activités sur les systèmes immunitaire, cardio-vasculaire, gastro-intestinal et nerveux *via* différents modes d'action (Figure 20).

De nombreuses activités biologiques ont été mises en évidence : activité antioxydante, activité anti-hypertensive, activité antibactérienne, activité anti-fongique, antithrombique, opioïd... (Kim et Mendis, 2006).

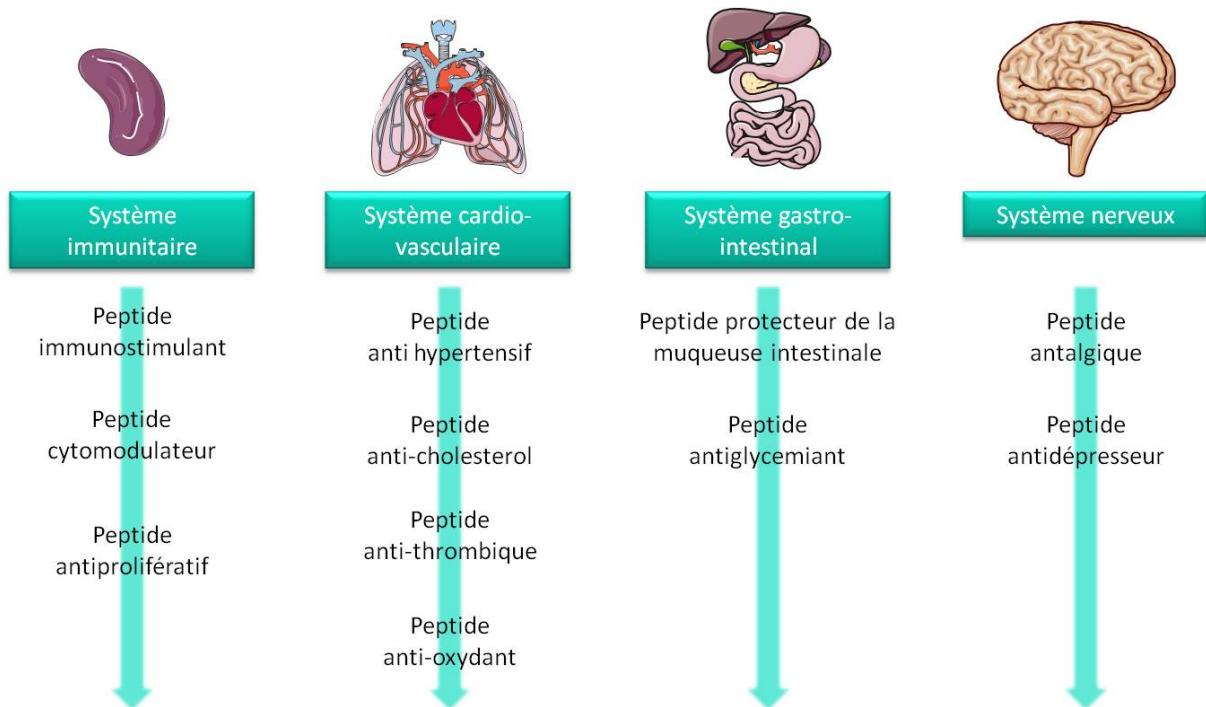


Figure 20 – Les classes de peptides bioactifs

3.3.2. Régulation du système immunitaire

Peptides antibactériens

Les organismes marins, notamment les mollusques et les crustacés produisent de nombreux peptides antibactériens endogènes. En effet, il n'existe pas d'immunité acquise chez les invertébrés marins, l'immunité innée est ainsi le seul système de défense immunitaire. Parmi les effecteurs du système immunitaire inné, les peptides antimicrobiens sont l'un des composants majeurs. Les peptides antimicrobiens sont donc présents naturellement chez les organismes marins soit de manière constitutive dans les cellules sécrétrices, soit de manière induite lors d'une infection. Il existe une grande variété de séquences, mais la majorité d'entre eux répondent à trois critères (Wang et Wang, 2004; Hancock et Sahl, 2006) :

- Ces peptides possèdent entre 6 et 50 acides aminés
- Ils sont cationiques et présentent une charge nette comprise entre +2 et +9
- Ce sont des peptides amphiphiles dotés d'une forte proportion d'acides aminés hydrophobes

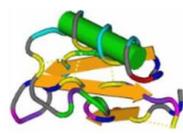
Les peptides antimicrobiens sont souvent classés dans la littérature en fonction de leur structure secondaire et de leur composition (Figure 21). Ainsi 3 grandes classes de peptides antibactériens sont définies par Bulet *et al.* (2004), les peptides linéaires possédant une hélice- α , les peptides riches en cystéine ou en acides aminés comme la proline, l'histidine ou le tryptophane. À celles-ci, s'ajoutent les peptides mixtes, riches en cystéine et en proline.

1- Peptides linéaires avec une hélice α



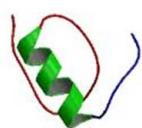
Ex: Cécropine

2- Peptides cycliques riches en Cystéines



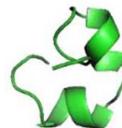
Ex: Defensines

3- Peptides riches en certains acides aminés (Proline, Histidine, Tryptophane)



Ex: Histatine

4- Peptides mixtes riche en Proline et Cystéine



Ex: Penaeidines

Figure 21 – Classement des peptides antibactériens en fonction de leur structure secondaire et leur composition en acides aminés

Tableau 7 – Hydrolysats de co-produits d'origine marine possédant une activité antibactérienne

Organisme		Bactéries cibles	Référence
Sardine	<i>S. aurita</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i>	(Jemil <i>et al.</i> , 2014)
Blennie zebré	<i>S. basilisca</i>	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i>	(Jemil <i>et al.</i> , 2014)
Gobi	<i>Z. ophiocephalus</i>	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i>	(Jemil <i>et al.</i> , 2014)
Raie pastenague	<i>D. pastinaca</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i>	(Jemil <i>et al.</i> , 2014)
Crabes des neiges	<i>C. opilio</i>	<i>E. coli</i> , <i>L. innocua</i>	(Doyen <i>et al.</i> , 2012)
Crabe Tourteau	<i>C. irrortatus</i>	<i>A. caviae</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. morganii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>V. vulnificus</i>	(Beaulieu <i>et al.</i> , 2013)
Huître creuse	<i>C. gigas</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2008)

Des peptides antimicrobiens peuvent également être générés par hydrolyse enzymatique (Liu *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2004; Bulet *et al.*, 2004). Plusieurs études démontrent l'activité antibactérienne d'hydrolysats de poisson ou de crustacé (Tableau 7). Cependant, aucun de

ces auteurs ne parvient à identifier un peptide unique. Ils mettent ainsi en évidence l'activité de fractions prépurifiées d'hydrolysats protéiques. Néanmoins, Liu *et al.* (2008) suggèrent que l'activité de l'hydrolysat d'huître creuse *C. gigas* résulte d'un peptide unique, le *Cgpep33* dont la composition en acides aminés est connue mais pas la séquence.

Peptides anticancéreux

Une action anti-proliférative sur des lignées de cellules cancéreuses a été mise en évidence dans 10 hydrolysats de poisson par Picot *et al.* (2006). Ces hydrolysats sont obtenus à partir de *P. platessa*, *M. poutassou*, *S. salar* et *G. morhua*. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette activité est lié à la présence de peptides bioactifs sans toute fois le démontrer. Une étude plus récente sur l'activité anticancéreuse d'un hydrolysat de thon met en évidence deux peptides anti-prolifératifs (Hsu *et al.*, 2011).

3.3.3. Régulation du système cardio-vasculaire

Peptides antioxydants

Des peptides ayant des activités antioxydantes *in vitro* ont été identifiés dans de nombreux poissons, mollusques et crustacés (Tableau 8). Les mécanismes d'action de ces peptides ne sont pas élucidés. Néanmoins, il a été démontré que ces peptides pouvaient agir en tant que piegeurs de radicaux libres, chélateurs de métaux ou bien sur la peroxydation des lipides. On suppose que les acides aminés comme les acides aminés aromatiques (Phenylalanine, Tyrosine, Tryptophane), l'Histidine avec son noyau aromatique et les acides aminés avec une fonction thiol (Cystéine) peuvent agir en tant que donneurs de protons (Mendis *et al.*, 2005b).

Tableau 8 – Peptides antioxydants identifiés dans des hydrolysats de co-produits d'origine marine

Organisme		Séquence	Référence
Merlu	<i>J. belengerii</i>	HGPLGPL	(Mendis <i>et al.</i> , 2005b)
Merlu	<i>J. belengerii</i>	GSTVPERTHPACPFDNF	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
Thon	–	VKAGFAWTANQQQLS	(Je <i>et al.</i> , 2007)
Moule	<i>M. edulis</i>	HFGDPFH	(Rajapakse <i>et al.</i> , 2005c)
Encornet géant	<i>D. gigas</i>	FDSGPAGVL, NGPLQAGQPGER	(Mendis <i>et al.</i> , 2005a)
Encornet géant	<i>D. gigas</i>	NADFGLNGLEGLA	(Rajapakse <i>et al.</i> , 2005b)

Peptides anti-hypertenseurs

Des peptides anti-hypertenseurs ont été identifiés dans de nombreux hydrolysats de poissons, mollusques et crustacés (Tableau 9). L'un des principaux mécanismes est l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Cette enzyme joue un rôle dans la régulation de la pression sanguine en catalysant la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, un

agent vasoconstricteur, et en inactivant la bradikinine qui est un agent vasodilatateur (Erdös et Skidgel, 1987).

Tableau 9 – Exemple de peptides antihypertensifs identifiés dans des hydrolysats d'origine marine

Organisme		Séquence	Référence
Colin d'Alaska	<i>T. chalcogramma</i>	GPL , GPM	(Byun et Kim, 2001)
Colin d'Alaska	<i>T. chalcogramma</i>	FGASTRGA	(Je et al., 2005b)
SeaBream	–	GY ,VY ,GF , VIY	(Fahmi et al., 2004)
Hamaguri	<i>M. lusoria</i>	VRK	(Tsai et al., 2008)
Krill	<i>M. orientalis</i>	KLKFV	(Kawamura et al., 1992)
Huître	<i>P. fucata martensi</i>	FY, AW,GW ,VW	(Katano et al., 2003)
Huître	<i>C. talienwhanensis</i> Crosse	VVYPWTQRF	(Wang et al., 2008)
Crevette	<i>A. chinensis</i>	FCVLRP	(Hai-Lun et al., 2006)
Thon	–	GDLGKTTTVSNWSPPKYKDTP	(Lee et al., 2010)
Pipefish	<i>S. schlegeli</i>	TFPHGP ,HWTTQR	(Wijesekara et al., 2011)
Limande du Japon	<i>L. aspera</i>	MIFPGAGGPEL	(Jung et al., 2006b)
Saumon du Pacifique	<i>O. keta</i>	GLPLNLP	(Lee et al., 2014)
Carpe herbivore	<i>C. idella</i>	VAP	(Chen et al., 2012)
Bonite à ventre rayé	<i>K. pelamis</i>	MLVFAV	(Intarasirisawat et al., 2013)
Raie	<i>R. kenoje</i>	PGPLGLTGP, QLGFLGPR	(Lee et al., 2011)

Les peptides inhibiteurs de l'ACE peuvent être compétitifs et se lier au site actif pour empêcher la liaison du substrat ou modifier la conformation spatiale de l'enzyme (Zhao et al., 2009). Il peut également s'agir d'inhibiteurs non-compétitifs (Qian et al., 2007). L'activité de plusieurs peptides a également été démontrée *in vivo* chez des rats spontanément hypertendus. Ainsi l'administration orale du peptide GDLGKTTSVNWSPPKYKDTP, isolé d'un hydrolysat de thon, à 10 mg/kg diminue la pression systolique chez ces rats (Lee et al., 2010). L'activité est similaire à celle du Captopril, un médicament contre l'hypertension. Ces peptides constituent une alternative intéressante aux molécules synthétiques commercialisées.

3.3.4. Autres bioactivités

D'autres biofonctionnalités ont pu être démontrées dans les hydrolysats. Nasri et al. (2012) ont mis en évidence 4 peptides ayant une activité antithrombotique. Il s'agit des peptides LCR, HCF, CLC et LCRR identifiés chez le gobi, *Z. ophiocephalus*. Des peptides capables de lier le calcium ont également été isolés dans des hydrolysats de *J. belengerii* (Jung et al., 2005) ou de *T. chalcogramma*. Ces peptides pourraient avoir des applications dans la prévention de l'ostéoporose, des caries dentaires, de l'hypertension ou de l'anémie (Korhonen et Pihlanto, 2006). Cudennec et al. (2008) ont également démontré l'action d'un hydrolysat de crevette sur la sécrétion de CCK, une hormone impliquée dans la sensation de satiété. Enfin, de nombreux

peptides d'origine marine possèdent des actions intéressantes (anti-diabète, anti-obésité...) pour la prévention du syndrome métabolique (Ko et Jeon, 2013).

4 Éléments de physiologie digestive

4.1. Anatomie du système digestif

4.1.1. Structure générale du système digestif

Les poissons téléostéens forment un groupe extrêmement diversifié, non seulement d'un point de vue morphologique mais également d'un point de vue comportemental représentant près de la moitié des vertébrés. Il compte la grande majorité des espèces de "poissons" parmi lesquelles on retrouve des espèces herbivores, détritivores, omnivores ou carnivores. La structure générale de leur appareil digestif, bien que très proche de celle des vertébrés supérieurs, diffère néanmoins beaucoup entre ces espèces notamment en raison de leur régime alimentaire. L'objet de cette partie n'est pas de décrire précisément l'anatomie du système digestif de chaque espèce mais de mettre en avant les caractères principaux ainsi que les variantes découlant du comportement alimentaire. Plusieurs exemples seront utilisés : le bar commun, un poisson marin carnivore, la truite arc-en-ciel, un poisson diadrome carnivore et la carpe commune, un poisson d'eau douce omnivore (Figure 22).

Le système digestif rassemble l'ensemble des organes assurant l'ingestion et la digestion des aliments : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, l'anus ainsi que deux glandes annexes, le foie et le pancréas.

La **bouche** est le premier organe composant le système digestif, chez les téléostéens, elle assure la double fonction de respiration et d'ingestion de nourriture. Le mécanisme de capture des aliments est particulier chez ces animaux, de manière générale, un phénomène d'inertie de succion est observé. En effet l'augmentation du volume de la bouche, de la chambre orobranchiale et des branchies entraîne une brusque dépression et une aspiration de l'eau et des éléments nutritifs qu'elle contient. Chez les téléostéens tardifs, la bouche se spécialise dans la fonction de capture et devient protractile. Ces animaux peuvent être munis de dents assurant la préhension des proies ou la filtration et plus rarement la mastication. De nombreuses variations de l'anatomie buccale, en lien avec le régime alimentaire, sont observées entre les espèces. Les dents peuvent être insérées à différents endroits de la cavité buccale et sont nommées en fonction de leur localisation, elles peuvent également avoir de nombreuses formes, molariformes, pointues, coniques, en spatule ou à cuspides. Le bar commun et la truite arc-en-ciel sont deux espèces carnivores, elles possèdent des dents adaptées à la préhension des proies, dents vomériennes insérées en une rangée chez le bar commun et dents maxillaires et buccales chez la truite arc-

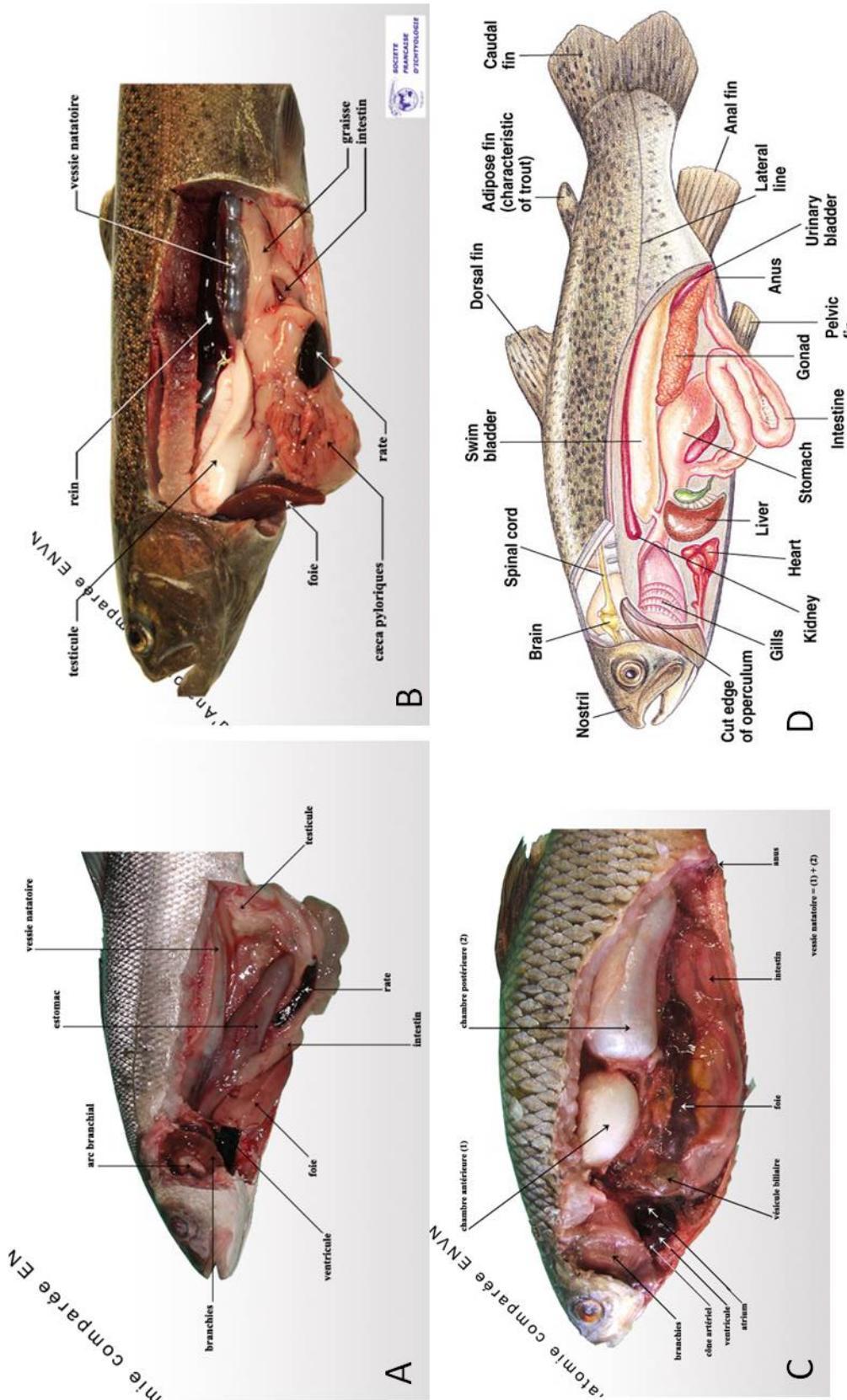


Figure 22 – Comparaison de l'anatomie interne d'un poisson perciforme, le bar commun, d'un salmonidé, la truite arc-en-ciel et d'un cyprinidé, la Brême (Source : Atlas anatomique d'ichtyologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes)

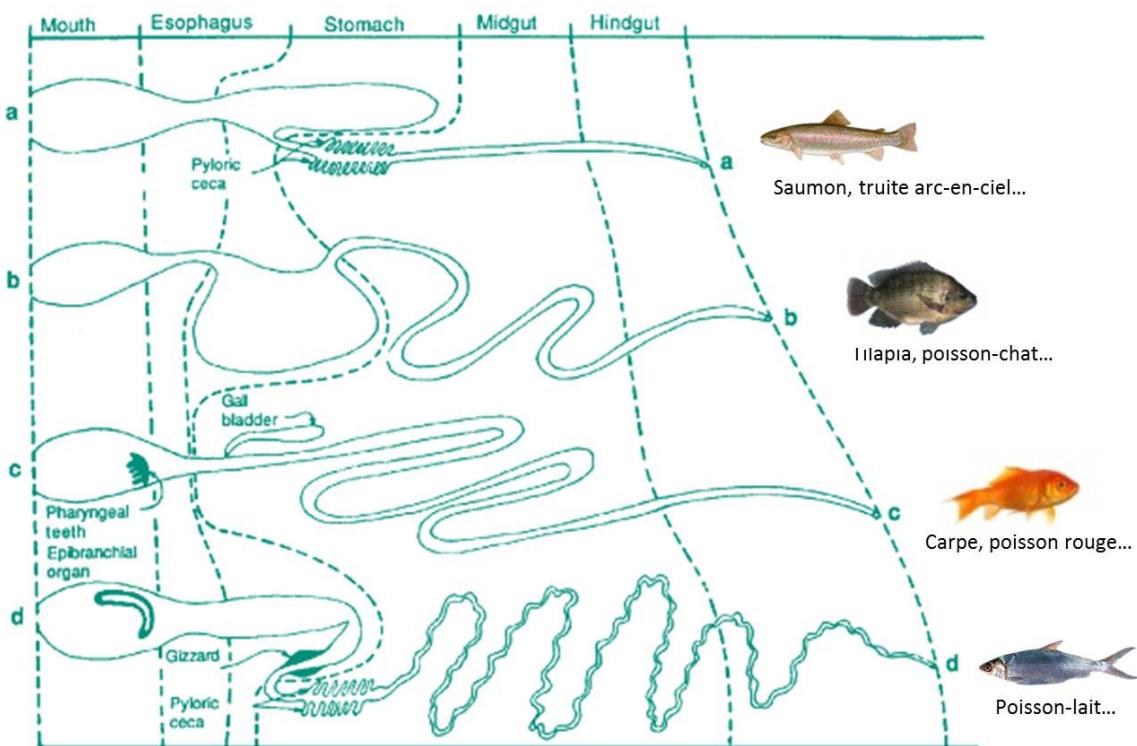


Figure 23 – Représentation schématique de 4 types de systèmes digestifs (D'après Smith, 1989)

en-ciel. A l'inverse, la carpe commune possède des dents pharyngiennes à couronne aplatie lui permettant de broyer les végétaux qu'elle ingère.

L'oesophage fait le lien entre la bouche et l'estomac ou l'intestin. Chez la plupart des poissons téloostéens dont les trois espèces décrites, il est large et court et possède une grande capacité de distension, particulièrement chez les espèces carnivores. Néanmoins, des formes longues sont également observées, chez les anguilles par exemple, où l'on suppose qu'il est impliqué dans l'osmorégulation lors de la migration catadrome.

La présence d'un **estomac** n'est pas systématique chez les poissons téloostéens, certaines familles, les cyprinidés par exemple, en sont dépourvues (Kapoor *et al.*, 1975). Bien que son absence est souvent liée aux régimes herbivore ou microphage, certaines espèces agastriques, dont la carpe commune, peuvent se nourrir d'insectes, de mollusques, de crustacés ou même de poissons. Lorsqu'il est présent, sa morphologie est très variable et dépend du régime alimentaire ainsi que de la quantité de nourriture ingérée (Smith, 1989). Il peut s'agir d'un simple renflement ou d'un estomac bien individualisé qui peut être coudé en forme de J ou de Y comme c'est le cas pour le bar commun et la truite arc-en-ciel. L'estomac des espèces carnivores est capable d'une grande distension. Il est souvent 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 peut trouver des évaginations de la paroi intestinale appelées **caeca pyloriques**. Leur nombre est très variable entre les espèces ou au sein d'une même espèce. On en dénombre ainsi 4 à 5 chez le bar commun (Hernández *et al.*, 2001) et entre 31 et 147 chez la truite arc-en-ciel (Zimmerman *et al.*, 2009). 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.*, 1996).

L'**intestin** fait suite à l'estomac ou à l'œsophage chez les poissons agastriques et débouche dans l'anus situé en avant de la nageoire anale. Chez ces derniers, il est fréquent que la partie proximale forme un bulbe pouvant être confondu avec un estomac "vrai" et assurant le stockage temporaire des aliments. La morphologie de l'intestin présente de grandes variations en termes de taille et de repliement (Figure 22). Chez les espèces carnivores, il peut être aussi bien court et rectiligne (cas de la truite arc-en-ciel) ou long et replié (cas du bar commun). L'intestin des espèces omnivores et herbivores est en général plus long que celui des espèces carnivores (Kapoor *et al.*, 1975) comme l'illustre celui de la carpe commune très long et contourné (Figure 24).

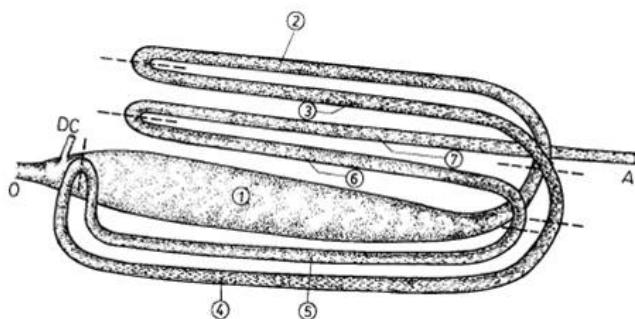


Figure 24 – Représentation du repliement de l'intestin chez la carpe commune, *C. carpio* (Villanueva *et al.*, 1997)

Le système digestif comprend également deux glandes principales, **le foie et le pancréas**. Le foie est toujours bien développé chez les poissons (Figure 22), il peut être divisé en plusieurs lobes selon les espèces et l'organisation tissulaire diffère de celle des vertébrés supérieurs par l'absence de lobules hépatiques. Le foie remplit les mêmes fonctions que chez les vertébrés supérieurs : détoxication, synthèse et stockage du glycogène, glycolyse, sécrétion de bile.. A l'exception de quelques espèces (Anguilles, Esturgeons...), le pancréas est un organe diffus dont les nodules sont disposés dans le tissus adipeux, mésentériques et dans le foie. Le pancréas sécrète des enzymes digestives et assure également une fonction endocrine comme chez les vertébrés supérieurs.

4.1.2. Histologie

L'organisation histologique des tissus du tube digestif ressemble à celle des vertébrés supérieurs chez lesquels on observe quatre tuniques : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (Figure 25). La muqueuse est la tunique la plus interne, elle est composée d'un épithélium de revêtement bordant la lumière pouvant être uni ou pluristratifié et d'un tissu conjonctif appelé chorion ou *Lamina propria*. Une couche de cellules musculaires lisses, la *muscularis mucosae*, peut également être observée, néanmoins son absence chez nombre d'espèces

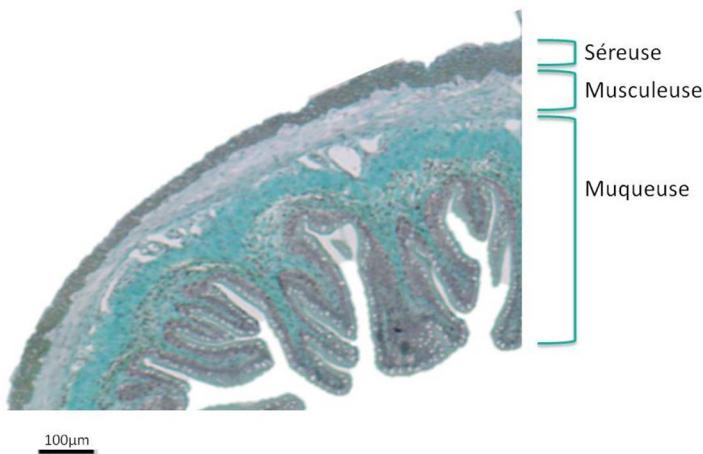


Figure 25 – Coupe histologique d'un intestin de bar commun : organisation des tuniques

empêche la distinction entre la muqueuse et la sous-muqueuse. La sous-muqueuse est formée par un tissu conjonctif dans lequel peuvent se trouver de nombreuses glandes. La tunique musculeuse est composée, comme son nom l'indique de cellules musculaires lisses formant une couche circulaire et une couche longitudinale et permettant la contraction du tube digestif. Enfin, la séreuse, tunique la plus externe, est une couche de tissu conjonctif très dense. La présence de ces 3 ou 4 tuniques est constante le long du tube digestif de l'œsophage à l'anus, néanmoins une organisation cellulaire spécifique de chaque organe est observée.

La muqueuse de l'œsophage est toujours pluristratifiée dans sa partie antérieure et chez certaines espèces peut devenir unistratifiée dans la région oeso-gastrique (Meister *et al.*, 1983). Elle est recouverte d'une couche de mucus sécrété par les cellules caliciformes nombreuses dans l'épithélium et forme des replis permettant la distension de la lumière et le passage des aliments. La structure de la muscleuse se distingue de celle des autres régions par sa richesse en fibres musculaires striées permettant une contraction volontaire de l'œsophage.

La structure de la muqueuse se différencie dans l'estomac. Elle devient unistratifiée et composée de cellules muqueuses prismatiques gorgées de vésicules de mucus alors que les cellules caliciformes disparaissent. Ces cellules sécrètent une couche de mucus destinée à protéger l'épithélium des sucs gastriques. On distingue deux régions dans l'estomac, la région antérieure appelée région cardiaque ou fundique et la région postérieure pylorique. Dans la première se trouve de nombreuses glandes tubulaires ramifiées composées de cellules oxyntiques produisant l'HCl et le pepsinogène. La muscleuse se modifie également, les cellules musculaires striées sont remplacées par des cellules musculaires lisses formant une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale. L'estomac se termine au niveau du pylore où chez certaines espèces, on observe un sphincter pylorique dérivant de la muscleuse ou bien une valve formée par la muqueuse.

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.

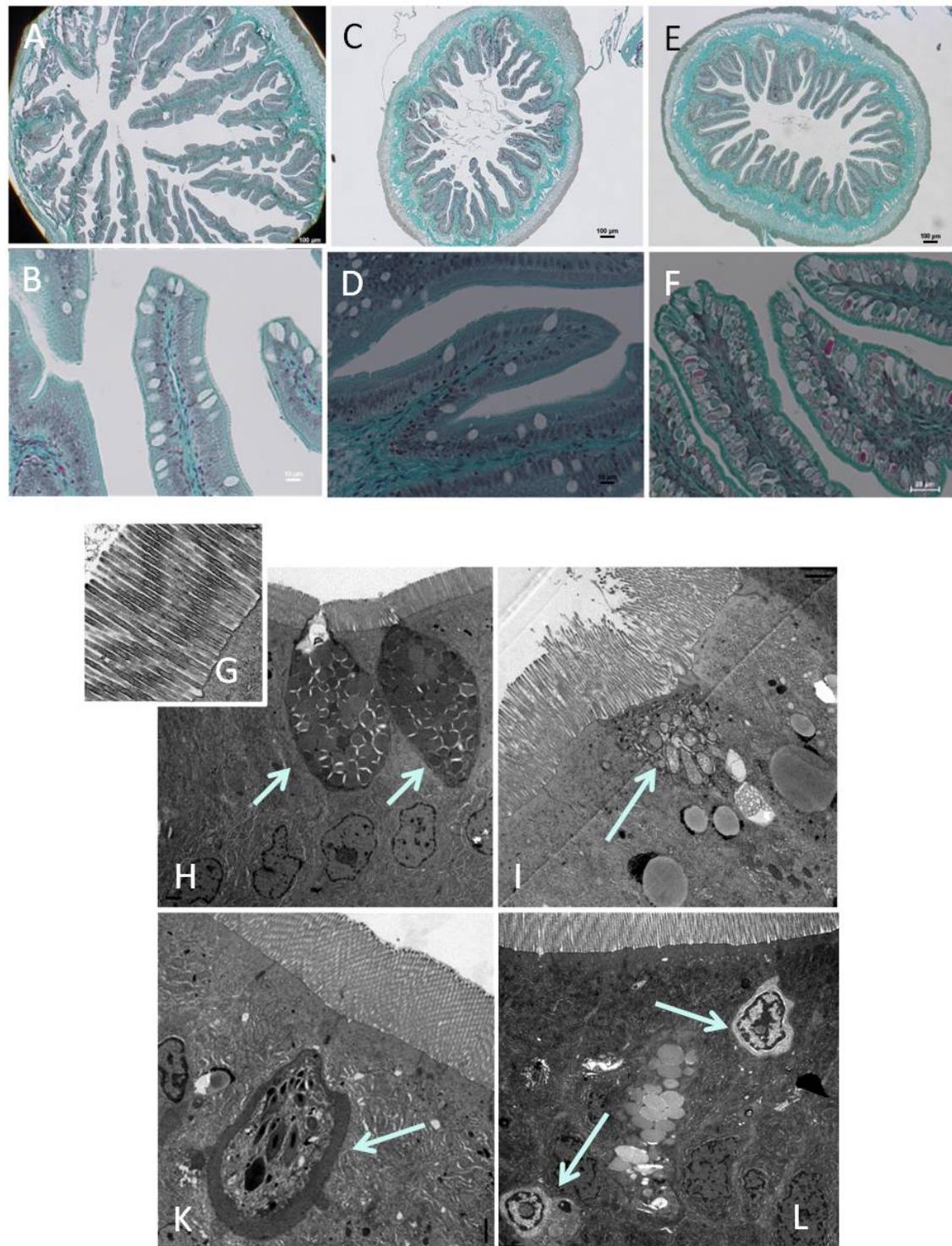


Figure 26 – Organisation histologique de l'intestin. Clichés de microscopie optique au grossissement x4 et x40 de la partie proximale (A et B), moyenne (C et D) et distale (E et F) de l'intestin. Clichés de MET mettant en évidence deux cellules caliciformes entourées d'entérocytes (H), un agrandissement des micro-villosités des entérocytes (G) une cellule sécrétrice (I), une "rodlet cell" (K) et deux lymphocytes (L)

Néanmoins, ces replis sont moins bien individualisés et sont appelés pseudo-vilosités. La muqueuse intestinale est prismatique simple composée de différents types cellulaires. Les cellules 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, cholecystokinine, greline, somatostatine, serotonin (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 de récents travaux les associent à des fonctions sécrétrices (Vigliano *et al.*, 2006) ou immunitaires (Reite, 2005).

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'iléon. La structure des entérocytes se modifie le long de l'intestin, dans la partie moyenne ils se dotent de grandes vacuoles supra-nucléaires 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-vilosités dans les parties moyenne et distale.

4.2. Digestion et absorption des protéines

4.2.1. Digestion des protéines

Le processus de digestion permet de transformer les aliments ingérés en nutriments absorbables par l'organisme. Les protéines vont ainsi être clivées par une série de protéases en acides aminés et en di/tri-peptides qui pourront être absorbés par les entérocytes dans l'intestin.

Chez les poissons gastriques, la phase de digestion débute dans l'estomac. Le bol alimentaire peut séjourner dans cet organe pendant une durée pouvant dépasser plusieurs dizaines d'heures. L'action de l'estomac est très importante, en particulier chez les espèces qui avalent de grosses proies entières. L'hydrolyse des protéines est initiée sous l'effet de la pepsine et de l'acide chlorhydrique sécrétés par les cellules oxyntiques de l'estomac. La pepsine est produite par ces cellules sous forme de pepsinogène inactif. Elle est activée par une hydrolyse acide provoquée par l'acide chlorhydrique sécrété par les cellules pariétales de l'estomac. La pepsine ainsi formée est également capable d'activer le trypsinogène.

La protéolyse est poursuivie dans l'intestin sous l'action des enzymes pancréatiques et in-

Tableau 10 – Sites de coupe des enzymes digestives protéolytiques (Guillaume *et al.*, 1999)

Enzymes	Liaisons hydrolysées
Pepsine	NH ₂ 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

testinale. Certaines enzymes sont présentes dans la lumière de l'intestin, il s'agit des enzymes d'origine pancréatique, sécrétées sous forme de zymogène dans le pancréas et activées dans l'intestin. Les mécanismes d'activation sont les mêmes que chez les vertébrés supérieurs. Le trypsinogène est activé grâce à l'action des entérokinases de la bordure en brosse puis la trypsine active à son tour les autres enzymes pancréatiques. Il existe cinq protéases, la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, l'elastase et la collagénase. Ces enzymes clivent des liaisons peptidiques bien définies (Tableau 10), leur action aboutit au relargage d'acides aminés ou de peptides de taille variable selon la séquence des protéines ingérées. Les autres enzymes pancréatiques, les carboxypeptidases A et B sont des exopeptidases. Leur action est complétée par les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes dont la dipeptidyl peptidase IV, la leucine aminopeptidase, la phénylalanine-glycine peptidase, la γ -glutamyl-transférase et autres aminopeptidases. Ces enzymes clivent les peptides hydrolytiques issus de l'action des endoprotéases stomachales et pancréatiques en acides aminés libres et peptides de taille plus réduite.

4.2.2. Absorption

Les protéines, ainsi hydrolysées, sont absorbées par les entérocytes sous diverses formes. En effet, on a longtemps considéré que leur absorption se faisait uniquement sous forme d'acides aminés libres mais depuis les années 50s, plusieurs auteurs suggèrent qu'elle peut également avoir lieu sous forme de peptides (Newey et Smyth, 1959). Depuis, la découverte du transporteur spécifique des di/tri-peptides, PepT1, par Fei *et al.* (1994) sur la bordure en brosse des entérocytes, montre que l'absorption des peptides est un phénomène à part entière. De plus, d'autres voies, dites alternatives, à l'absorption des peptides ont été mises en évidence.

L'absorption des acides aminés et des di/tri-peptides est réalisée grâce à des transporteurs spécialisés de la membrane apicale des entérocytes. Chez les mammifères, plusieurs familles de transporteurs d'acides aminés, définies en fonction de leur substrat, sont caractérisées et regroupées en cinq systèmes : les transporteurs d'acides aminés neutres et méthionine (Système 1 ; B⁰AT, LAT1), basiques et cystine (Système 2 ; rBAT, b^{0,+AT, CAT1/2, y⁺LAT1/2), acides (Système 3 ; EAAT3), le système imino-glycine (Système 4) et le système acides aminés- β (Système 5). Ces systèmes sont des transporteurs actifs secondaires fonctionnant avec les gra-}

Tableau 11 – Les différents systèmes intestinaux de transport d'acides aminés chez les mammifères (D'après Bröer, 2008)

Système	cDNA	SLC	Substrats	Mécanismes
ASC	ASCT2	SLC1A5	A, S, C, T, Q	Antiport (Na^+) MA
B^0	$\text{B}^0\text{AT1}$	SLC6A19	aa^0	Sympport (Na^+) MA
$\text{B}^{0,+}$	$\text{ATB}^{0,+}$	SLC6A14	aa^0 , aa^+ , $\beta\text{-Ala}$	Sympport (Na^+ , Cl^-) MA
$\text{b}^{0,+}$	rBAT/ $\text{b}^{0,+}\text{AT}$	SLC3A1/SCL7A9	R, K, O, Carnitine	Antiport MA
IMINO	IMINO	SLC6A20	P, HO-P	Sympport (Na^+ , Cl^-) MA
L	LAT2	SLC7A8	aa^0 (sauf P)	Antiport MB
PAT	PAT1	SLC36A1	P, G, A, GABA, $\beta\text{-Ala}$	Sympport (H^+) MA
T	TAT1	SLC16A10	F, Y, W	Uniport MB
$\text{X}^{- AG}$	EAAT3	SLC1A1	E, D	Sympport (Na^+) MA
$\text{x}^{- C}$	xCT	SLC7A11	E, cystine $^-$	Antiport Ub
y^+	CAT1	SCL7A1	R, K, O, H	Uniport Ub
y^+L	LAT1/LAT2	SLC7A7/SLC7A6	K, R, Q, H, M, L, A, C	Antiport (Na^+) MB

dients de Na^+ , Cl^- ou H^+ sous forme de symport, d'antiport ou d'uniport. Les systèmes présents dans l'intestin des mammifères ainsi que leur mécanisme d'action sont exposés dans le tableau 11. Chez les poissons, les transporteurs d'acides aminés sont très peu connus. Récemment, un transporteur orthologue au transporteur $\text{B}^0\text{AT1}$ des mammifères a été mis en évidence chez le bar commun (Margheritis *et al.*, 2013). Cependant de nombreux travaux portant sur les flux d'acides aminés à travers la membrane intestinale suggèrent l'existence de transporteurs semblables à ceux des mammifères. Ces travaux démontrent en effet, la stéréospécificité (Rout *et al.*, 1965) de l'absorption ainsi que la dépendance en Na^+ ou Cl^- (Halver et Hardy, 2002).

Le transporteur de di/tri-peptides, PepT1 (SLC15A1) est quant à lui mieux décrit chez les poissons. Ce transporteur, décrit pour la première fois chez le rat (Fei *et al.*, 1994), est connu chez de nombreuses espèces de poissons dont le poisson zèbre (*D. rerio*; Verri *et al.*, 2003), la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*; Ostaszewska *et al.*, 2010b), la carpe commune (*C. carpio*; Ostaszewska *et al.*, 2010a) ou le bar commun (*D. labrax*; Terova *et al.*, 2009).

Ce transporteur appartient à la famille des Proton Oligopeptide Cotransporter, il a une faible spécificité mais une forte capacité, il peut ainsi transporter tous les di/tri-peptides avec un coût énergétique plus faible que pour le transport des acides aminés libres (Daniel, 2004).

4.2.3. Digestion intra-cellulaire et passage dans le sang

Les di/tri-peptides absorbés dans les entérocytes sont clivés en acides aminés libres par des di et tripeptidases cytoplasmiques. Ces derniers sont ensuite libérés dans le sang *via* des transporteurs d'acides aminés présents sur la membrane basolatérale des entérocytes (Figure 27).

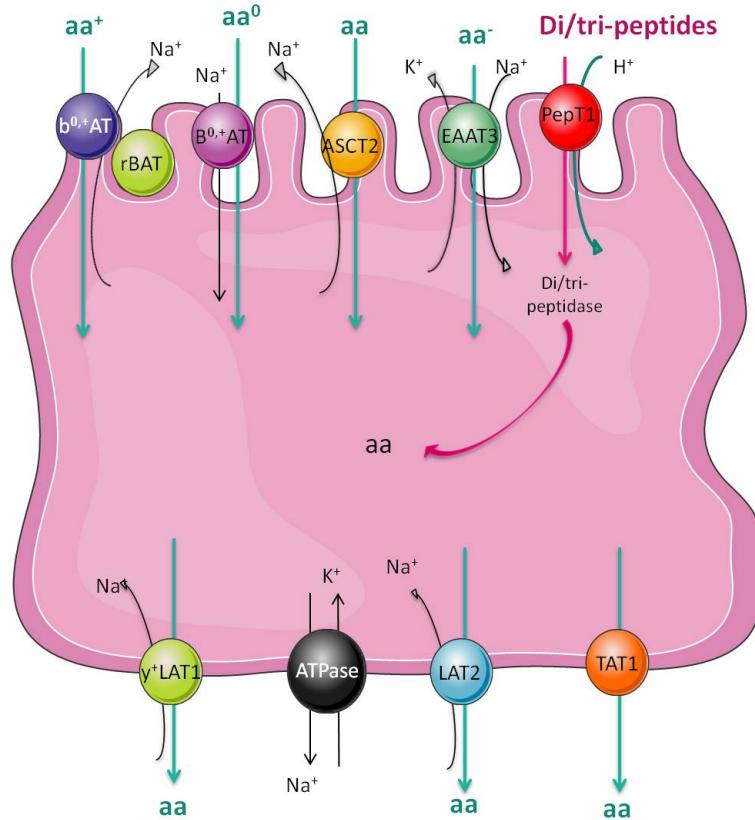


Figure 27 – Représentation schématique des mécanismes d'absorption des acides aminés et des di/tri-peptides dans les entérocytes (D'après Palacín *et al.*, 2005)

4.3. Besoins nutritionnels des poissons

4.3.1. Besoins énergétiques

Bien que l'énergie ne soit pas à proprement parler un nutriment, il est nécessaire de déterminer les besoins énergétiques d'un animal afin de formuler des aliments adaptés. La figure 28 illustre la distribution de l'énergie alimentaire chez les poissons et met ainsi en évidence de nombreuses pertes d'énergie depuis l'énergie absorbée jusqu'à l'énergie retenue. En nutrition, les besoins énergétiques sont divisés en plusieurs catégories. On définit premièrement la dépense énergétique minimale d'un animal, chez les poissons, celle-ci correspond aux besoins d'un individu à jeun libre de ses mouvements, et donc au maintien du métabolisme basal. A ces besoins, s'ajoute l'énergie nécessaire à la nage, on parle alors d'énergie nette d'entretien.

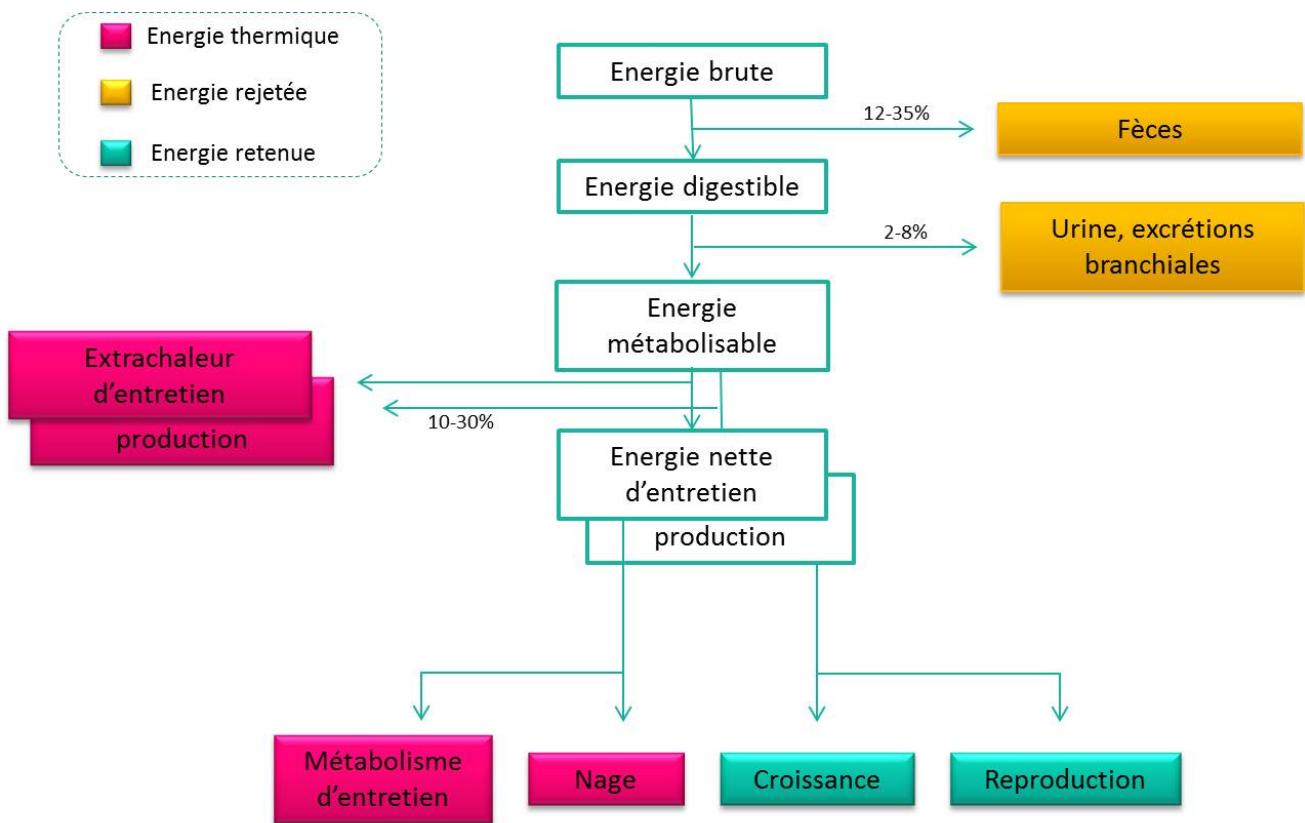


Figure 28 – Distribution de l'énergie alimentaire chez les poissons (Guillaume *et al.*, 1999)

Pour observer une croissance et/ou la reproduction d'un individu, il faut lui fournir, en plus de cette énergie nette d'entretien, une énergie nette de production, appelée également énergie retenue (R). Cette dernière peut être définie par la relation suivante :

$$R = I - (F + BU) - C$$

I est l'énergie ingérée

F est l'énergie perdu dans les fèces

BU est l'énergie pour les besoins métaboliques

C est l'énergie perdue sous forme de chaleur

En raison des pertes d'énergie au niveau des fèces, de l'excrétion urinaire et branchiale ainsi que des pertes d'énergie thermique, on estime que 20 à 50% de l'énergie brute sera effectivement transformée en énergie retenue. Les besoins énergétiques des poissons diffèrent en fonction des espèces ainsi que de l'âge et de la taille des individus. Cependant, ils sont globalement bien plus faibles que ceux des vertébrés terrestres, notamment en raison de l'ectothermie et de l'ammoniothélie des poissons.

L'énergie alimentaire est apportée par les protéines et les lipides et dans une moindre mesure par les glucides. En effet, la valeur énergétique des glucides est variable entre les espèces mais reste en général faible chez les poissons. Par exemple, l'énergie de l'amidon brute est exploitée

à plus de 70% par le tilapia, un poisson omnivore, mais à moins de 50% par la truite arc-en-ciel, un poisson carnivore (Popma, 1982; Cho et Slinger, 1979). Les poissons utilisent peu/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).

4.3.2. Besoins protéiques

Les apports en protéines doivent couvrir une partie des besoins énergétiques et doivent également fournir les acides aminés essentiels et non-essentiels en quantité suffisante. Ils sont estimés entre 30 et 50 % (% de protéines brute/aliment sec) selon les espèces (Tableau 12).

Tableau 12 – Besoins protéiques pour une croissance maximale de quelques poissons d'élevage

Espèce		Besoin protéique	Référence
Saumon Atlantique	<i>S. salar</i>	45	(Lall et Bishop, 1977)
Truite arc-en-ciel	<i>O. mykiss</i>	40	(Satia, 1974)
Barramundi	<i>L. calcarifer</i>	45	(Boonyaratpalin, 1991)
Tilapia du Nil	<i>O. niloticus</i>	30	(Kaushik <i>et al.</i> , 1995a)
Bar commun	<i>D. labrax</i>	50	(Hidalgo et Alliot, 1988)
Carpe commune	<i>C. carpio</i>	31-38	(Ogino <i>et al.</i> , 1970)
Poisson-chat	<i>I. punctatus</i>	32-36	(Garling Jr <i>et al.</i> , 1976)
Sériele du Japon	<i>S. quinqueradiata</i>	55	(Takeda <i>et al.</i> , 1975)

Chez les poissons, les acides aminés essentiels ou indispensables (AAI) sont au nombre de 10 (Figure 29). Les besoins en AAI sont aujourd’hui connus chez la plupart des espèces d’élevage, des valeurs moyennes (Guillaume *et al.*, 1999) sont indiquées sur la figure 29. Des carences en AAI entraînent une diminution de la croissance et peuvent provoquer des pathologies chez certaines espèces. Des 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 minérale chez les salmonidés (Poston *et al.*, 1977; Walton *et al.*, 1984; Waagbo *et al.*, 2010). Il existe de plus, 2 acides aminés semi-indispensables pouvant être synthétisés uniquement à partir d’AAI : la cystéine et la tyrosine. La cystéine est synthétisée à partir de la méthionine mais la réaction inverse n’est pas possible. Ainsi, la totalité des besoins en acides aminés soufrés repose sur la méthionine. La tyrosine est quant à elle, formée à partir de la phénylalanine, bien qu’elle ne soit pas considérée comme un AAI, un apport par l’alimentation permet de diminuer les besoins en phénylalanine.

Les besoins en protéines ou en acides aminés ont été déterminés en utilisant des régimes purifiés ou semi-purifiés et en établissant des courbes dose-croissance. Ils correspondent donc aux apports entraînant la croissance maximale. Cependant, outre ces besoins particuliers, il semble que les proportions de chaque nutriment dans un aliment et en particulier de chaque acide aminé soient importantes. Chez les vértébrés terrestres, des mécanismes antagonistes d’absorption de certains acides aminés ont été mis en évidence : arginine/lysine , valine/leucine.

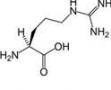
	Précurseur de la créatine, des polyamines 2 à 6 g/16g N	Pouvoir tapon du noyau imidazole, liaison avec les ions métalliques 0.9 à 2.7 g/16g N	
	Antagonisme d'absorption avec la leucine et la valine 1.2 à 4.4 g/16g N	2.7 à 8.4 g/16g N	
	Synthèse des protéines, précurseur de la choline 1.3 à 3.6 g/16g N	Précurseur des hormones thyroïdiennes, de la dopamine, de la mélanine 2.0 à 6.5 g/16g N	
	Précurseur de la carnitine 3.8 à 6.6 g/16g N	Précurseur de la sérotonine 0.2 à 1.1 g/16g N	
	0.6 à 5.0 g/16g N	0.6 à 5.5 g/16g N	

Figure 29 – Les 10 acides aminés indispensables chez les poissons (D'après Guillaume *et al.*, 1999)

L'existence de tels mécanismes n'est pas démontrée chez tous les poissons mais les travaux de Kaushik et Fauconneau (1984) tendent à montrer l'existence de ce phénomène chez la truite arc-en-ciel.

Il existe de plus, une notion de qualité nutritionnelle des protéines. Celle-ci rend compte à la fois de la notion de digestibilité et de la notion de valeur biologique. La digestibilité, évaluée par le Critère d'Utilisation Digestive (CUD), exprime la relation entre la quantité ingérée et la quantité réellement absorbée d'un nutriment.

$$\text{CUD} = (\text{ingéré-fécal})/\text{ingéré} \times 100$$

Le CUD des protéines est en général supérieur à 90% chez les poissons, il est ainsi égal ou supérieur à celui observé chez les vertébrés supérieurs. La digestibilité des protéines est un paramètre qui varie assez peu d'une espèce de poisson à une autre, elle est également assez stable dans le temps chez une espèce donnée. Par contre, la digestibilité varie beaucoup avec la nature des protéines, des matières premières formulant l'aliment ainsi que les traitements (thermique notamment) qu'elles ont subis.

5 Modèle d'étude :

Le bar *Dicentrarchus labrax*



Figure 30 – Bar ou loup de mer (*Dicentrarchus labrax*)

5.1. Présentation générale

Le bar ou loup de mer en méditerranée (Figure 30) est une espèce connue depuis l'antiquité (Barnabe, 1976). Il est extrêmement convoité par les pêcheurs et les consommateurs. Depuis les années 80s, son intérêt commercial est grandissant, expliquant certainement le nombre important d'études scientifiques à son sujet (Pickett et Pawson, 1994). Le nom spécifique du bar commun a beaucoup évolué depuis les premières descriptions connues, mais actuellement, il est communément désigné par *Dicentrarchus labrax* (Linné, 1758).

5.1.1. Position systématique

Super-classe:	Poissons
Classe :	Ostéichthyens
Sous-classe :	Actinoptérygiens
Super-ordre:	Téléostéens
Ordre:	Perciformes
Sous-ordre :	Percoidei
Famille :	Moronidae
Genre :	<i>Dicentrarchus</i>
Espèce :	<i>Dicentrarchus labrax</i>

La position systématique du bar commun est ambiguë. Il est en effet placé dans la famille des Moronidae par certains auteurs alors que d'autres le placent dans la même famille que ses cousins américains Morone et Roccus, la famille des Serranidae.

5.1.2. Aire de répartition

Le bar commun (*D. labrax*) vit dans l'Atlantique Nord-Est de la Norvège au Maroc, ainsi qu'en Méditerranée et dans la mer Noire (Figure 31).

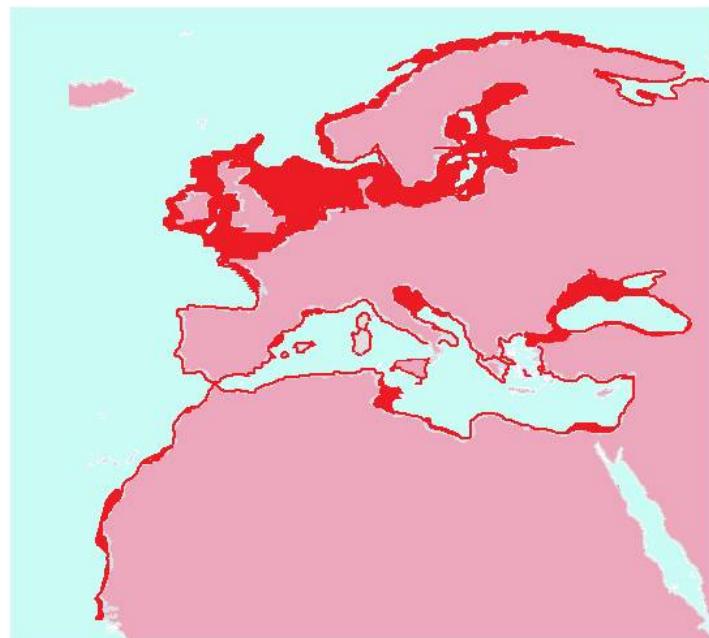


Figure 31 – Aire de répartition du bar commun, *D. labrax*. (Source : www.fishbase.org)

5.1.3. Éléments d'anatomie générale du bar commun

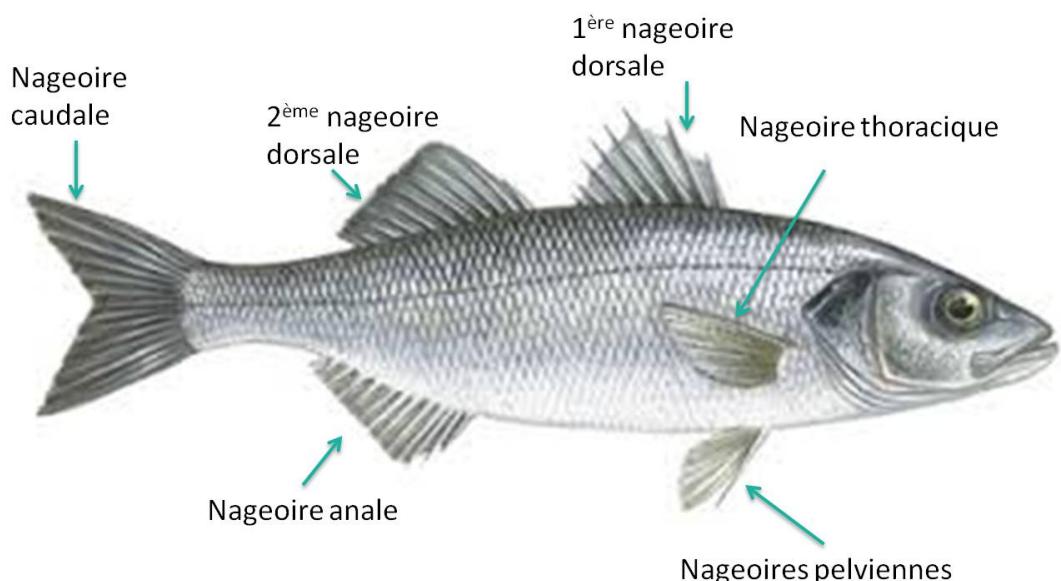


Figure 32 – Morphologie externe du bar (*D. labrax*)

Comme tous les perciformes, le bar 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 possède une nageoire dorsale double : la première compte 9 épines et la deuxième compte 1 épine suivie de 10 à 14 rayons mous (Figure 32). Le dimorphisme sexuel est peu prononcé chez cette espèce. Mais l'un des signes distinctifs décrit par Barnabe (1976), est une tête au profil plus allongé chez les femelles.

Les adultes mesurent en moyenne 50 cm pour 1 kg, mais la taille maximale peut atteindre 103 cm (IGFA, 2001) pour un poids maximal de 12 kg (Fiedler, 1991). Cette espèce peut atteindre l'âge de 30 ans (Kottelat et Freyhof, 2007).

5.1.4. Biologie

Le bar est une espèce côtière appréciant les côtes rocheuses ou sableuses battues par une mer bien oxygénée. C'est une espèce grégaire qui vit en banc dès la fin de la vie larvaire. Il est eurytherme et euryhalin, pouvant ainsi supporter de grandes variations de température (2 à 32 °C) et de salinité (0.5 à 40 ‰). L'âge de la maturité sexuelle est variable selon les latitudes étant plus précoce dans les zones sud, il oscille entre 2 et 7 ans chez le mâle et entre 4 et 8 ans chez la femelle. De même, la période de reproduction débute plus tôt en Méditerranée (autour de décembre) qu'en mer d'Irlande (autour de mai). Les frayères sont situées en zones côtières, sur des fonds rocheux d'une profondeur voisine de 10 m.

Alimentation du bar

Les travaux de Aprahamian et Barr (1985) sur le régime alimentaire des post-larves et des juvéniles évoluant dans les eaux anglaises, rejoignent les conclusions d'autres études menées dans diverses zones géographiques (Arias, 1980; Roblin et Brusle, 1980; Ferrari et Chierogato, 1981). Le régime alimentaire en milieu naturel de ces stades de développement est essentiellement constitué de petits crustacés tel que les Mysidacés, les Amphipodes, les Corophium ou les Cirripèdes et des larves de crustacés décapodes (Figure 33A).

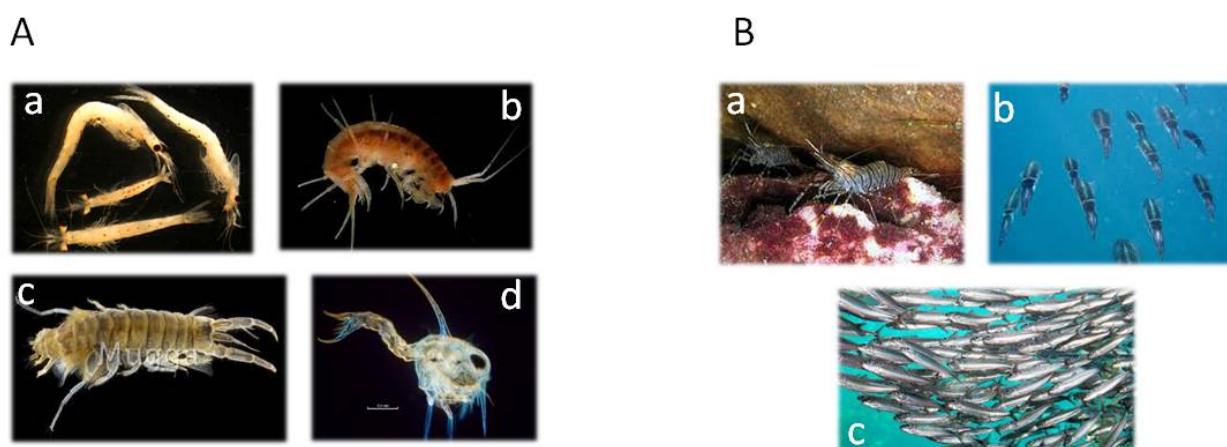


Figure 33 – Régime alimentaire des post-larves et juvéniles (A) et des adultes (B) *D. labrax*

A l'âge adulte, le bar commun devient un excellent prédateur. Il est capable d'ingérer des proies de grande taille telle que des poissons (anchois, sardine, sprat, hareng, merlan, tacaud, lançon, gobie), des crustacés (crabes et crevettes) ou des mollusques céphalopodes (seiches et calmars)(Figure 33B).

Développement et croissance

Les femelles pondent des œufs pélagiques de petite taille, environ 1.3 mm en Manche (Kennedy et Fitzmaurice, 1968). Ces œufs se maintiennent dans la masse planctonique grâce à leur forte teneur en lipides et donc leur faible densité (Pickett et Pawson, 1994). L'éclosion a lieu entre 2 et 5 jours après la ponte. Elle libère des larves d'environ 4 mm (Barnabe, 1976). Leur développement se déroule en zone côtière jusqu'à ce que les larves aient atteint une taille d'environ 10 mm (Jennings et Pawson, 1992). Leur taille leur permet de pénétrer les zones estuariennes où elles resteront pendant les 3 premières années de leur vie. Le bar commun adulte a une croissance lente et un âge de maturité sexuel tardif. Les femelles ont une croissance plus importante que les mâles. La courbe de croissance des individus sauvages dépend de plusieurs facteurs tel que la température du milieu, la disponibilité en nourriture et la physiologie des individus. Parmi ces facteurs, la température a un rôle prépondérant et explique les différences de croissance le long de l'aire de répartition. Les individus vivant dans les eaux méditerranéennes ont une croissance plus rapide que ceux vivant plus au nord.

5.2. Aquaculture du bar

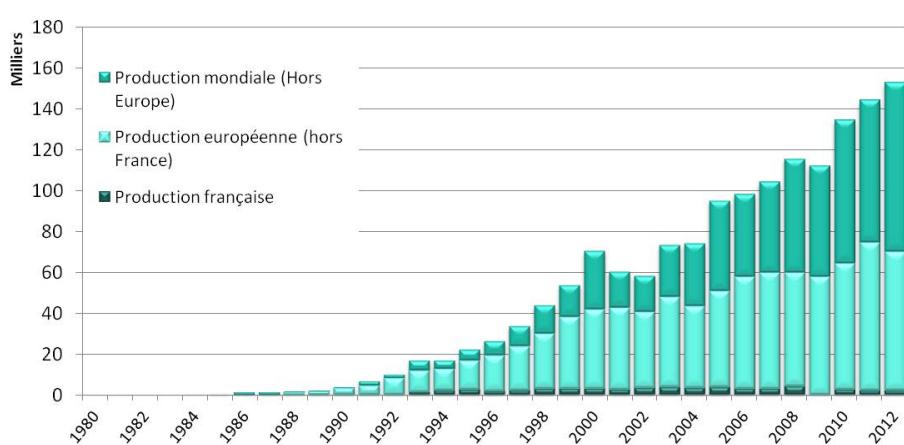


Figure 34 – Tonnages français, européen et mondial de bar commun *D. labrax* (Source : FAOSTAT)

Élevé depuis longtemps dans les lagunes côtières et les réservoirs à marée, le bar fait partie des espèces pionnières de l'aquaculture. La production de masse d'alevins a débuté à la fin des années 60s en France et en Italie (www.FAO.org). Les techniques se sont développées et généralisées en Europe dans les années 70s. Le bar commun a été la première espèce de poisson

marin non salmonidés à être élevée et commercialisée en Europe. Depuis les années 70s, les techniques d'élevage se sont améliorées et la production mondiale de bar commun ne cesse d'augmenter (Figure 34).

L'élevage du bar commun se pratique en système lagunaire extensif ou en système intensif en cage en mer. L'élevage en système lagunaire est la méthode traditionnelle. Elle consiste à piéger les poissons pendant leur migration automnale dans les lagunes. Cette pratique crée des polycultures associant le bar à d'autres espèces de poissons comme les mulets et les anguilles. Sans apport de nourriture, les bars atteignent une taille commerciale en 3 ans environ. La production de ce type d'élevage est de 50 à 150 kg/ha/an. Des améliorations peuvent être apportées en fertilisant et en enrichissant les lagunes en juvéniles. Ce type d'exploitation semi-intensive produit entre 500 et 700 kg/ha/an. Cependant, ces techniques sont peu utilisées aujourd'hui et la majorité de la production se fait en système intensif. Le principe de l'élevage intensif du bar commun est illustré par la figure 35. Les alevins sont obtenus en écloserie où la ponte est contrôlée par la photo-période et/ou l'utilisation d'hormones. Ils subissent alors une période de pré-grossissement en bassins jusqu'à atteindre le stade juvénile, soit 1.5 à 2.5 mm de longueur et être commercialisés aux aquaculteurs. Le grossissement peut être mené en bassins ou en cage en mer. Dans les deux cas, un tri régulier des têtes et queues de lots est nécessaire pour éviter de grandes différences de croissance et le cannibalisme.

L'élevage intensif s'accompagne d'un apport de nourriture. Une alimentation spécifique est apportée aux stades larvaires puis des aliments à base de protéines d'origine végétale sont utilisés pour le grossissement. Ces aliments sont élaborés pour répondre aux besoins nutritionnels du bar commun. Les principes de nutrition aquacole sont ceux décrits au chapitre précédent.

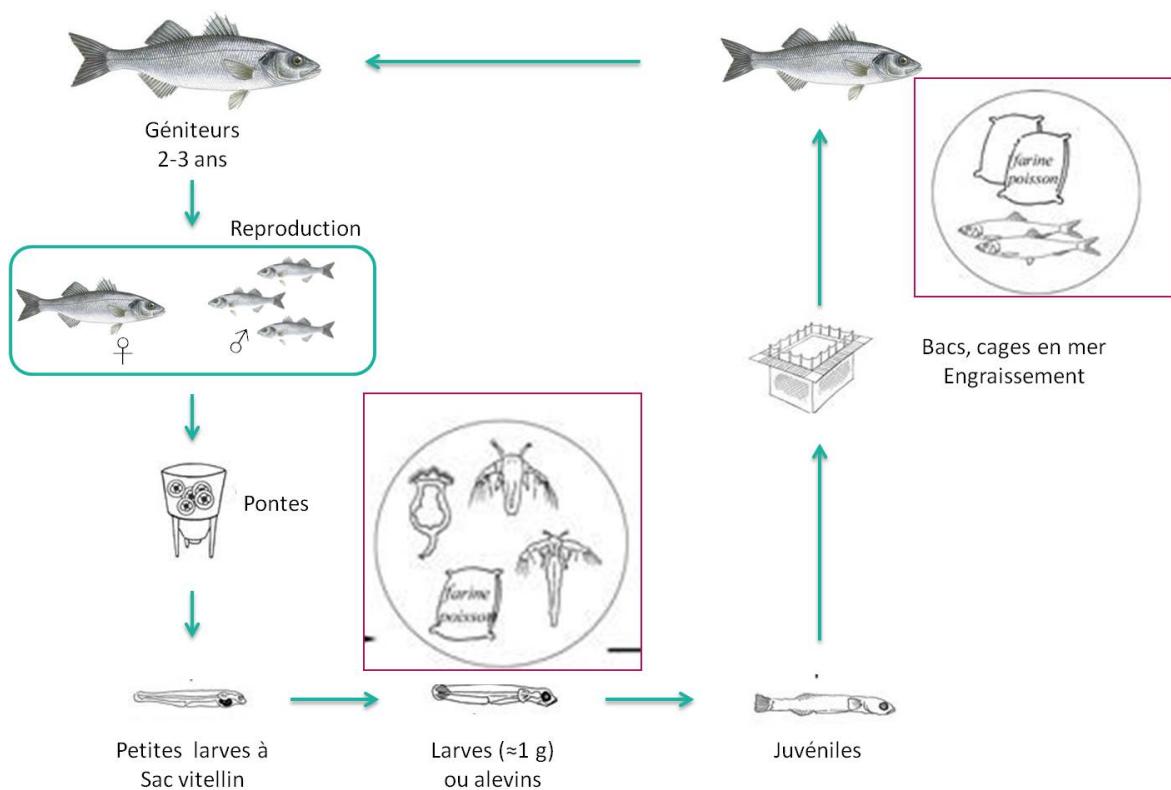


Figure 35 – Principe de l'élevage intensif du bar commun (D'après la FAO)

6 Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans la perspective de la mise en œuvre d'une aquaculture durable reposant sur des pratiques respectueuses de l'environnement. L'aquaculture est un secteur de production vivrière clé pour le maintien et l'amélioration de la sécurité alimentaire dans le monde. Néanmoins la croissance rapide de cette activité a déjà un impact important sur l'environnement et notamment sur les populations de poissons sauvages. L'aquaculture est en effet, très dépendante des farines et huiles de poisson pour la fabrication des aliments aquacoles, élaborées encore aujourd'hui à partir d'espèces de faible valeur commerciale principalement. Elle est également une forte consommatrice de produits chimiques et d'antibiotiques pour palier aux épisodes infectieux favorisés par les conditions d'élevage de l'aquaculture intensive. La recherche de nouveaux ingrédients permettant de diminuer les besoins en farines de poisson et de renforcer la résistance des animaux face aux facteurs biotiques et abiotiques est ainsi un enjeu majeur pour le développement d'une aquaculture durable.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer le potentiel de deux hydrolysats de co-produits marins comme ingrédients destinés à l'alimentation aquacole. Les hydrolysats, grâce à leurs propriétés nutritionnelles, appétentes et bioactives sont de bons candidats pour maintenir les performances de croissance d'aliments riches en farines d'origine végétale et diminuer ainsi le taux de farines de poisson incorporé.

L'étude porte sur deux hydrolysats produits par la société Diana-Aquativ (Groupe Symrise), le premier issu de l'hydrolyse du céphalothorax de la crevette *Litopenaeus vannamei* et le second des co-produits du tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*. L'objectif est de réaliser la caractérisation moléculaire de ces hydrolysats et d'évaluer *in vivo* leurs performances nutritionnelles et bioactives chez un poisson marin carnivore d'intérêt commercial, le bar commun, *Dicentrarchus labrax*.

La première partie de ce travail s'attache donc à la caractérisation moléculaire des deux hydrolysats afin de déterminer leur composition chimique en termes d'acides aminés libres, de peptides et de protéines, facteurs clés pour la compréhension des performances d'un hydrolysat. L'identification de peptides au sein de mélanges si complexes est peu courante à l'heure actuelle. La stratégie analytique a donc fait l'objet d'une mise au point pointue en amont de ce travail. Elle repose sur la dé-complexification de la fraction peptidique grâce à l'association de deux techniques de séparation suivies d'une analyse structurale des peptides par spectrométrie de masse. Cette approche que l'on peut qualifier de peptidomique est complétée par une approche transcriptomique visant à accroître le volume des données transcriptomiques disponibles sur ces deux modèles en réalisant un séquençage haut débit des organes entrant dans la composition

des hydrolysats. Outre la caractérisation des peptides, l'étude de leur répartition massique est également réalisée car il s'agit d'un critère important déterminant les qualités nutritionnelles et fonctionnelles des hydrolysats.

La seconde partie de ce travail s'attache à l'évaluation *in vivo* des performances de ces deux hydrolysats intégrés à l'alimentation du bar commun. Le premier objectif est d'évaluer l'impact de la substitution de la farine de poisson par les hydrolysats dans des aliments à haute teneur en farines d'origine végétale. Les paramètres zootechniques des poissons ont été mesurés dans le cadre d'expériences de conditionnement alimentaire pour comparer les performances des hydrolysats à celles des farines de poisson et ainsi déterminer si ces deux hydrolysats peuvent contribuer à diminuer la proportion de farine de poisson dans l'aliment. L'impact des hydrolysats sur la physiologie digestive du bar commun a été étudié au travers du profil d'expression de trois transporteurs de di/tri-peptides et d'acides aminés libres et d'une enzyme intestinale. Cette étude s'est focalisée sur l'étape d'absorption intestinale car les hydrolysats sont riches en di/tri-peptides et en acides aminés libres qui constituent les formes majoritaires de l'absorption des protéines. Enfin, les farines d'origine végétale sont connues pour provoquer une inflammation du tube digestif chez certaines espèces (Van den Ingh *et al.*, 1991). Une étude histologique de la paroi intestinale associée au profil d'expression de deux marqueurs de l'inflammation (TGF- β et TCR- β) a été réalisée pour évaluer la tolérance du bar commun vis à vis des farines d'origine végétale. Le suivi du profil d'expression de deux effecteurs du système immunitaire inné, le complément C3 et le lysozyme, a également été réalisé afin de mettre en évidence un éventuel effet immunostimulateur.

Deuxième partie

Matériels et méthodes

1 Matériels et méthodes

1.1. Approches peptidomique et protéomique

1.1.1. Extraction et pré-purification des peptides

Une extraction peptidique est réalisée en milieu acide à partir des hydrolysats de *P. vannamei* (poudre) et *O. niloticus* (liquide). 10 g d'hydrolysat sont homogénéisés dans 100ml d'acide trifluoroacétique (TFA) 0.1% et incubés une nuit à 4 °C sous agitation. 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). La fraction organique est élueée par 80% d'acétonitrile à 0.1% de TFA, aliquotée puis évaporée au SpeedVac. Les extraits secs sont conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

1.1.2. HPLC

Les hydrolysats sont fractionnés en Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sur une chaîne chromatographique VARIAN composée d'une pompe à gradient VARIAN-9012 et d'un détecteur UV-VIS VARIAN-9050 à 214 nm. L'acquisition du chromatogramme est gérée par le logiciel Masslynx (Waters).

HPLC par exclusion stérique

Le profil massique des hydrolysats est réalisé en HPLC par exclusion stérique sur une colonne ReproSil (300 x 8 mm, 5 µm ; AIT France) élueée par un mélange EPPI/MeOH (90/10) acidifié par 0.1% d'AcOH avec un débit de 0.7 ml/min. La colonne a été préalablement calibrée à l'aide de cinq marqueurs de masse moléculaire : la ribonucléase A (13700 Da), l'insuline (5778 Da), la vasopressine (1084 Da), le FLRFa (580 Da) et l'hydroxytryptophane (220 Da).

HPLC en phase inverse

Le fractionnement des extraits peptidiques obtenus à partir des hydrolysats est réalisé sur une colonne Nucleodur C18 ec (250 mm x 10 µm) avec un gradient linéaire (H₂O/ACN) de 1.6% d'ACN par minute de 0 à 80% d'ACN et un débit de 1 ml/min. Le contre-ion utilisé est l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0.1%. Des fractions d'une minute sont collectées automatiquement puis évaporées au speed vac.

1.1.3. Extraction de protéines

Hydrolysats

L'hydrolysat est homogénéisé dans 10 volumes de tampon d'extraction (citrate-phosphate 0.1 M, SDS 5%, DTT 1 M, glycérol 20%) et porté à ébullition pendant 10 min. Après centrifugation à 14000 x g pendant 15 min, le surnageant est prélevé et congelé à -20 ° C.

Organes

La tête, les viscères, la queue, la peau, le muscle et les arêtes de 3 individus sont prélevés et congelés dans l'azote liquide. Après broyage dans l'azote liquide, 500 mg de chaque échantillon sont homogénéisés dans 10 volumes d'extraction et incubés 30 min sous agitation à 4 ° C. Deux extractions sont réalisées : la première dans un tampon Tris-HCl (Tris-HCl 10 mM, pH 7.2, EDTA 0.1 mM, DTT 10 mM, PMSF 0.4 mM), la seconde dans un tampon PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, DTT 10 mM, PMSF 0.4 mM). Après centrifugation à 14000 x g pendant 15 minutes à 4 ° C, les surnageants sont prélevés et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

1.1.4. Electrophorèse préparative (OFFGEL)

Les extraits peptidiques et les extraits protéiques sont séparés en électrophorèse OFFGEL (3100 OFFGEL fractionnator, Agilent) selon une gamme de pH s'étendant de 3 à 10 en haute résolution (24 puits) ou basse résolution (12 puits).

Préparation des extraits peptidiques

Les extraits peptidiques sont repris dans 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 d'OFFGEL Buffer).

Préparation des extraits protéiques

Pour chaque organe, les deux extraits protéiques sont poolés afin d'obtenir une quantité totale de 600 µg. L'extrait protéique est repris dans 360 µl d'eau et 1440 µl de Protein OFFGEL Stock Solution 1.25X (Thiourée 2.4 M, Urée 8.4 M, DTT 78 mM, Glycérol 6%, OFFGEL ampholyte pH 3-10).

Migration

Le gel du strip de séparation est monté sur le support (Figure 40) et réhydraté par le dépôt de 40 µl de tampon OFFGEL Stock solution 1X (Peptide ou Protein) dans chacun des puits.

Les électrodes sont hydratées dans cette solution et déposées en appui des puits. Après 15 min, 150 µl d'échantillons 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 ce que le seuil de 20 kV heure soit atteint.



Figure 36 – Dispositif d'électrophorèse préparative, (3100 OFFGEL fractionnator, Agilent)

1.1.5. Réduction, alkylation et digestion trypsique

Les échantillons sont ensuite réduits par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM contenant 25 mM de DTT. Puis, les protéines sont alkylées par incubation pendant 20 minutes à l'obscurité dans un tampon iodoacétamide 55 mM. Enfin, les protéines subissent une digestion trypsique pendant une nuit à 37 °C dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant 6 ng/µl de trypsine. Enfin, les échantillons sont évaporés au speed vac et conservés à -20 °C.

1.1.6. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS Page)

Les séparations en SDS-PAGE sont réalisées sur des gels Tris-HCl 8-16% (GeBa) pour contrôler la qualité des extraits protéiques bruts ou des fractions d'électrophorèse OFFGEL. Les échantillons sont repris dans 10 µl d'EPPI et 10 µl de tampon de charge. Après ébullition, ils sont chargés dans le gel et soumis à une tension de 160 V pendant 45 minutes dans le tampon de migration. La composition des différents tampons est résumée dans le tableau 13. Le gel, après rinçage dans l'EPPI, est fixé par deux bains successifs de 15 minutes dans un mélange EPPI/MeOH/AcOH (50/40/10 ; v/v/v) puis coloré dans le même mélange contenant du bleu de Coomassie 0.1%. Après décoloration dans un mélange EPPI/MeOH/AcOH (60/35/5 ; v/v/v), le gel est conservé dans de l'AcOH 10%.

Tableau 13 – Composition des tampons d'électrophorèse

	Composés	Concentration
Tampon de charge (2X)	Tris-HCl pH 6.8	125 mM
	Glycérol	20%
	SDS	140 mM
	Bleu de bromophénol	0.3 mM
	DTT	200 mM
Tampon de migration (10X)	EPPI	qsp 10 ml
	Tris-HCl pH 8.3	250 mM
	SDS	1%
	glycine	1.92 M
	EPPI	qsp 20 ml

1.1.7. Spectrométrie de masse

nLC-ESI-MS/MS

Afin de concentrer les échantillons en peptides de faible masse moléculaire, les extraits peptidiques réalisés à partir des hydrolysats sont chargés sur une colonne SepPak C18 (Waters) puis élués par un mélange ACN/EPPI/TFA (20%/79.9%/0.1%, v/v/v). Après évaporation au speed vac, les échantillons sont concentrés sur μ C18 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 μ m, 3 μ m – Thermo Scientific). Les phases mobiles utilisées sont composées respectivement d'acide acétique 0.1% et d'un mélange EPPI/ACN/AcOH (20/79.9/0.1 ; v/v/v). Le nano-débit est fixé à 300 nl/min et le profil du gradient est défini comme suit : 0.5% d'ACN par min, 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.

nLC-MALDI-TOF/TOF

Une seconde étape de fractionnement est réalisée à partir de chaque fraction d'électrophorèse OFFGEL préalablement déssalée et concentrée sur μ C18 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 μ m, Agilent Technologies). Les phases mobiles sont composées d'un mélange EPPI/TFA (99.9%/0.1%, v/v) (Phase A) ou d'un mélange EPPI/ACN/TFA (20%/79.9%/0.1%, v/v/v) (Phase B). L'échantillon est élué selon le gradient suivant : 7% de B pendant 5 min, augmentation de la quantité de B de 7% à 70% en 183 min, 70 à 100% de B en 5 min puis retour à 7% de B. Le débit est paramétré à 300 nl/min auquel s'ajoute la matrice CHCA (Acide α -cyano-4-hydroxy cinnamique à 5 mg/ml) au débit de 1.2 μ l/min. Les fractions de 30 s sont déposées automatiquement sur une cible Opti-TOF™384 spots par un AccuSpot (Shimadzu).

Les analyses en MALDI-TOF/TOF sont réalisées sur la plateforme PROTEOGEN sur un AB Sciex 5800 équipé d'un laser OptiBeam™. Le système est calibré avant chaque analyse avec une solution contenant de la dés-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 reflectron 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 reflectron positif par compilation de 2500 (10 x 250) spectres sous une intensité laser de 3900.

Identification des peptides

L'identification des peptides est réalisée par recherche en banque à l'aide du logiciel Mascot 2.2.04 (Matrix Sciences). Les banques de données utilisées proviennent de compilation des données disponibles sur NCBI et des données acquises par le séquençage décrit au paragraphe 1.2.6.

1.2. Approche transcriptomique

1.2.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée dans du Tri Reagent (Sigma). Les tissus prélevés et conservés à -80 ° C sont broyés dans l'azote liquide et 100 mg de tissus sont homogénéisés dans 1 volume de Tri Reagent (mélange de thiocyanate de guanidine et de phénol). Après l'ajout de 0.1 volume de Bromo-chloro-phénol (BCP), les échantillons sont vortexés et incubés 5 min à température ambiante. Puis les échantillons sont centrifugés à 12000 x g, à 4 ° C pendant 15 min pour obtenir une séparation des phases. La phase aqueuse (supérieure) contenant les ARN est transférée dans un tube RNase free contenant 0.5 volume d'isopropanol. Après une incubation de 10 min à température ambiante, les ARN totaux sont précipités par centrifugation à 12000 x g, à 4 ° C pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et 1 volume d'éthanol 75% est ajouté afin de rincer les ARN. Après centrifugation à 7500 x g pendant 5 min, les culots sont séchés à l'air libre puis repris dans de l'eau RNase free. La concentration des extraits d'ARN totaux est mesurée par spectrophotométrie au nanodrop 2000 (Thermo Scientific). L'absorbance à 260 nm permet de calculer la concentration et le rapport A_{260nm}/A₂₈₀ permet d'évaluer le degré de pureté. La qualité des ARN totaux est également contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

1.2.2. Traitement à la DNase

L'ADN génomique pouvant contaminer les extraits d'ARN est éliminé par un traitement à la DNase I RQ1 (Desoxyribonucléase I RNA-Qualified I, Promega). 300 ng d'ARN sont traités par 1 unité de DNase (1U/ μ l) dans 0.1 volume de tampon de réaction 10X (400 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂). Après une incubation de 30 min à 37 ° C, la digestion est stoppée par ajout de 0.1 volume d'une solution de blocage (20 mM EGTA, pH 8), 10 min à 65 ° C. Les ARN totaux sont ensuite placés immédiatement dans la glace.

1.2.3. Rétrotranscription des ARN en ADNc

Les ARN sont dénaturés par chauffage à 65 ° C pendant 5 min, puis ils sont rétrotranscrits dans un volume final réactionnel de 21 μ l, contenant 200 unités de transcriptase inverse M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Promega), 40 unités de RNAsin (Ribonuclease inhibitor, Promega, 250 ng d'hexamère aléatoire, 0.5 mM de chaque desoxy-nucléotides (dNTP), 50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl et 3 mM MgCl₂ pendant 90 min à 37 ° C. L'enzyme est ensuite désactivée par chauffage à 70 ° C pendant 5 min.

1.2.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les ARN totaux ou les fragments d'ADNc amplifiés par qPCR sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Des gels d'agarose de 1% ou 1.5% dans un tampon TAE (40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 2 mM EDTA, ajusté au pH 8.5) sont utilisés. Après migration, les acides nucléiques sont révélés par balnéation dans une solution de bromure d'ethidium à 500 μ g/l pendant 5 min. La taille des fragments est déterminée à l'aide d'un marqueur de taille 100 pb (Promega).

1.2.5. PCR quantitative en temps réel

Design des amorces

Les couples d'amorces utilisés dans ce travail sont tirés de la bibliographie ou sont déterminés à partir des séquences nucléotidiques disponibles en banques de données. Dans le second cas, différents couples d'amorces sont déterminés à l'aide des logiciels Primer-BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et Primer 3 (Version 4.0.0, <http://primer3.ut.ee/>) selon les critères classiques (Taille optimale : 20 nt ; % de GC optimal : 50, Tm optimale : 60 ° C). Les couples sélectionnés sont ensuite testés par le logiciel Amplifix (Version 1.5.4). Les couples d'amorces ainsi que leur origine sont exposés dans le tableau 14.

Tableau 14 – Présentation des amores utilisés

Gène	Nom	Sequences	GeneBank ID	Amplicon	Source
Actine	Act-F	ACGTTGACATCCGTAAGGAC	AJ537421	214nt	Primer3 +Amplifix
	Act-R	ATCCCACATCTGCTGGAAAGGT			
Elongation Factor-	EF1-F	GCTTCGAGGAAATCACCAAG	AJ866727	153nt	Bado- Nilles,2011
	EF1-R	CAACCTCCATCCCTTGAAC			
PepT1	PepT1-F	G'TACATCCCCCTTCCAACA	FJ237043	181nt	Primer3 +Amplifix
	PepT1-R	C'TCCCATCTTCTACCTGTCAAT C			
aaT2	aaT2-F	CCTGAAGGCCTTTGGAGGAT	FM005770	120nt	Primer3 +Amplifix
	aaT2-R	AAGGGCCTGGACACCAGGTAGTT			
ALPP	ALPP-F	GCTAAATGGGCAGAGTGGAG	FJ860000	140nt	Primer3 +Amplifix
	ALPP-R	CCTTGACCCCACAGAGTAA			
TCR	TCR-F	GACGGACGAAGCTGCCCA	AJ493428	149 nt	Primer3 +Amplifix
	TCR-R	TGGCAGCCCTGTGTGATCTTCA			
TGF β	TGF- β -F	GACCTGGGATGGAAGTGG	AM421619	225nt	Pichietti, 2008
	TGF- β -R	CAGCTGCTCCACCTTGTG			
Complément C3	C3-F	CCTCGCAGGATGTTGGTCT	HM563078	156nt	Primer3 +Amplifix
	C3-R	CGAGCCCTGTGTCTACTTCT			
Lysozyme	Lys-F	GGGGACTGATGCCAGGTTGAT	FN667957	141nt	Primer3 +Amplifix
	Lysa-R	AGCCAGGAAATTGTTGCCGG			

Validation et efficacité des couples d'amorces

La validité et l'efficacité de chaque couple d'amorces sont déterminées expérimentalement sur chacun des tissus étudiés. Une réaction de qPCR est réalisée sur une gamme de dilution d'ADNc afin de calculer la pente de la courbe $\log([ADNc])$ en fonction du Ct. L'efficacité des couples d'amorces est calculée selon la formule : $E = 10^{\frac{-1}{a}} - 1$ (où a est la pente). Les couples sont sélectionnés pour une efficacité comprise entre 90% et 110%. Une courbe de fusion est également systématiquement réalisée pour vérifier qu'il n'y ait amplification que d'un seul produit.

Enfin, les produits de qPCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% afin de confirmer l'amplification d'un produit unique et de contrôler la taille de ce dernier.

Amplification

La PCR quantitative en temps réel est réalisée en plaque 96 puits à l'aide du kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Dans chaque puit, la réaction est réalisée dans 15 µl total, 4 µl d'une dilution d'ADNc sont ajoutés au milieu réactionnel contenant la GoTaq Hot Start Polymérase et les amorces à 0.2 mM. L'amplification est réalisée sur un appareil qPCR CFX96 (BioRad). Elle comprend une phase d'activation de l'ADN polymérase de 15 min à 95 °C, puis 40 cycles avec une phase de dénaturation de 15 secondes à 95 °C et une phase d'hybridation des amorces et d'elongation d'1 min à 60 °C. Enfin, une courbe de fusion est systématiquement réalisée par une augmentation de température par pas de 0.5 °C chaque 10 secondes entre 95 °C et 55 °C. Les ADNc sont déposés en triplicat pour les gènes cibles ainsi que pour les deux gènes de références utilisés : Actine (GenBank accession n ° AJ537421) et Facteur d'elongation1 (GenBank accession n ° AJ866727).

1.2.6. Séquençage Illumina

Un séquençage RNASeq Illumina est réalisé sur les organes de crevette *L. vannamei* (tête, pédoncules oculaires, cœur, estomac, hépatopancréas), les échantillons sont préparés à l'aide du kit TruSeq RNA sample Prep kit v2 (Illumina, Part#15026495 Rev.B). Un second séquençage, ciblé sur les co-produits de tilapia *O. niloticus* (tête, viscères, carcasse) est réalisé à l'aide du kit MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Le principe de la réalisation des banques d'ADNc est le même pour les deux kits de préparation.

Préparation des banques d'ADNc

Les banques d'ADNc sont réalisées à partir de 4µg d'ARN totaux. La première étape consiste à sélectionner les ARNm poly-A sur billes magnétiques poly-T (Agencourt AMPure XP ; Beckman Coulter Genomics). Après une étape de retro-transcription (SuperscriptII Reverse Transcriptase, Invitrogen,) la synthèse du second brin d'ADNc est réalisée (Mix, Illumina). Les ADNc

doubles brins sont alors clivés en fragments de 300 pb sur un Covaris S220 (Applied Biosystems). Les paramètres utilisés sont : Duty cycle : 5%, Intensity : 3, Burst *per second* : 200 et Duration : 80 s (50 s pour le Tilapia). La taille des fragments obtenus est contrôlée sur une Tape Station 2200 (Agilent Technologies). Les index et les adaptateurs sont ensuite liqués aux extrémités après une étape de réparation des extrémités et phosphorylation de l'extrémité 3'. Enfin, les fragments sont amplifiés par PCR . La qualité des banques est évaluée sur une Tape Station 2200 (Agilent Technologies) et celles-ci sont quantifiées par qPCR (KAPA qPCR Library Quantification Kit, Kapabiosystems).

Séquençage

Concernant les banques de crevette, les doubles brins d'ADNc sont ensuite dénaturés et les différentes librairies sont poolées par 2 ou 3 et déposées sur une flow cell (Illumina TruSeq PE Cluster Kit v2 - cBot - GA) à la concentration finale de 2 pM par ligne. La flow cell est chargée dans la cBot. Le séquençage est mené sur l'Illumina Genome Analyser GAIIX à la plateforme SéSAME du Centre François Baclesse. Pour le séquençage des banques d'ADNc des co-produits de tilapia, le séquençage est mené sur un l'Illumina Genome Analyser MiSeq. Le séquençage est réalisé en mode lecture de paires sur des fragments de 2 x 150 pb. Le traitement bio-informatique des données ainsi obtenues est réalisé sur la plateforme ABiMS de la station biologique de Roscoff.

Traitement bioinformatique des données

Une première étape de filtration est réalisée à l'aide du logiciel printseq-lite (version 0.20.1 - Schmieder & Edwards, 2011) pour éliminer les reads de faible qualité et de faible complexité. Puis, les ARNr sont éliminés (ribopicker -Schmieder, Lim, & Edwards, 2012) ainsi que les adaptateurs (cutadapt (version 1.01 - Martin, 2011)). Le processus de nettoyage est évalué par le logiciel fastQC (version 0.10.01 <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). L'assemblage des contigs est réalisé par le logiciel Trinity (release 2012-10-05 - Grabherr et al., 2011), qui permet d'assembler les transcriptomes sans s'appuyer sur le génome. Il permet également la normalisation par une étape de "k-mer coverage" et la filtration des contigs de FPKM < 1 (Fragment per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped) et les isoformes les moins abondantes (<1%). Enfin, les reads correspondant aux différents organes sont indépendamment re-mappés sur le transcriptome global à l'aide du logiciel Bowtie (version 0.12.8 - Langmead, Trapnell, Pop, & Salzberg, 2009). Enfin, l'abondance relative de chaque transcrits est estimée avec la méthode du RSEM (version 1.2.0 – Li & Dewey, 2011). L'annotation est réalisée avec Blastx (version 2.2.27) sur la base de données NCBI NR.

1.3. Approche fonctionnelle

1.3.1. Tests d'activités antibactériennes

Préparation des bactéries

Les cultures de bactéries sont réalisées à partir de souches conservées à -80 °C dans du glycérol 15%. Les souches sont ensemencées sur du milieu LB (Luria-Bertani : peptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7.5), Columbia (DIFCO, 30 g/l) et M-72 (Tryptocasein soy agar (BIO-RAD)) selon la nature des microorganismes (Tableau 15). De petits volumes de LB, BHI (Brain Heart Infusion 37 g/l, pH 7.4) et Columbia sont inoculés avec une colonie isolée et sont incubés une nuit. A partir des cultures de nuit, du milieu liquide est ensemencé au 1/100 et 1/200 pour obtenir des cultures en phase exponentielle de croissance (DO < 0.2 à 595 nm).

Tableau 15 – Souches bactériennes et milieux utilisés pour les tests antibactériens

Souche bactérienne	Provenance	Milieu de culture	Milieu de Test	Température
<i>Yersinia ruckeri</i>	CIP 82.80	M72/BHI	PBB ^a	30 ° C
<i>Edwardsiella tarda</i>	CIP 68.6	Columbia (agar)	Columbia	30 ° C
<i>Bacillus megaterium</i>	CIP 51.17	LB (agar)	PB ^b	37 ° C

a. PB + extract de boeuf 0.3%

b. PB (Poor Broth) : peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.4

Conditions de tests

Les tests antibactériens sont réalisés en milieu liquide selon le protocole décrit par Hétru et Bulet (1997). Les échantillons à tester (extrait peptidique ou fraction d'HPLC) sont repris dans de l'eau stérile et 30 µl sont déposés en triplicat dans des plaques 96 trous (Nunc). Les cultures en phase exponentielle de croissance sont diluées dans le milieu adapté (Tableau 15) pour obtenir une DO de 0.001, puis 100 µl de ces suspensions sont déposés dans chaque trou. Un témoin de la croissance bactérienne est réalisé avec 10 µl d'eau stérile et 100 µl de suspension bactérienne. Le témoin de l'inhibition de croissance est composé de 100 µl de culture et de 10 µl d'oxytétracycline (1 µg/µl). Enfin, les plaques sont incubées pendant 20 h sous agitation et l'absorbance à 595 nm est mesurée pour évaluer la croissance bactérienne.

1.3.2. Test de conditionnement alimentaire *in vivo*

Structures d'élevage

Les expérimentations ont été menées dans les structures d'élevage de l'IFREMER au Centre de Brest (Figure 37) qui sont composées de 24 bassins de 80 l alimentés par de l'eau de mer (salinité : 35 g/l) filtrée sur des filtres à sable sous pression et thermo-régulée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. La photopériode est fixée à 12 heures. Les bassins sont équipés de distributeurs automatiques d'aliment (Arvotech, Finland).



Figure 37 – Structure d'élevage de l'IFREMER de Brest

Conditionnement alimentaire

Les expériences sont menées sur des bars communs de masse initiale de 6.5 ± 0.1 g. Après une période d'acclimatation, les poissons sont répartis dans les 24 bassins, à raison de 40 individus par bassin. Les expériences de conditionnement alimentaire sont réalisées en triplicats. Les poissons sont nourris à satiété pendant 1 heure par jour. La ration est déterminée selon la quantité nourriture non-ingérée collectée chaque jour.

Les poissons sont nourris selon 5 régimes expérimentaux dont la composition est donnée dans le tableau 16. Les trois régimes FM5, FM10 et FM20 contenant respectivement 5%, 10% et 20% de farine de poisson (FM), sont utilisés comme témoin. Les hydrolysats sont introduits à hauteur de 5% dans l'aliment FM5, les 15% de farine de poisson sont ainsi remplacés par 5% d'hydrolysat. Le profil en acides aminés des différents régimes expérimentaux est équilibré par l'ajout de lysine et de méthionine. La fabrication par extrusion de ces aliments a été réalisée au centre Biomar (Brande, Danemark).

Tableau 16 – Formulation et composition proximale des régimes expérimentaux utilisés pour les expériences de conditionnement alimentaire

Ingédient	FM5	FM10	FM20	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% FH
Farine de poisson	5.00%	10.00%	20.00%	5.00%	5.00%
Hydrolysat de Tilapia	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.00%
Hydrolysat de crevette	0.00%	0.00%	0.00%	5.00%	0.00%
Farine de gluten de blé	21.83%	19.45%	14.53%	20.08%	19.81%
Farine de gluten de maïs	16.90%	15.40%	11.40%	15.57%	15.37%
Farine de soja 48% CP	15.89%	15.36%	15.14%	14.70%	14.52%
Farine de colza	10.24%	9.24%	7.24%	9.43%	9.31%
Farine de blé	11.64%	13.06%	16.22%	12.53%	13.47%
DL méthionine	0.59%	0.55%	0.45%	0.54%	0.54%
Lysine-HCl	1.67%	1.48%	1.08%	1.54%	1.52%
Mono calicum phosphate	2.60%	2.15%	1.25%	2.38%	2.34%
Huile de poisson	11.28%	10.97%	10.33%	10.88%	10.77%
Premix (vitamine et minéraux)	2.36%	2.36%	2.36%	2.36%	2.36%
Composition proximale (%)					
Matière sèche	92.90%	94.00%	94.00%	93.80%	93.60%
Protéine	46.90%	47.30%	48.70%	47.60%	47.40%
Lipide	16.10%	16.40%	16.80%	16.10%	16.30%
Cendre	6.00%	6.30%	6.40%	6.30%	6.10%
Energie (Kcal/g)	5.17%	5.18%	5.18%	5.18%	5.19%
N soluble (% protéine)	13.20%	13.80%	15.00%	18.50%	18.80%

Prélèvements

A la fin du conditionnement alimentaire, les poissons sont anesthésiés avec du phenoxyéthanol 0.2% 16 h après leur dernier nourrissage et sacrifiés par section cervicale. L'intestin est disséqué et les échantillons sont rapidement congelés dans l'azote liquide pour les analyses de biologie moléculaire ou placés dans du fixateur (Davidson) pour l'histologie. Le foie est également prélevé et congelé dans l'azote liquide.

1.3.3. Histologie

Les prélèvements d'intestins sont fixés dans du Davidson (10% d'eau de mer filtrée, 30% d'éthanol 95%, 20% de formaldéhyde à 40%) pendant 72 h à 4 ° C. Après déshydratation dans des bains successifs d'éthanol 70%, 95% et 100%, les prélèvements sont placés dans le butanol avant inclusion dans la paraffine. Des coupes de 3 µm d'épaisseur de l'intestin proximal et distal sont réalisées au microtome puis colorées à l'hématoxyline-eosine. Chaque section est examinée au microscope (Nikon Eclipse 80i) couplé à une caméra (Nikon DXM1200-C) pour les mesures suivantes : diamètre interne (DI), diamètre externe (DE), périmètre externe (PE) et périmètre interne (PI). Chaque section est également analysée pour une étude histopathologique incluant la quantification des cellules à mucus, des agrégats lymphocytaires dans la sous muqueuse, de l'infiltration des lymphocytes dans la muqueuse, et des cellules éosinophiles granulaires dans la sous muqueuse. L'ensemble de ces analyses a été réalisé par le laboratoire ICTIOVET (Barcelone).

Troisième partie

Caractérisation moléculaire des hydrolysats de crevette et de tilapia

1 Introduction

Les hydrolysats étudiés dans ce travail de thèse sont issus des co-produits de la crevette *L. vannamei* et du tilapia du Nil *O. niloticus*. Il s'agit de deux espèces aquacoles majeures au niveau mondial avec une production annuelle supérieure à 3 millions de tonnes. La crevette à pattes blanches est l'une des espèces de crevette les plus commercialisées au monde, représentant 67% des crevettes d'élevage en 2008 (Bostock *et al.*, 2010). Ce produit très prisé est intégralement destiné à l'alimentation humaine et commercialisé sous diverses formes : fraîches, congelées, cuites ou marinées, entières ou décortiquées. La majeur partie du tonnage produit fait ainsi l'objet d'une transformation industrielle (étêtage, décorticage) engendrant par conséquent des co-produits (céphalothorax, cuticule, queue), représentant 60% du poids frais chez les crustacés (Wang *et al.*, 2011).

Les tilapias constituent également un groupe d'espèces dont l'élevage est très développé. On dénombre en effet, plus de 22 espèces aquacoles dont les plus communes sont *O. niloticus*, *O. mossambicus*, et *O. aureus*. Ils forment ainsi la troisième famille de poissons la plus produite dans le monde, derrière les carpes et les salmonidés. Ils sont majoritairement produits en Asie (Chine, Philippines, Indonésie, Thaïlande, Taïwan...), en Afrique (Égypte...) et en Amérique (Colombie, Cuba...) comme le montre la figure 38 (www.FAO.org). Le tilapia du Nil, *O. niloticus*, est l'une des espèces de tilapia les plus produites dans le monde en raison de sa robustesse et de sa fécondité. Son élevage se pratique à toutes les échelles, des petites exploitations rurales aux multinationales, il est d'ailleurs surnommé aujourd'hui "le poulet aquatique" (Fitzsimmons, 2008). Le tilapia est omnivore et se nourrit dans le milieu naturel de phytoplancton, d'algues et de plantes aquatiques. Dans un contexte d'élevage, cette espèce tolère des aliments contenant peu de farine de poisson (2-5%) (Tacon *et al.*, 2011) et a un taux de croissance élevé (Uddin *et al.*, 2006) ce qui rend son élevage à grande échelle intéressant.

Néanmoins, le tilapia du Nil est une espèce de poisson qui génère beaucoup de co-produits car le filet ne représente qu'une plus faible proportion du corps contrairement à d'autres espèces aux formes plus adaptées. Ces deux espèces sont ainsi produites massivement dans le monde et génèrent de grandes quantités de déchets issus de leur transformation industrielle. Ces déchets engendrent des problèmes environnementaux, notamment en perturbant les écosystèmes côtiers (Islam *et al.*, 2004), mais constituent également une matière première intéressante pouvant être valorisée. A l'heure actuelle, les voies de valorisation principales sont la transformation de ces co-produits en farines et l'extraction de la chitine.

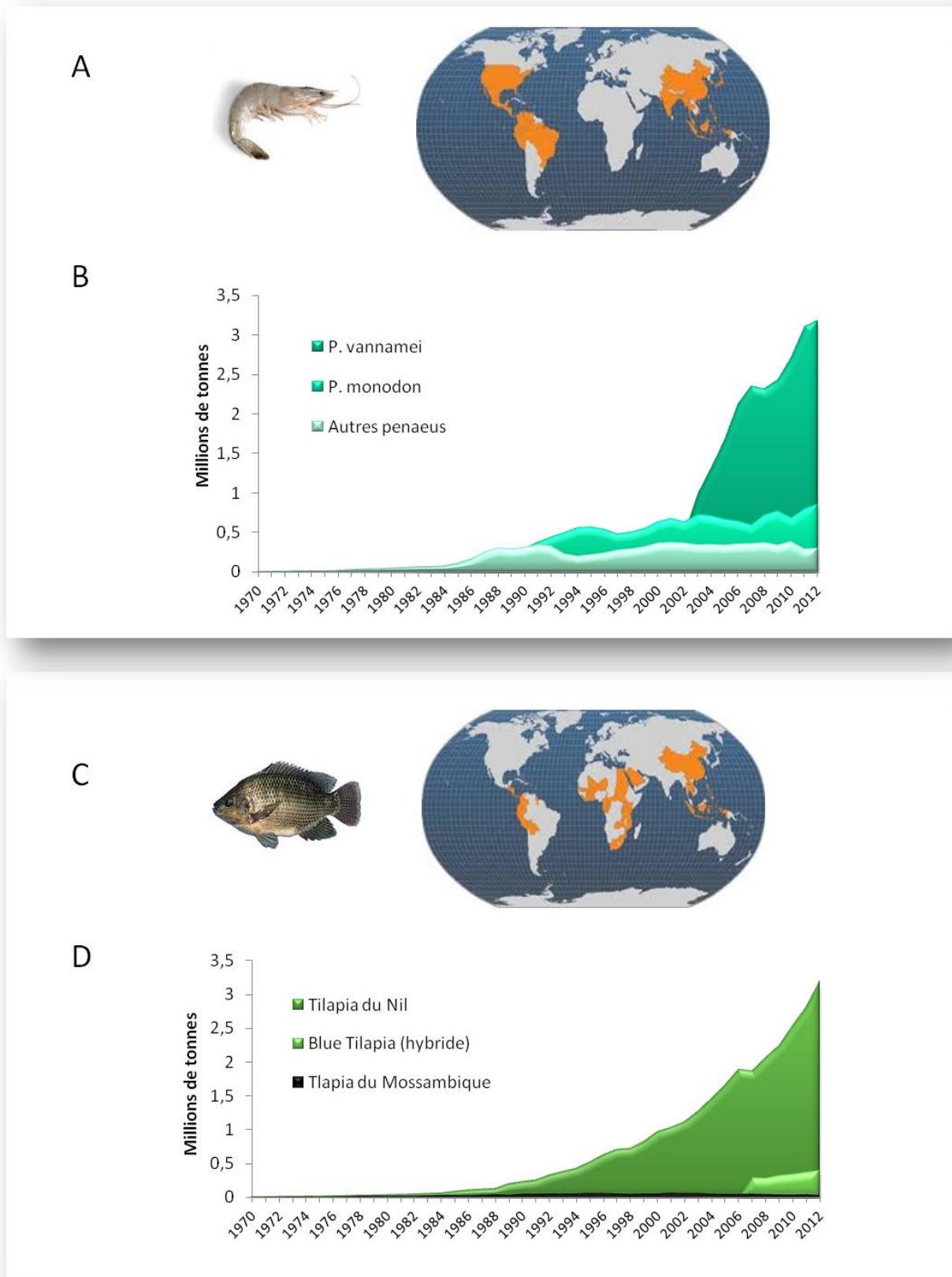


Figure 38 – Vue globale de la production de *L. vannamei* (A) et *O. niloticus* (C). Les cartes du monde mettent en évidence les principaux pays producteurs de ces deux espèces (source www.FAO.org). Les productions mondiales issues de l'aquaculture des crevettes penéides et des tilapia depuis les années 70s sont illustrées dans les deux graphiques en B et D (source : FAOSTAT).

Toutefois, l’hydrolyse enzymatique est également une voie de valorisation qui mériterait d’être développée pour obtenir des produits d’une valeur ajoutée supérieure. De plus, l’hydrolyse enzymatique permet à la fois de valoriser la fraction protéique et la chitine chez les crustacés (Babu *et al.*, 2008). Les hydrolysats protéiques trouvent des applications dans les domaines de la nutrition humaine et animale, de la cosmétique et de la pharmaceutique (Tableau 17).

Tableau 17 – Exemples d’hydrolysats protéiques de poisson commercialisés à des fins nutraceutiques ou comme aliments fonctionnels pour promouvoir la santé (Chalamaiah *et al.*, 2012).

Product brand name	Particulars	Nutraceutical applications	Country	Reference
Seacure®	Prepared by hydrolyzing deep ocean white fish proteins	Dietary supplement helps to support the cells in the gastrointestinal tract and regulate bowel functions.	US and Canada	Marchbank <i>et al.</i> (2008)
Amizate®	Produced from Atlantic salmon fish proteins by autolysis	Sports nutrition (supports the body's muscle anabolism and metabolic recovery).	North America	Nesse <i>et al.</i> (2011)
Stabilium® 200	Prepared from <i>Molva dypterygia</i> by autolysis	Supports the body's response to stress and provides nutritional support for memory and cognitive function.	UK	Guerard <i>et al.</i> (2010)
PROTIZEN®	Produced by enzymatic hydrolysis of white fish proteins	It is “mood food” and dietary supplement to fight against stress and its symptoms (weight disorders, work pressure, sleep troubles, concentration difficulties and mood troubles).	UK	Guerard <i>et al.</i> (2010)
Vasotensin®	Produced from Bonito (<i>Sarda orientalis</i>) by thermolysin hydrolysis	It supports healthy vascular function for optimal blood flow and healthy blood pressure levels.	US and Japan	www.metagenics.com
PEPTACE®	Produced from Bonito (<i>Sarda orientalis</i>) by thermolysin hydrolysis	It lowers the blood pressure by inhibiting ACE enzyme.	US and Japan	www.naturalfactors.com
Nutripeptin®	Manufactured by enzymatic hydrolysis of Cod fish fillet/muscle protein	It helps in the blood glucose stabilization, and weight management.	UK and USA	Guerard <i>et al.</i> (2010)
LIQUAMEN®	Prepared from <i>Molva molva</i> by autolysis	Dietary supplement that helps in reducing oxidative stress, lowering glycemic index and anti-stress.	UK	Guerard <i>et al.</i> (2010)
MOLVAL®	Produced from North Atlantic fish <i>Molva molva</i> by enzymatic hydrolysis	Dietary supplement recommended for cholesterol equilibrium, stress control and promotes good cardiovascular health.	UK	www.dielen.fr
SEAGEST®	Prepared by hydrolyzing deep ocean white fish proteins	It supports the structure of the intestinal lining and promotes intestinal health.	US	www.trimedica.com

Leur valorisation dans les domaines agro-alimentaire et pharmaceutique est soumise à une réglementation européenne contraignante. L’obtention des Allégations Nutrition Santé (ANS) et des Allégations Santé (AS) au près de l’EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) est en effet le fruit d’une démarche longue et difficile pour laquelle une connaissance approfondie de leur composition ainsi qu’une démonstration *in vitro* et *in vivo* des effets bénéfiques de l’aliment/ingrédient est nécessaire. La valorisation des hydrolysats dans le domaine de l’aquaculture est cependant moins contraignante car ils sont considérés comme des matières premières et non comme des additifs alimentaires. Néanmoins, une caractérisation précise de leur composition est nécessaire pour la standardisation des produits, la comparaison des différents produits entre eux ainsi que la détermination de la corrélation entre la composition peptidique des hydrolysats et leurs performances nutritionnelles ou leur bioactivité.

A l’heure actuelle, la connaissance de la composition des hydrolysats protéiques se limite essentiellement à la détermination de la composition biochimique globale, de la composition en acides aminés totaux et libres et à la détermination du profil de masses moléculaires. Ce dernier est en effet un élément important de la caractérisation d’un hydrolysat car il détermine de nombreuses propriétés telles que les propriétés fonctionnelles (capacité émulsifiante et tampon, osmolarité...) et physiologiques (taux d’absorption, allergénicité...) (Neklyudov *et al.*, 2000).

Dans ce contexte, il devient nécessaire d'approfondir les techniques d'analyse de ces mélanges particulièrement complexes mêlant protéines, peptides et acides aminés libres à d'autres constituants non azotés tels que des minéraux, des sucres ou des lipides.

La technique la plus utilisée pour déterminer le profil de masses moléculaires est la Chromatographie Haute Performance d'Exclusion Stérique. La composition en acides aminés est également déterminée grâce à des techniques de chromatographie et des protocoles standardisés. Cependant la caractérisation structurale des peptides composant un hydrolysat est encore très peu développée et fait l'objet de la première partie de ces travaux de doctorat.

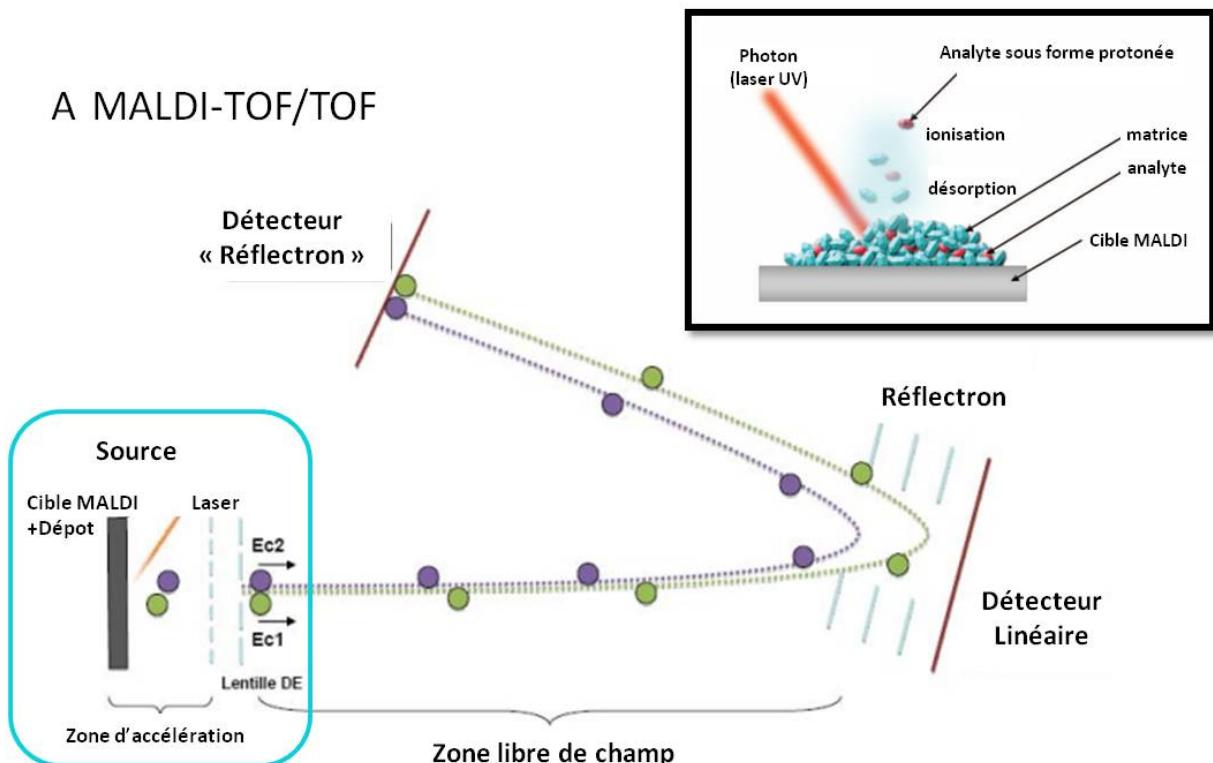
Les hydrolysats protéiques, particulièrement lorsqu'ils sont issus de co-produits, constituent des mélanges très complexes. Les techniques de spectrométrie de masse qui permettent de déterminer une séquence peptidique ne sont pas applicables de manière directe à ces mélanges. La fraction peptidique doit ainsi être préalablement décomplexifiée grâce à diverses techniques de séparation.

Il existe deux catégories de techniques de séparation couramment utilisées pour fractionner des mélanges peptidiques : les procédés membranaires et les procédés chromatographiques (Jang et Lee, 2005). Ces méthodes sont basées sur des phénomènes physico-chimiques tels que la solubilité (solubilisation sélective), la polarité (chromatographie d'adsorption), l'affinité (chromatographie d'affinité), la taille (chromatographie d'exclusion de taille, ultrafiltration), l'hydrophobie de surface (chromatographie en phase inverse), la charge électrique (chromatographie d'échange d'ions) ou la combinaison de la charge électrique et de la taille (électrophorèse de zone sur support, nanofiltration). Parmi ces techniques, la chromatographie haute performance en phase inverse est l'une des plus répandue. Cette technique, basée sur la différence d'hydrophobicité de composés en mélange est très bien adaptée pour le fractionnement des peptides et fréquemment utilisée pour la purification de peptides bioactifs grâce à sa haute capacité résolutive. Des techniques d'électrophorèse peuvent également être employées pour le fractionnement de mélanges peptidiques. La plus connue est la SDS-PAGE réalisant une séparation basée sur la masse moléculaire. Néanmoins cette technique est difficilement applicable à l'étude des hydrolysats car elle n'est pas adaptée à la séparation des peptides de masse moléculaire inférieure à 2500 Da. La technique de l'électrophorèse capillaire est quant à elle mieux adaptée, elle est basée sur la différence de mobilité de molécules chargées dans un fin capillaire. Bien que très résolutive, elle est néanmoins réservée à des fins analytiques en raison des très faibles quantités utilisées. L'électrophorèse préparative OFFGEL est une technique récente intéressante car elle permet de fractionner les mélanges peptidiques en fonction du point isoélectrique à un pH donné en milieu liquide. Les fractions sont ainsi facilement collectées et cette technique est particulièrement adaptée en amont d'une analyse en spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse (MS) est une technique destructive permettant l'identification et la quantification de composés tels que les peptides et les protéines. Cette technique repose sur la détermination du rapport masse-sur-charge (m/z) de molécules ionisées. Il existe différents types de spectromètres de masse couplant chacun une source d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur. Le MALDI-TOF/TOF et l'ESI-MS/MS sont deux techniques de spectrométrie de masse couramment utilisées pour l'identification de peptides. Le MALDI-TOF/TOF associe une source d'ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) à un détecteur de masse à temps de vol (TOF) comme illustré à la Figure 39A. L'ionisation se fait sous l'impulsion d'un laser qui conduit à l'accumulation d'énergie dans les molécules composant la matrice. Ces dernières ainsi ionisées transfèrent un proton H^+ à l'analyte qui va s'ioniser et se désorper. L'analyseur de type temps de vol associé sépare les ions en fonction de leur vitesse de déplacement dans une zone libre de champs appelée tube de vol et mesure le temps nécessaire aux ions pour parcourir une distance fixe après avoir été accélérés par un champ magnétique. L'ESI-MS repose sur un principe différent (Figure 39B). La source d'ionisation est un electrospray dans lequel les analytes en solution sont transformés en microgouttelettes chargées sous l'action d'une différence de potentiel entretenue par deux électrodes et de l'application d'un gaz de nébulisation. Le trajet suivi par ces microgouttelettes donne lieu à l'évaporation du solvant provoquant la libération des ions en phase gazeuse focalisés ensuite vers l'analyseur. L'analyseur de type trappe ionique associé est composé d'une électrode annulaire et de deux électrodes "chapeaux" hyperboliques, ces électrodes sont capables de piéger les ions de trajectoire stable dans les plans axial et radial puis grâce à l'analyse mathématique de ces trajectoires détermine le rapport m/z de ces ions.

Ces deux techniques de spectrométrie de masse, bien que fonctionnant sur des principes différents, utilisent chacune des sources d'ionisation dites douces. Elles permettent de ne pas (ou peu) fragmenter les molécules et sont ainsi adaptées à l'étude de macromolécules biologiques telles que les peptides et les protéines. Elles sont également aisément couplées à des techniques de séparation telle que la chromatographie en phase inverse. Néanmoins les domaines d'application de ces techniques diffèrent légèrement. Le MALDI-TOF/TOF est en effet peu adapté aux molécules de masse moléculaire inférieure à 800 Da mais il permet de générer principalement des ions monochargés simplifiant l'analyse des spectres MS. Il rend également possible l'étude de molécules de masse moléculaire très élevée (500 kDa). L'ESI-MS/MS est quant à elle adaptée à l'étude de molécules de faible masse moléculaire mais génère des ions multichargés et ainsi des spectres MS plus difficiles à interpréter. Ces deux techniques sont ainsi particulièrement intéressantes pour l'étude de la composition peptidique d'hydrolysat car elles sont très complémentaires. L'enjeu de cette première partie est de réaliser la caractérisation moléculaire des hydrolysats de *P. vannamei* et d'*O. niloticus* afin de pouvoir déterminer et expliquer leurs propriétés nutritionnelles et biologiques.

A MALDI-TOF/TOF



B ESI-MS/MS

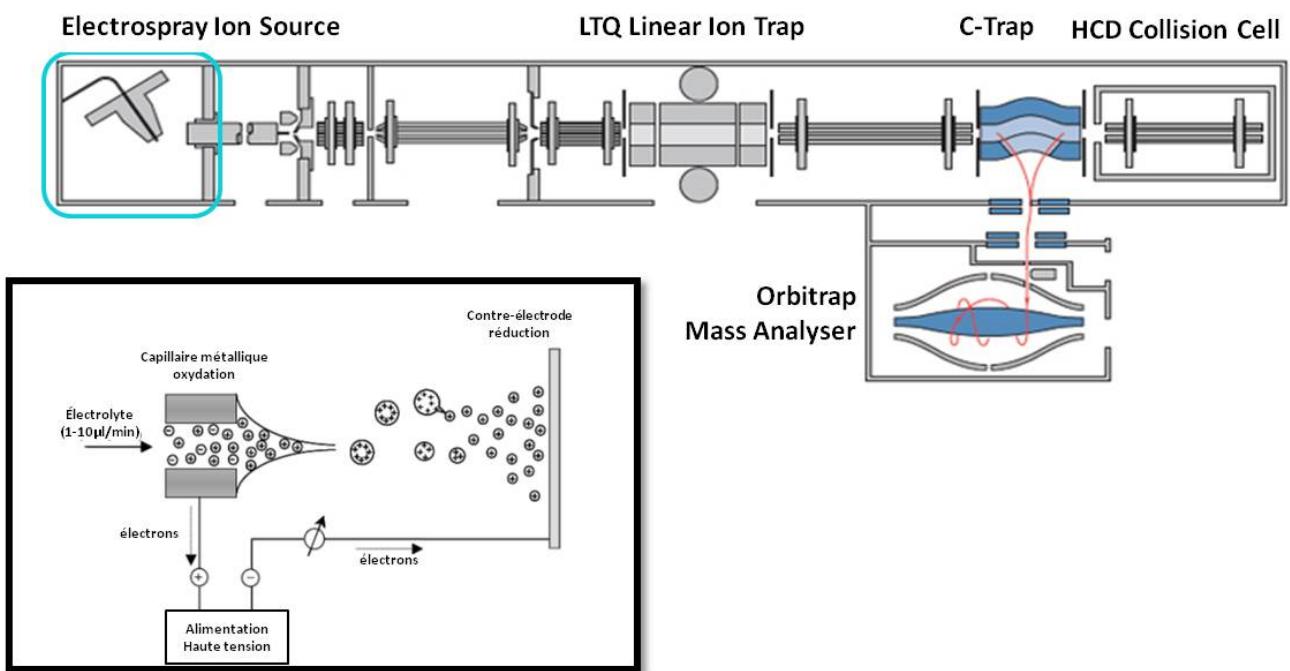


Figure 39 – Principe du MALDI-TOF/TOF (A) et de l'ESI-MS/MS (B) illustré d'après Même (2010) et Canon (2010).

2 Démarche expérimentale

L'objectif de cette première partie est la caractérisation moléculaire de deux hydrolysats issus de co-produits d'espèces élevées en aquaculture : la crevette *L. vannamei* et le tilapia *O. niloticus*. La fraction peptidique a fait l'objet d'une analyse structurale très poussée grâce à une stratégie innovante reposant sur la combinaison de deux approches -omiques : transcriptomique et peptidomique. Des banques de données transcriptomiques réalisées à partir des co-produits entrant dans la composition des hydrolysats ont été construites en utilisant les nouvelles techniques de séquençage haut débit de la société Illumina et les séquenceurs de dernière génération GAIIX et MiSeq.

Cette première étape a été complétée par une double analyse peptidomique. La première repose sur deux séparations successives des extraits peptidiques, l'électrophorèse préparative OFFGEL qui permet de séparer les peptides en milieu liquide selon le point isoélectrique à un pH donné (Figure 40) et la nanoLC-C18 en phase inversée qui fractionne les peptides en fonction de l'hydrophobilité, suivi par un criblage des fractions en MALDI-TOF/TOF. La seconde est basée sur une séparation en nanoLC-C18 suivie par un criblage en ESI-MS/MS.

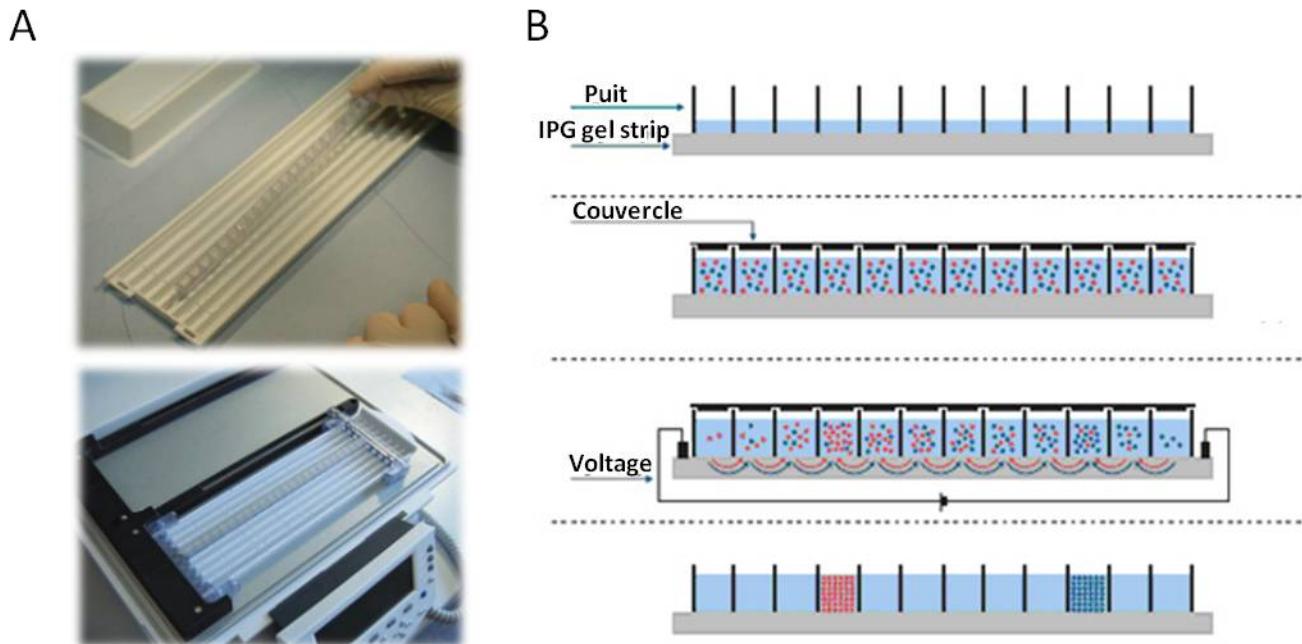


Figure 40 – L'électrophorèse préparative OFFGEL. A : Dispositif Agilent Fractionator 3100. B : Schéma représentant le principe de séparation des peptides/protéines en fonction de leur point isoélectrique.

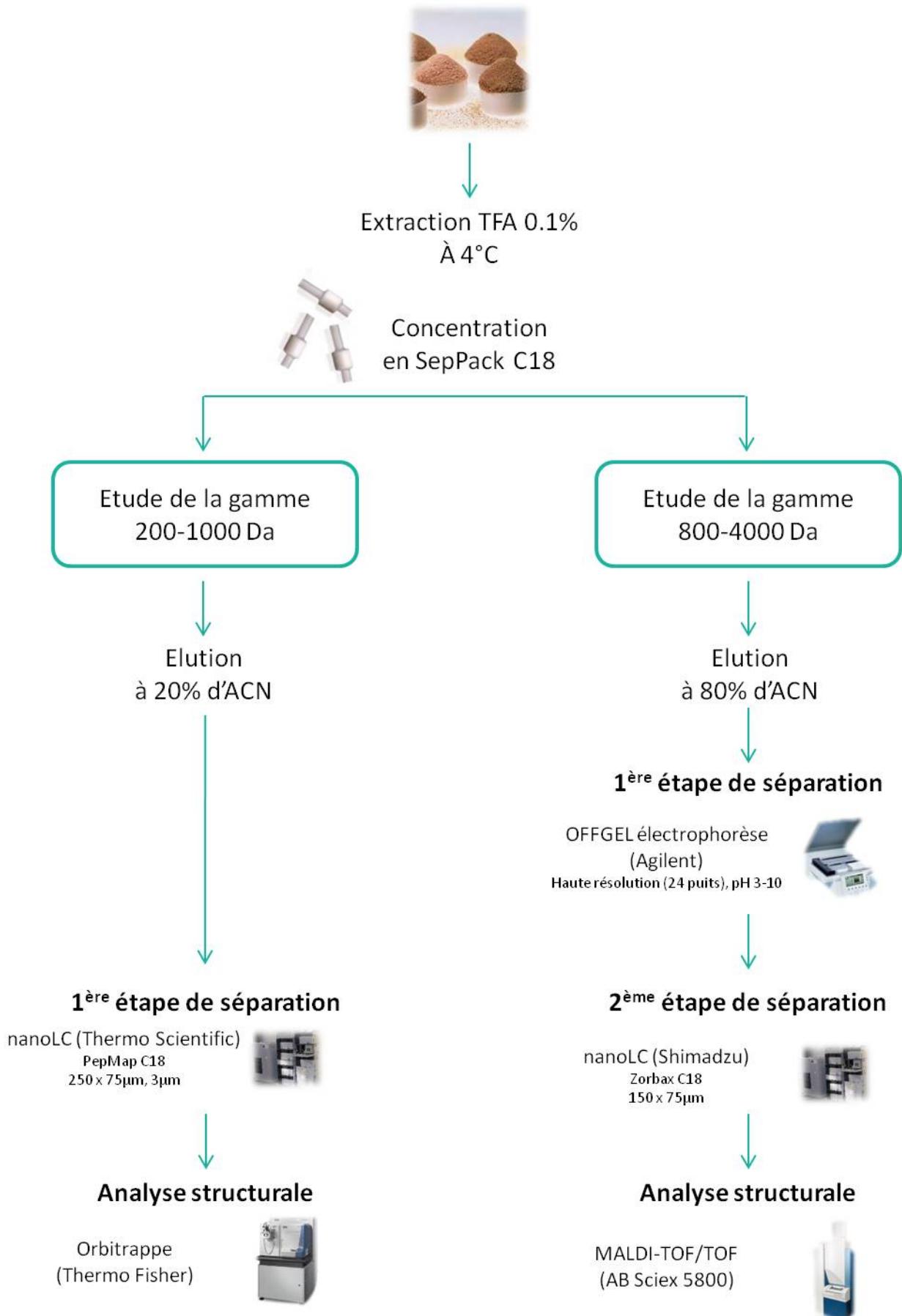


Figure 41 – : Approche expérimentale mise en œuvre pour l'identification des peptides hydrolytiques composant les hydrolysats.

Comme l'illustre la Figure 41 , ces deux techniques de spectrométrie de masse permettent de balayer l'ensemble de la gamme de masses : 200-1000 Da pour l'ESI et 800-4000 Da pour le MALDI. L'optimisation des étapes de préparation d'échantillon, concentration/dessalage et séparation, permet d'améliorer la qualité des spectres MS/MS, et donc d'accroître le rendement d'identification. L'identification a été réalisée avec le logiciel de recherche Mascot à partir des banques de données transcriptomiques existantes disponibles sur NCBI complétées par les banques de données créées dans cette étude spécifiquement à partir des co-produits.

L'approche expérimentale décrite ci-dessus a été complétée, pour le tilapia uniquement, par une étude du protéome des co-produits avant hydrolyse (Figure 42). L'objectif de cette démarche est d'évaluer la validité des approches *in silico* destinées à prédire, sans analyse peptidomique, la composition en peptides hydrolytiques d'un hydrolysat. L'approche *in silico* peut se décliner de deux manières distinctes : la détermination d'un protéome théorique à partir du transcriptome et la simulation *in silico* de la digestion de ce protéome, ce qui permet d'établir une liste de peptides hydrolytiques présomptifs. Une seconde approche que nous pouvons qualifier de semi *in silico* consiste à réaliser une étude protéomique classique du co-produit étudié suivi d'une digestion *in silico* des protéines identifiées pour déterminer un peptidome hydrolytique encore une fois présomptif. Les deux approches *in silico* bénéficient aussi des données d'expression qui peuvent permettre l'affinage de la prédiction de la composition attendue en peptides hydrolytiques. Cette étude comparative a été réalisée exclusivement à partir des banques de données transcriptomiques créées à partir des co-produits.

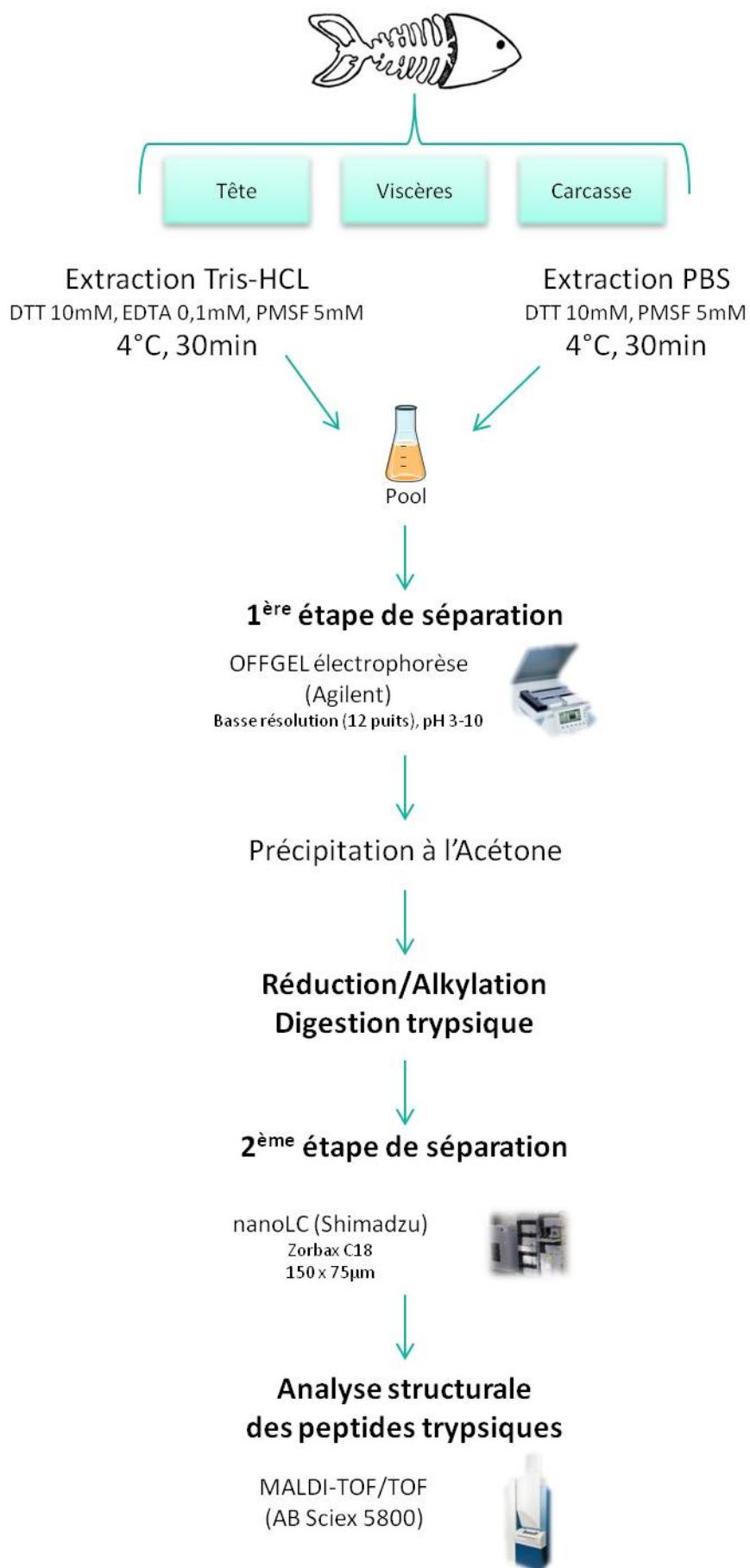


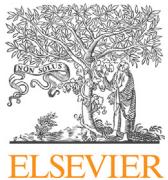
Figure 42 – Approche expérimentale mise en oeuvre pour l'étude du protéome des co-produits de tilapia

3 Chapitre 1

Caractérisation moléculaire de l'hydrolysat de crevette par une approche peptidomique associée à une approche transcriptomique



Les travaux de caractérisation menés sur l'hydrolysat de crevette, *L. vannamei*, ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Biotechnology, acceptée en 2014. Ces travaux regroupent la détermination de la composition biochimique, de la composition en acides aminés libres et totaux, du profil de masses moléculaires établi en HPLC par exclusion de taille ainsi que de la caractérisation des peptides hydrolytiques constituant l'hydrolysat. Ces résultats sont complétés par une évaluation de l'activité antimicrobienne de l'hydrolysat par des tests *in vitro* sur des souches bactériennes Gram + et Gram -.



Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*)



Marie Robert ^{a,b}, Céline Zatylny-Gaudin ^{a,b}, Vincent Fournier ^d, Erwan Corre ^e, Gildas Le Corguillé ^e, Benoît Bernay ^c, Joël Henry ^{a,b,c,*}

^a Université de Caen Basse-Normandie, UMR BOREA, IBFA, F-14032 Caen, France

^b UMR BOREA Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques" MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207, France

^c Proteogen, SF 4206 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France

^d Aquativ (Diana Group), ZA du Goheilis, 56250 Elven, France

^e ABiMS, FR2424 CNRS-UPMC, Station Biologique, 29680 Roscoff, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2014

Received in revised form 17 June 2014

Accepted 25 June 2014

Available online 3 July 2014

Keywords:

Litopenaeus vannamei hydrolysate

RNAseq

OFFGEL electrophoresis

Mass spectrometry

Antimicrobial activity

ABSTRACT

An RNAseq approach associated to mass spectrometry was conducted to assess the composition, molecular mass distribution and primary sequence of hydrolytic peptides issued from hydrolysates of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by-products. High performance size exclusion chromatography (HPSEC) analyses indicated that 69.2% of the 214-nm-absorbing components had apparent molecular masses below 1000 Da, and 88.3% below 2000 Da. OFFGEL-nLC-MALDI-TOF/TOF and nLC-ESI-MS/MS analyses led to the identification of 808 peptides based on the NCBI EST databank (161,397 entries) completed by the new *L. vannamei* databank (58,508 entries) that we created from the RNAs of tissues used for hydrolysate production. Whereas most of hydrolytic peptides have a MW below 2000 Da, preliminary investigations of antimicrobial properties revealed three antibacterial fractions that demonstrate functional activities. The abundance of small peptides as well as the biological activities detected could imply very interesting applications for shrimp hydrolysate in the field of aquaculture feeding.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The hydrolysis of marine by-products derived from fileting industries is a valuable process to increase the nutritional and bioactive performances of these protein sources. Indeed, in a context of low availability and price volatility of fish meal combined to an increasing use of plant-derived raw materials, the aquaculture industry needs to find efficient and sustainable raw material alternatives while keeping high feed and animal performances. The development of marine hydrolysates as a functional raw material has been extensively studied these last years as a way of enhancing the growth and resistance of aquaculture species. Some studies show that fish meal substitution by marine hydrolysate enhanced growth performances and feed utilization at a low dietary inclusion level in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Refstie et al., 2004). Tang et al. (2008) demonstrated that dietary hydrolysates could enhance

the response of the non-specific immune system in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.).

The performances of hydrolysates can be explained in part by a good balance in their amino acid composition provided by raw material and therefore adapted to the diet of carnivorous fish (Espe et al., 1999). They can also be explained by the molecular mass distribution of the peptides issued from hydrolysates that are known to be rich in low-molecular-weight peptides (Liaset et al., 2000), contrary to the other raw materials that formulate the feed.

In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aksnes et al. (2006) showed that removing the low-molecular-weight compounds from a hydrolysate induced slower growth and lower feed efficiency, highlighting the importance of these compounds in nutrition. On the same species, (Terjesen et al., 2006) demonstrated that dietary supplementation with synthetic di/tri-peptides could improve fish growth. Thanks to the beneficial effect of the hydrolysis process on protein digestibility, the assimilation of a protein hydrolysate via intestinal amino acid transporters and peptide transporters might be more efficient and quicker than for non-processed proteins, as already observed in humans (Koopman et al., 2009).

Hydrolysates can also exert various biological activities such as antimicrobial activity (Liu et al., 2008), antioxidant activity

* Corresponding author at: Université de Caen Basse-Normandie, UMR BOREA, IBFA, F-14032 Caen, France. Tel.: +33 023156559; fax: +33 0231565346.

E-mail address: joel.henry@unicaen.fr (J. Henry).

(Benjakul et al., 2009; Rajapakse et al., 2005), antihypertensive activity (Je et al., 2005) when the size of the bioactive peptides cleaved from proteins ranges between 2 and 20 amino acids.

Thus, biological activities as well as nutritional properties of hydrolysates are closely related to the molecular mass of the hydrolytic peptides and their amino acid composition. The development of tools for determining the peptide mass profile of hydrolysates is therefore essential to allow for the characterization of hydrolysates and to have a better understanding and forecasting of their nutritional and bioactive properties.

Enzymatic hydrolysis of proteins generates complex mixtures of multiple truncated forms of each peptide that are very difficult to separate by classical analytical tools. The most common approach to determine peptide mass distribution is high performance size exclusion chromatography (HPSEC). But this tool suffers from several disadvantages, i.e. (a) poor resolution of smaller peptides, (b) non-optimal elution behavior of selected peptides, (c) variations in the UV response of amino acids and (d) interference by non-protein components (Siemensma et al., 1993). Although it is now possible to determine peptide mass distribution in hydrolysates and provide semi-quantitative data on peptide mass distribution by HPSEC thanks to recent technological advances (Johns et al., 2011), this method is not suitable to get qualitative data on peptides from protein hydrolysates.

To acquire qualitative information on peptides such as amino acid composition and primary sequence, mass spectrometry associated to HPLC or preparative electrophoresis ensure better characterization of very complex samples.

In order to characterize white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cephalothorax hydrolysates as best as possible, peptide molecular mass distribution was assessed by HPSEC and primary peptide sequences were determined by mass spectrometry. To optimize peptide identification, two mass spectrometers were used successively for peptidomic analysis: nLC-MALDI-TOF/TOF and nLC-ESI-MS/MS. The nLC-MALDI-TOF/TOF was coupled to OFFGEL electrophoresis to optimize number and quality of MS/MS. To maximize the peptidomic approach by increasing the numbers of identified peptides, a new *L. vannamei* databank was defined from the organs used for hydrolysate production, to complement the NCBI ESTs databank already available. For the small peptides, *de novo* sequencing was also carried out. Finally, hydrolysate functionality was investigated using an *in vitro* antibacterial test performed on Gram– and Gram+ bacteria. Then the application of such shrimp hydrolysates to aquafeeds and the expected performances are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Hydrolysis

Raw material (100% heads of *Penaeus vannamei* shrimp from Peru) was provided by Crustamar (Nantes). Frozen shrimp heads were ground to 6 mm and loaded into a 10-l thermostated batch reactor equipped with a central stirrer (40 rpm). Shrimp heads were heated to 50 °C, then submitted to enzymatic hydrolysis using Protamex enzyme (Novozymes, Denmark), a *Bacillus* protease complex, at 0.15% of the raw material. No pH regulation was applied during the 30-min long hydrolysis process. Then the enzyme was inactivated by increasing the temperature to 80 °C for 15 min. Hydrolysates were sieved to 500 µm to remove the waste and then spray-dried and stored at 0–4 °C.

2.2. Sample preparation

Prior to mass spectrometry analysis and antibacterial assays, peptide extraction was performed. One gram of hydrolysate was

homogenized in 10 ml of cold 0.1% TFA (HPLC-grade, SIGMA) overnight and centrifuged 15 min at 21,000 × g at 4 °C. The supernatant was filtered and concentrated on a Sep-Pak C18ec classic cartridge (Waters), evaporated on a speed vac concentrator and kept at 4 °C until use.

2.3. Chemical composition and molecular weight profile

2.3.1. Determination of the degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis is defined as the ratio of the number of cleaved peptide bonds over the total number of peptide bonds. The degree of hydrolysis was assayed using the OPA (o-phthalodialdehyde) method detailed by Church et al. (1983) and based on the measurement of the amino groups generated during the hydrolysis process.

$$DH = \frac{h}{htot} \times 100$$

where $htot = 8$, $h = (\text{serine}-\text{NH}_2 - b)/a$ with $a = 1$ and $b = 0.4$.

$\text{Serine}-\text{NH}_2 = ((\text{ODsample} - \text{ODblank})/(\text{ODstandard} - \text{ODblank})) \times 0.9516 \times ((V \times 100)/(X \times P))$, with $P = \text{protein \% in sample}$; $X = (\text{g})$ sample and $V = (L)$ sample.

2.3.2. Determination of the dietary amino acid composition of the hydrolysates

The dietary amino acid composition of the hydrolysates was determined by the In Vivo Laboratory (Saint Nolff, France) using high-performance liquid chromatography after acid hydrolysis (6 N HCl, 110 °C, 24 h) and performic acid oxidation, to obtain all amino acids including methionine and cysteine. The resulting hydrolysates were then adjusted to pH 2.20. Amino acids were separated by ion exchange chromatography and determined using photometric detection at 570 nm (440 nm for proline) after reaction with ninhydrin.

For tryptophan determination, each sample was hydrolysed under alkaline conditions with barium hydroxide and heated in an autoclave at 120 °C for 16 h. Then the hydrolysates were acidified to pH 3.0 using chlorhydric acid. Hydrolysate tryptophan was separated by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) and determined by fluorometric detection.

2.3.3. HPSEC

HPSEC characterization was performed on a VARIAN system equipped with a UV (214-nm wavelength) detector. Elution was carried out on a ReproSil 50 SEC column (300 × 8 mm, 5 µm; AIT France) with MeOH/water/trifluoroacetic acid (10/89.9/0.1, v/v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min. The peptide extract was dissolved in the HPSEC eluent and 10 µl were injected. The HPSEC system was calibrated with five molecular mass markers: ribonuclease A (13,700 Da), insulin (5778 Da), vasopressin (1084 Da), FLRFamide (580 Da), and hydroxytryptophan (220 Da).

2.4. Illumina EST sequencing

2.4.1. Generation of cDNA libraries

Total RNA was extracted in TriReagent from stomach, heart, hepato-pancreas, eyes and whole head of five shrimps (*L. vannamei*) to generate paired-end libraries for 2 × 150 bp paired ends. The total RNA concentration of each sample was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher) and RNA quality was checked using a bioanalyser (Agilent Technologies). cDNA libraries were prepared using the Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina, Part# 15008136 Rev. A) according to the manufacturer's protocol, from 4 µg of total RNA of each sample. Briefly, poly-(A)-mRNAs were purified with magnetic oligo dT beads (Agencourt) and reverse transcribed into first strand cDNAs.

Then, the second cDNA strands were synthesized. dsDNAs were cleaved into 300 bp fragments using Covaris S220 (Applied Biosystems) (Duty cycle: 5%, Intensity: 3, bursts per second: 200, duration: 80 s). Then, each sample was tagged and adapters were ligated to the dsDNA ends before a PCR step was performed to amplify the amounts of DNA in the library. Sample quality was assessed by Tape station 2200 (Agilent Technologies) and DNA concentrations were measured with a KAPA qPCR Library Quantification kit (Kapabiosystems). Finally, cDNA libraries were loaded onto a flow cell (Illumina TruSeq PE Cluster Kit v2 – cBot – GA) channel at a total concentration of 2 pM per lane.

2.4.2. Illumina sequencing and transcriptome assembly

The cDNA library was sequenced on an Illumina Genome Analyzer GAIIX using 150 bp paired-end reads. Raw reads were filtered from low-quality sequences, low-complexity sequences and trimmed using *printseq-lite* (version 0.20.1 – Schmieder & Edwards, 2011), cleaned from rRNA contaminant using *ribopicker* – Schmieder et al., 2012 and cleaned from adapter ends using *cutadapt* (version 1.01 – Martin, 2011). Finally the cleaning process was checked using *fastQC* (version 0.10.01 <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>).

The contigs resulting from all the cleaned reads were assembled using Trinity (release 2012-10-05 – Grabherr et al., 2011), the genome-independent transcriptome assembler including normalization by a k-mer coverage step and a filtering of low coverage contigs (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) < 1) and rare isoforms (<1%). Finally, reads corresponding to the different organs were remapped independently on the full transcriptome using Bowtie (version 0.12.8 – Langmead et al., 2009) and relative abundances were estimated using RSEM (version 1.2.0 – Li & Dewey, 2011) to get the FPKM values and thus identify organ-specific transcripts (the two software programs were launched through the Trinity package Wrapper). Low coverage contigs (FPKM < 1) and rare isoforms (<1%) were excluded from the analysis. Annotation was performed using a *blastx* (version 2.2.27) similarity search against the NCBI NR database (Nov. 2012 version).

2.5. Peptide identification (Fig. 1)

2.5.1. OFFGEL coupled to nLC-MALDI-TOF/TOF spectrometry

2.5.1.1. OFFGEL. The peptide extract was fractionated in-solution with an Agilent 3100 OFFGEL fractionator (Agilent Technologies). Peptide electrofocusing was performed with 13-cm IPG strips, pH 3–10, and a 24-well frame set (Agilent Technologies). The IPG strips and paper wicks were rehydrated with 4.8% glycerol (v/v), 2% IPG buffer (1:50) at 40 µl per well for 15 min. While the strips were rehydrating, samples were solubilized in 1.8 ml of the same rehydration buffer. After complete rehydration, 150 µl of each sample was added to each well, the wells were sealed, and mineral oil was added to each end of the strip. The strips were focused until 20 kV h was reached with a max voltage of 8000 V, (50 µA and 200 mW) and a hold setting of 500 V. After 24 h of run time the paper wicks were changed for new wicks wetted with ultrapure water. The runs took approximately 50–55 h.

2.5.1.2. Mass spectrometry analysis. 10 µl of each of the 24 fractions were recovered, desalting and concentrated onto a µC18 Omix (Varian) before nLC-MS/MS analysis.

The chromatography step was performed on an nLC system (Prominence, Shimadzu). Peptides were concentrated on a Zorbax 5 × 0.3 mm C18 precolumn (Agilent) and separated on a Zorbax 150 × 75 µm C18 column (Agilent Technologies). Mobile phases consisted of 0.1% TFA, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1%TFA, 20% water in 79.9% ACN (v/v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nl/min,

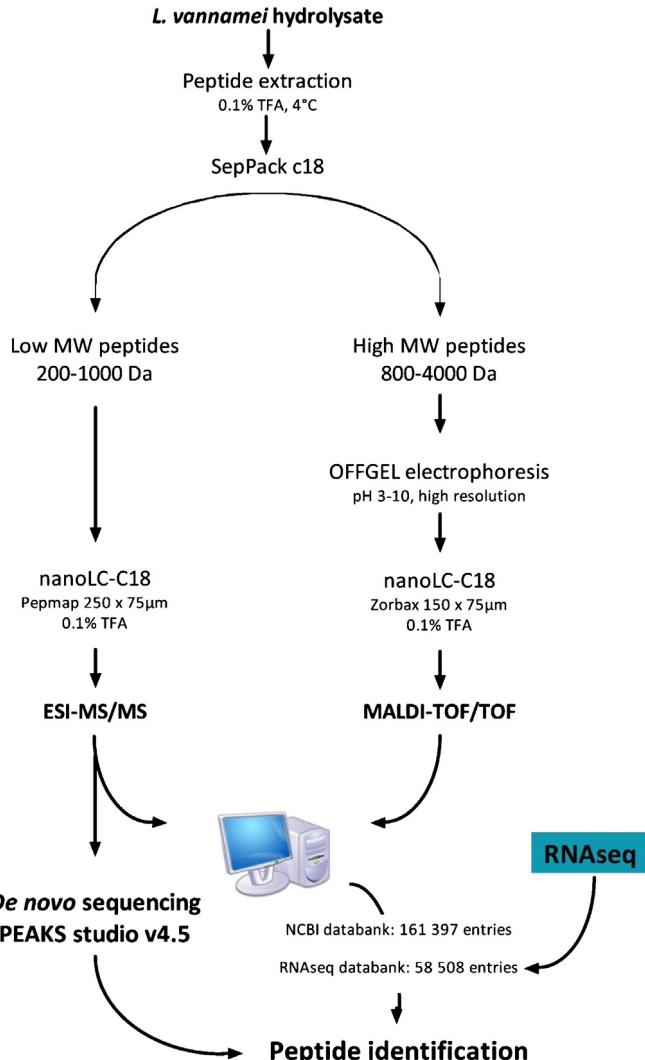


Fig. 1. Methodology for identification of hydrolytic peptides.

and the gradient profile was as follows: constant 7% B for 5 min, from 7 to 70% B in 183 min, from 70 to 100% B in 5 min, and back to 7% B. The 300 nl/min volume of the peptide solution was mixed with 1.2 µl/min volumes of solutions of 5 mg/ml CHCA matrix prepared in a diluent solution of 50% ACN with 0.1% TFA. Thirty-second fractions were spotted by an AccuSpot spotter (Shimadzu) on stainless steel Opti-TOF™ 384 targets.

MS experiments were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF ion optics and OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of des-Arg-Bradykinin, Angiotensin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18-39), ACTH (7-38) and mass precision was better than 50 ppm for reflectron mode. A laser intensity of 3200 was typically used for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1000 single spectra (5 × 200) in the 800–4000 Da mass range. MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 3900. For tandem MS experiments, the applied acceleration voltage was 1 kV and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings.

2.5.2. nLC-ESI-MS

2.5.2.1. Sample preparation. Peptide extracts were suspended in 0.1% TFA and loaded onto Sep-Pak C18ec classic cartridges (Waters).

Elution was performed with ACN/water/TFA (20/79.9/0.1, v/v/v) and each sample was evaporated on a speed vac concentrator and concentrated onto a μC18 Omix (Varian).

2.5.2.2. nLC-ESI-MS. The chromatography step was performed on an nLC system (Ultimate 3000, Thermo Scientific). Peptides were separated on a Pepmap C18 column (250 × 75 μm, 3 μm – Thermo Scientific). Mobile phases consisted of 0.1% acetic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% acetic acid, 20% water in 79.9% ACN (v/v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nl/min, and the linear gradient was 0.5% of ACN per minute from 0% to 30%. ESI-MS analysis was performed on an LTQ-Orbitrap Discovery (ThermoFischer) in the 200–1000 m/z range.

2.5.3. Mass spectrum analysis using Mascot

MS/MS data were used to determine the primary sequences of the peptides. Database searching was performed using the Mascot 2.2.04 program (Matrix Science) using the data obtained by MALDI-TOF/TOF and ESI-MS. Two EST databases were used: the first one was an updated compilation download from the NCBI database with *L. vannamei* as the selected species (161,397 entries) and the second one was a homemade *L. vannamei* EST database assembled from our RNAseq approach (Illumina sequencing) as described above (58,508 entries). The variable post-translational modifications selected were as follows: C-terminal amidation, N and E-terminal pyroglutamate, K-acetylation, methionine oxidation, and dioxidation. Mass accuracy was set to 100 ppm and 0.6 Da for the MS and MS/MS modes, respectively. Then, the protein precursors of each identified peptide were blasted with Blastx (NCBI).

2.5.4. De novo sequencing

De novo peptide sequencing was performed from ESI-MS data using PEAKS Studio v4.5 software (Bioinformatics Solutions, Toronto, Canada) to increase the number of identified peptides in the 200–1000 Da mass range. The results were first filtered by >80% high confidence scores and then validated (or not) using Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct>) to check MS/MS data.

2.6. Antibacterial assay

The antibacterial activity of the peptide extracts, HPSEC fractions and rpHPLC fractions was assayed against three bacterial strains: *Edwardsiella tarda*, *Yersinia ruckeri* and *Bacillus megaterium*. Peptide extracts obtained from 100 mg of hydrolysate were suspended in 100 μl of sterile water. This suspension was considered as the 100× concentration. Then it was diluted from 50× to 1×. HPSEC fractions were pooled to have hydrolysate fractions with molecular weights below 1000 Da and above 1000 Da. The first rpHPLC purification step was conducted on a C18 column (NUCLEODUR 250 mm × 10 mm) equilibrated with 0.1% (v/v) TFA aqueous solution at a flow rate of 1 ml/min. Elution was performed using a linear gradient (2%/min) of acetonitrile/water/TFA (79.9/20/0.1, v/v/v) with absorbance set at 214 nm. HPLC fractions (1 ml) were collected, evaporated and stored at 4 °C until antibacterial assays. For antibacterial assay, equivalent of one run was tested per well (i.e. 3 runs for one test in triplicate).

The antibacterial activity of each sample was determined in triplicate by liquid growth inhibition assays (Hetru and Bulet, 1997). Briefly, 10 μl of each sample were incubated in microtiter plates with 100 μl of a suspension of bacteria at a starting optical density of $D_{595} = 0.001$ in the adapted medium (Table 1). A control of bacterial growth was performed with water and a control of bacterial growth inhibition was performed with oxytetracycline (1 μg/μl).

Table 1
Bacterial strains and media used for antibacterial assays.

Bacteria	Source	Test medium	Incubation T°
<i>Edwardsiella tarda</i>	CIP 68.6	Columbia	30 °C
<i>Yersinia ruckeri</i>	CIP 82.80	PBB	30 °C
<i>Bacillus megaterium</i>	CIP 51.17	PB	37 °C

LB (Luria-Bertani): peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7.5; BHI (brain heart infusion): 37 g/l, pH 7.4; PB (Poor Broth): peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.4; PBB: Poor broth + beef extract Columbia (DIFCO); M72: tryptocasein soya agar (BIO-RAD); CIP: collection of Pasteur Institute.

Bacterial growth was assayed by measuring optical density at A_{595} after 20 h of incubation at the adapted temperature (Table 1).

3. Results

3.1. Chemical composition and molecular weight profile

3.1.1. Amino acid composition and determination of the degree of hydrolysis

The proximate composition of the white shrimp hydrolysate is shown in Table 2. The hydrolysate had a crude protein content of 64.5% and a crude fat content of 11.2%. The degree of hydrolysis of the hydrolysate was 59.6%. The levels of free and total amino acids were respectively 31.33% and 58.08% of the hydrolysate. The free and total amino acids profiles are summarized in Table 2.

3.1.2. HPSEC

The molecular weight profile of the hydrolysate, completed by the calibration curve, revealed that our shrimp hydrolysate was mainly composed of low-molecular-weight Fig. 1 compounds (Fig. 2). The analysis indicates that 69.2% of the 214-nm-absorbing components have an apparent molecular mass below 1000 Da and 88.3% below 2000 Da.

3.2. RNAseq

In order to increase the size of the available transcriptome of organs used for hydrolysis, *de novo* RNAseq was performed using the Illumina paired-end technology. A total of 167,752,634 raw sequences with read lengths of 150 bp were generated. After data

Table 2
Proximate composition, total amino acids and free amino acid profile of the white shrimp hydrolysate.

Amino acid	Total amino acids	Free amino acids
Asp	5.82%	1.10%
Thr	2.62%	1.15%
Ser	2.47%	1.00%
Glu	8.71%	1.79%
Pro	3.31%	1.45%
Gly	4.10%	1.55%
Ala	4.27%	2.59%
Cys	0.60%	0.00%
Val	3.34%	1.92%
Met	1.32%	0.93%
Iso	2.77%	3.22%
Leu	4.35%	2.86%
Tyr	1.00%	1.90%
Phe	2.73%	2.14%
His	1.50%	0.75%
Lys	4.40%	3.13%
Arg	4.57%	3.65%
Trp	0.78%	0.20%
Crude protein	64.5%	
Soluble protein	88.5%	
Crude fat	11.2%	
Ash	11.1%	

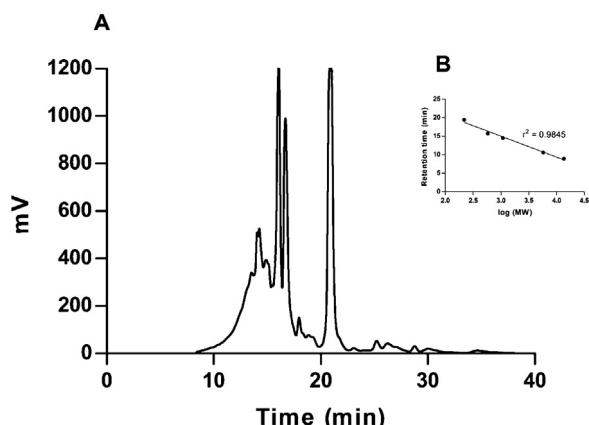


Fig. 2. Size exclusion chromatogram (A) and calibration curve (B) of a shrimp hydrolysate using a ReproSil column at a flow rate of 0.7 ml/min of MeOH/TFA 0.1% in water (10/90, v/v).

cleaning to remove adapters and poor quality parts, 66,939,327, high-quality reads were obtained with an average of 71.4% Q30 bases (a quality score of 30 represents an error rate of 1 in 1000, with a corresponding call accuracy of 99.9%).

Based on these high-quality reads, contigs were assembled into 58,508 unique sequences from 201 to 19,669 bp with an average length of 878 bp. Cleaned reads resulting from each organ library were then remapped separately on the full transcriptome, leading to the identification of organ-specific transcripts presented in Table 3.

Sequences are available from Genbank under Bioproject SRP043261 and BioSample accession No: SRS638274, SRX602538 (eyes), SRX602539 (stomach), SRX602541 (heart), SRX602542 (hepatopancreas), SRX602543 (whole head).

3.3. Peptide identification

3.3.1. OFFGEL-nLC-Maldi-TOF/TOF

The peptide extract of the hydrolysate underwent a purification step on OFFGEL electrophoresis. Each fraction thus obtained was analyzed by nLC-Maldi-TOF/TOF for the 800–4000 Da mass range. A first identification step was carried out on NCBI ESTs and led to the identification of 331 peptides. This result was supplemented by the identification of 293 additional peptides from our ESTs. Taking into account the 150 redundant peptides in both analyses, a total of 481 peptides was finally identified (Fig. 3).

The identified peptides had molecular masses between 800 and 2985 Da, but the major part (88.6%) had molecular masses below 2000 Da.

3.3.2. nLC-ESI-MS

nLC-ESI-MS analysis of peptide extracts led to the identification of 403 peptides ranging between 500 and 2500 Da. Two hundred and sixty peptides were identified from the NCBI ESTs and 216 from our ESTs, and 73 were identified from the two analyses (Fig. 3). Seventy-six redundant peptides with nLC-MALDI-TOF/TOF analysis were detected and removed from the total.

3.3.3. Protein precursors

Protein precursors of Mascot-identified peptides were submitted to Blastx. The results presented in Fig. 4A show that the main precursors are hemocyanins and cuticular proteins, which generated respectively 22% and 18% of the identified hydrolytic peptides. Muscular proteins and digestive enzymes also generated 9% of the identified peptides each versus only 3% for ribosomal proteins. Fifteen percent of the identified peptides were issued from various

enzymes or proteins and the rest (24%) came from unidentified proteins. Fig. 4B presents an example of hydrolytic peptides identified from one of the detected hemocyanins. The underlined peptide is present in 16 different more or less truncated forms, illustrating the complexity of the hydrolysate.

3.3.4. De novo sequencing

The *de novo* sequencing performed with PEAKS Studio from ESI-MS/MS data in the 200–1000 Da mass range led to the identification of 202 additional peptides ranging between 244.2 and 991.5 Da. These results are included in the molecular weight distribution of identified peptides presented in Fig. 3.

3.4. Antibacterial activity

The antibacterial activity of our peptide extracts was assayed against *Yersinia ruckeri*, *Bacillus megaterium* and *Edwardsiella tarda* for relative concentrations ranging between 1× and 100×. Antibacterial activity was detected for the highest concentrations (20× to 100×) against *Yersinia ruckeri* and *Edwardsiella tarda*, and 50× to 100× against *Bacillus megaterium*. Moreover, peptide extract fractions of molecular weights below and above 1000 Da also exhibited antibacterial activity against the three bacterial strains. Finally, after a purification step by rpHPLC (Fig. 5A), some fractions exhibited antibacterial activity against *Yersinia ruckeri* (14th, 17th and 22nd minute fractions) and *Bacillus megaterium* (fractions 14 and 30) while no activity was found against *Edwardsiella tarda* (Fig. 5B). The fraction eluted at the 14th minute (14.4% of ACN) displayed activity against a Gram– bacterium and a Gram+ bacterium and seemed to be unspecific, contrary to the fraction eluted at the 17th (19.2% of ACN) and 22nd (35.2% of ACN) minutes that displayed activity against a Gram– bacterium and a Gram+ bacterium, respectively.

4. Discussion

Today, the extensive use of protein hydrolysates in various fields such as aquaculture feed, human nutrition and cosmetics, requires the development of efficient methods for characterizing complex protein hydrolysates. Indeed, hydrolysis processes lead to the release of numerous small molecules cleaved from biopolymers, such as peptides, amino acids, fatty acids, etc. that impede analytical studies.

In this study, in order to deeply investigate the peptide composition of a shrimp hydrolysate, peptidomics and transcriptomics tools were used to set up a strategy for hydrolysate characterization and large-scale peptide identification.

Shrimp hydrolysate samples were fractionated by reverse phase nLC before being analyzed by combining two complementary mass spectrometers. An additional purification step by OFFGEL electrophoresis was performed before nLC-MALDI-TOF/TOF analysis that allowed for the generation of high-quality MS/MS spectra and thus increased numbers of peptide identifications, as described previously by Hörrt et al. (2006).

Thanks to the association of MALDI-TOF/TOF and ESI-MS/MS, it was possible to cover a large mass range from 200 to 4000 Da that corresponded to the mass range of the expected products. Indeed, while MALDI-TOF/TOF is a very powerful tool for the characterization of peptides of MWs above 800 Da, ESI-MS/MS is more dedicated to the analysis of lower molecular weights (Duncan et al., 2008).

This strategy led to the characterization of 808 peptides. Four hundred and eighty-one peptides were identified from MALDI-TOF/TOF against 403 from nLC-ESI-MS/MS, and 69 were detected by the two analytical methods. The number of redundant peptides represents only 8% of the identified peptides. This percentage is quite

Table 3
Overview of sequencing, assembly and annotation.

Organs	No. of reads	No. of cleaned reads	No. of sequences	No. of annotated sequences (*)	Average sequence length (bp)
Head	32,397,358	14,565,466	37,466	13,649	829
Eyes	33,342,860	14,598,741	44,818	15,256	757
Hepato-pancreas	86,697,658	33,055,757	45,275	14,321	742
Stomach	2,751,406	982,712	30,688	11,908	936
Heart	2,121,044	801,449	27,096	10,670	1003
Global	167,752,634	66,939,327	58,508	18,413	878

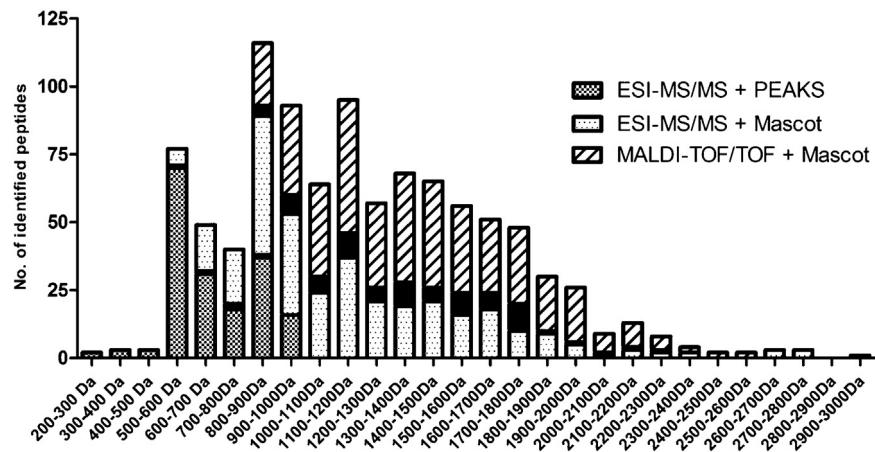


Fig. 3. Weight distribution of the peptides identified by MALDI-TOF/TOF and ESI-MS/MS. For each mass spectrometry technique, the number of identified peptides includes NCBI database and homemade database searches without any duplication. Areas in black indicate the number of peptides in common between ESI-MS/MS + PEAK analysis and ESI-MS/MS + Mascot analysis on the one hand and between ESI-MS/MS + Mascot and MALDI-TOF/TOF on the other.

low and confirms the interest of using two different mass spectrometry methods for analyzing complex by-product hydrolysates.

The originality of this study also lies in the fact that Illumina sequencing focused on the by-products used for hydrolysis was carried out to enlarge the already available EST database. The new *L. vannamei* EST databank targeted to interest organs increased the number of identified peptides by 46%, with 466 additional peptides that completed the 537 peptides first identified from the NCBI

database. Fig. 3 highlights the importance of EST databank size and quality to maximize peptide identifications.

Identifying small peptides is always a challenge because mass spectrometry tools are not always suitable for the study of the low mass range and fragmentation of low-molecular-weight peptides generates low numbers of fragment peaks that result in ambiguous identified sequences (Schmelzer et al., 2004). In this study, *de novo* sequencing focused on the 200–1000 Da mass range,

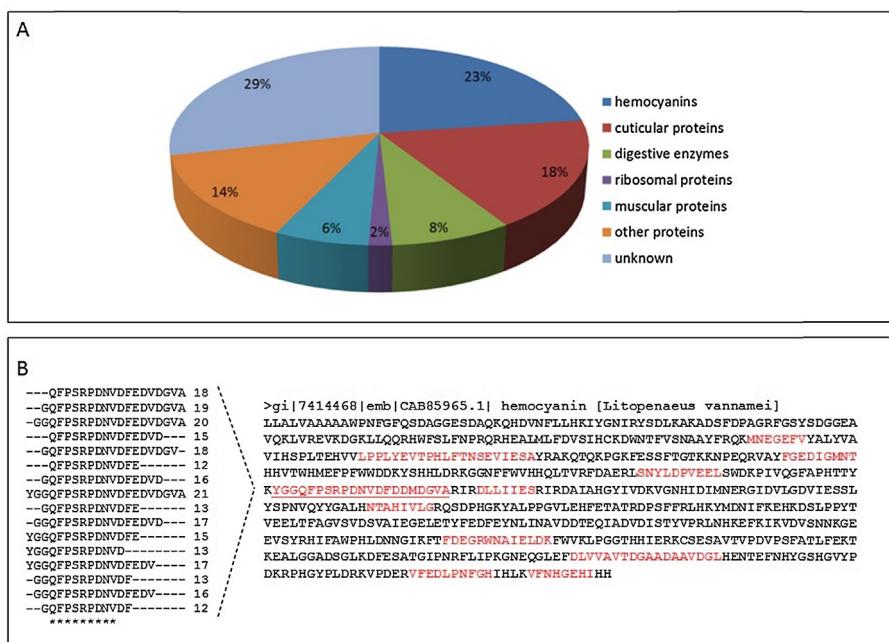


Fig. 4. Precursors of the identified peptides (A) and example of truncated peptides identified from hemocyanin (B). The peptides in red were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF and/or ESI-MS/MS), the underlined peptide was present under different forms.

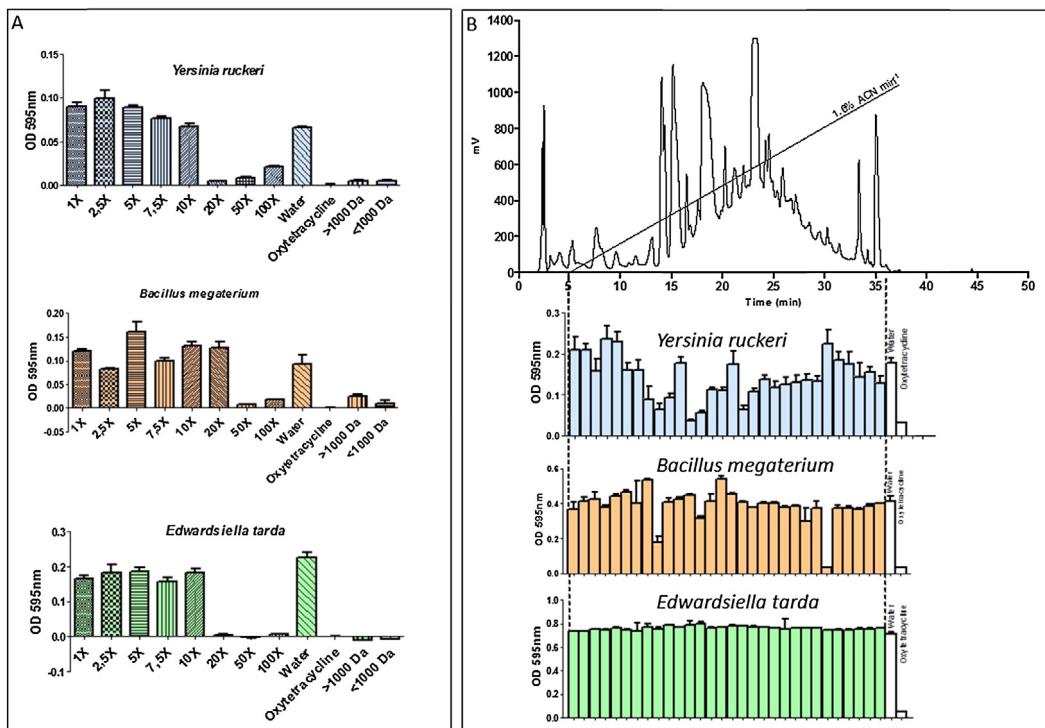


Fig. 5. (A) Reverse phase chromatogram on a C18 column of the hydrolysate and antimicrobial activity against *Yersinia ruckeri*, *Bacillus megaterium* and *Edwardsiella tarda* (B).

performed with PEAKS software, was selected to increase the number of small peptides detected. This software uses an algorithm that proposes peptide sequences directly from the MS/MS spectrum and its performance has already been demonstrated (Ma et al., 2003). PEAKS propositions were validated using Protein Prospector. Thus, 202 additional peptide sequences were identified within the 200–1000 Da mass range, but for di/tri-peptides, it was only possible to determine amino acid composition. These supplementary data led to the identification of 1010 peptides with a molecular weight ranging between 200 and 3000 Da.

Linking the data obtained by HPSEC and mass spectrometry is difficult because HPSEC provides quantitative data while mass spectrometry in this study provides qualitative data. Indeed, the HPSEC chromatogram suggests that a large proportion (69%) of the hydrolysate peptides have a molecular weight below 1000 Da while a relatively low number (40.2%) of peptides were identified within the same mass range. Incomplete identification of small peptides resulting from technical limitations in mass spectrometry is probable. Thus, the diversity of small peptides in the shrimp hydrolysate may have been underestimated.

The results obtained from HPSEC and mass spectrometry both show a significant abundance of low-molecular-weight peptides, suggesting attractive applications as ingredient in fish feed. This is also supported by the analysis of hydrolysate composition, which indicates a high protein content (64.5%) and the presence of all essential and non-essential amino acids that meet fish's amino acid requirements (NRC, 2011). Protein content and amino acid composition are similar to the composition of fish hydrolysates described in various studies (for a review, see (Chalamaiyah et al., 2012)). The high level of low-molecular-weight compounds found in shrimp hydrolysate could be very helpful to solve the many challenges the aquaculture industry has to face. Aquaculture feeds have to be highly palatable to guarantee high feed intake and fish performances but for many years, the growing replacement of fish meal in feed formula has gone along with a decrease in

feed palatability. Given that the performance of free amino acids as a feeding stimulant for carnivorous species is proven and well referenced in the literature (Kasumyan and Döving, 2003), the high free amino acid level (53.4% of proteins) of shrimp hydrolysate ranks it as a good candidate for enhancing feed palatability. Moreover, its high content in di/tri-peptides could foresee more valuable nutritional applications. Inclusion in larval feed formulation could support high feed and fish performances at a development stage characterized by a non-mature digestive system (Tang et al., 2008). Dietary hydrolysate in low fish meal diets could bring low-molecular-weight compounds that are not usually found in fish meal substitutes such as plant meals (Kousoulaki et al., 2009).

In addition to good nutritional performances, by-product hydrolysates are described as functional components that exhibit many biological activities (Harnedy and Fitzgerald, 2012) and could induce positive metabolic functions in animals and promote a better resistance to biotic and abiotic factors.

One of the main challenges in aquaculture is to significantly improve fish and shrimp resistance to pathogens while limiting the use of medicinal treatments that could affect food safety and environment. During the last few years, the dietary inclusion of probiotic, prebiotic and immune modulators in aquafeeds has increased a lot in order to improve fish performances. In our study, peptide extracts from shrimp hydrolysate exhibited antibacterial activity against *Yersinia ruckeri*, *Bacillus megaterium* and *Edwardsiella tarda*. Activity was evidenced in the molecular weight fractions below and above 1000 Da and was conserved against *Yersinia ruckeri* and *Bacillus megaterium* after an rpHPLC purification step. Although the peptide sequence responsible for such activity was not elucidated, these findings highlight the presence of antibacterial peptides in our shrimp hydrolysate and suggest that antimicrobial activity probably results from synergies between several peptides that can explain the loss of antibacterial activity against *Edwardsiella tarda* after purification.

Moreover, the peptidomic analysis of hydrolysed cephalothorax of *L. vannamei* shows that hydrolytic peptides are cleaved from few main protein precursors. One of the proteins that generated the largest number of identified peptides is hemocyanin. In vertebrates, hemoglobin hydrolysis is known to generate antimicrobial peptides (Nedjar-Arroume et al., 2006). In crustaceans, peptides cleaved from hemocyanins with antimicrobial activity were found in the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* (Qiu et al., 2013) and with anti-fungal activity in *L. vannamei* (Destoumieux-Garzón et al., 2001). *In silico* analysis of identified peptides, especially from hemocyanins, could lead to the discovery of antibacterial peptides.

Dietary inclusion of hydrolysate could be used as a strategy to reduce antibiotics treatments and to improve vaccination efficiency in aquaculture. To confirm this interest, *in vivo* abiotic or biotic challenge trials should be performed in some aquaculture species. Zootechnical performances and biomarkers of protein metabolism, immunity and stress could be considered to validate the nutritional and bioactive performances of dietary shrimp hydrolysate *in vivo*.

5. Conclusion

This study brings a solid methodology to determine the hydrolytic peptide composition of protein hydrolysates and could be interesting to establish a standardized method for assessing the performances of such hydrolysates. The strategy is based on a combination of transcriptomics and peptidomics approaches. The peptidomics approach, based on the use of appropriate separation tools and complementary mass spectrometry methods, was specially developed to improve peptide identification in complex matrices. The transcriptomic approach based on a new RNAseq was a very powerful tool to complete existing EST databases and improves peptide identification.

This study highlights the strong potential of white shrimp hydrolysate for nutritional and health applications in aquaculture feeds due to its high content in low-molecular-weight peptides, a well-balanced amino acid profile and antibacterial activity identified against different bacterial strains.

References

- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B.T., 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, 305–317.
- Benjakul, S., Binsan, W., Visessanguan, W., Osako, K., Tanaka, M., 2009. Effects of flavourzyme on yield and some biological activities of Mungoong, an extract paste from the cephalothorax of white shrimp. *J. Food Sci.* 74, S73–S80.
- Chalamaiha, 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, 3020–3038.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L., 1983. Spectrophotometric assay using *o*-Phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66 (6), 1219–1227.
- Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachère, E., 2001. Crustacean Immunity, Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276, 47070–47077.
- Duncan, M.W., Roder, H., Hunsucker, S.W., 2008. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 7, 355–370.
- Espe, M., Sveier, H., Høgøy, 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://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00502-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00502-X).
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652.
- Hardy, R.W., Gatlin-III, D.M., Bureau, D.P., D'Abromo, L.R., Davis, D.A., Halver, J.E., Krogdahl, Å., Médale, F., Shiao, S.-Y., Tocher, D.R., et al., 2011. *National Research Council: Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington, D.C, pp. 376.
- Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review. *J. Funct. Foods* 4, 6–24.
- Hetru, C., Bulet, P., 1997. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods Mol. Biol.* 78, 35–49.
- Hörth, P., Müller, C.A., Preckel, T., Wenz, C., 2006. Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1968–1974.
- Je, J.-Y., Park, P.-J., Kim, S.-K., 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 38, 45–50.
- Johns, P.W., Jacobs, W.A., Phillips, R.R., McKenna, R.J., O'Kane, K.A., McEwen, J.W., 2011. Characterisation of peptide molecular mass distribution in commercial hydrolysates and hydrolysate-based nutritional products. *Food Chem.* 125, 1041–1050.
- Kasumyan, A.O., Döving, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. *Fish Fish.* 4, 289–347.
- Koopman, R., Crombach, N., Gijssen, A.P., Walrand, S., Fauquant, J., Kies, A.K., van Loon, L.J., 2009. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated *in vivo* digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 90 (1), 106–115.
- Kousoulaki, K., Albrektsen, S., Langmyhr, E., Olsen, H.J., Campbell, P., Aksnes, A., 2009. The water soluble fraction in fish meal (stickwater) stimulates growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given high plant protein diets. *Aquaculture* 289 (1–2), 74–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.034>.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10, R25.
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323.
- Liaset, B., Lied, E., Espe, M., 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry: chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.* 80, 581–589.
- Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H., Zhao, Y., 2008. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control* 19 (3), 231–235, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.004>.
- Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., 2003. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2337–2342.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBNet J.* 17, 10.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Guillochon, D., 2006. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides* 27 (9), 2082–2089, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.033>.
- Qiu, C., Sun, J., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Sun, S., Wang, L., 2013. Molecular Cloning of Hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and Antimicrobial Analysis of Two C-terminal Fragments. *Marine biotechnology*, New York, NY, <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-013-9519-y>.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.-K., Je, J.-Y., Kim, S.-K., 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res. Int.* 38, 175–182.
- Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H., 2004. Feed intake, growth, and protein utilization 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://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015>.
- Schmelzer, C.E., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R.H., Raith, K., 2004. Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *J. Chromatogr. A* 1055, 87–92.
- Schmidler, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864.
- Schmidler, R., Lim, Y.W., Edwards, R., 2012. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics* 28, 433–435.
- Siemensma, A.D., Weijer, W.J., Bak, H.J., 1993. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 16–21.
- Tang, H., Wu, T., Zhao, Z., Pan, X., 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9 (9), 684–690.
- Terjesen, B.F., Lee, K.-J., Zhang, Y., Failla, M., Dabrowski, K., 2006. Optimization of dipeptide–protein mixtures in experimental diet formulations for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. *Aquaculture* 254 (1–4), 517–525, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.013>.

4 Chapitre 2

Caractérisation moléculaire de l'hydrolysat de tilapia par une approche peptidomique associée à une approche transcriptomique



La caractérisation de l'hydrolysat de tilapia a été menée de manière identique à celle de l'hydrolysat de crevette. Le profil de répartition massique a été réalisé en gel-filtration et la composition en acides aminés a été déterminée par chromatographie par échange d'ions. L'identification des peptides hydrolytiques a été faite à partir des données transcriptomiques disponibles : les banques de séquences nucléiques et protéomiques de NCBI ainsi que sur la nouvelle banque réalisée en RNAseq. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une "short communication" soumise dans Process Biochemistry.

Molecular and functional characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate

Marie Robert^{a,b}, Celine Zatylny-Gaudin^{a,b}, Vincent Fournier^d, Erwan Corre^e, Gildas Le Corguille^e, Benoit Bernay^c, Joel Henry^{a,b,c,*}

^aUniversit de Caen Basse-Normandie, UMR BOREA, IBFA, F-14032 Caen, France

^bUMR BOREA Biologie des ORganismes et Ecosystmes Aquatiques" MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207

^cProteogen, SFR 146 ICORE, Universit de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France

^dResearch & Development Aqua Platform, AQUATIV Corporation, ZA du Gohelis, 56250 Elven , France

^eABiMS, FR2424 CNRS-UPMC, Station Biologique, 29680 Roscoff, France

Abstract

We investigated the molecular characterization of a Tilapia by-product hydrolysate to assess its nutritional potential in aquafeed. The proximate composition and amino acid composition showed that our hydrolysate had high protein content and contained all the essential amino acids required for carnivorous fish nutrition. The molecular weight profile determined by HPSEC indicated that the hydrolysate was mainly composed of polypeptides (46.9%) and oligopeptides (35.8%). We also characterized the peptide fraction by nLC-ESI-MS/MS and OFFGEL-nLC-MALDI-TOF/TOF. We identified 1,374 peptides, and highlighted a high diversity of oligopeptides and polypeptides. Finally, our Tilapia by-product hydrolysate exhibited antimicrobial activity against *Yersinia ruckeri* and to a lesser extent against *Edwardsiella tarda* and *Bacillus megaterium*. These preliminary results suggest the strong nutritional and functional potential of Tilapia by-product hydrolysates.

Keywords: Tilapia hydrolysate, HPSEC, peptide identification, nLC- ESI-MS/MS, OFFGEL-nLC-MALDI-TOF/TOF, antimicrobial activity

1. Introduction

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a freshwater fish and one of the most extensively farmed species in the world; its production reached around 3.4 million tonnes in 2012 (FAO). The United Nations Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that human consumption of fish is currently increasing and will have soared by one-third from 26.7 kg/capita in 2007 to 35.9 kg/capita in 2020 [1]. However, fish consumption habits are changing and consumers increasingly prefer prepared fish to whole fish [1]. Consequently, by-product quantities are increasing. Tilapia processing leads to approximately 60-70% of by-products that include muscle remains, head, viscera, skin, bones and scales [2]. Enzymatic hydrolysis is a powerful way to add value to these by-products, in particular to recover high value proteins from by-products by improving their availability and their digestibility [3]. Furthermore, fish and shellfish hydrolysates can have varied biological activities (antibacterial [4], antioxidant [5] or antihypertensive [6]), so that they are attractive to the nutraceutical industry. The nutritional and biological properties of protein hydrolysates directly result from their amino acid and peptide composition and their molecular weight profile. A high level of free amino acids and di/tri peptides

is believed to improve palatability and nutritional properties [7]. On the other hand, the presence of higher molecular weight peptides provides biological activity, usually associated with 3-20 amino acid peptides [8]. We determined the proximal composition, the amino acid composition and the molecular weight profile of a Tilapia by-product hydrolysate to assess its nutritional properties. We determined the amino acid composition and the primary sequences of the hydrolytic peptides thanks to an experimental strategy based on the association of NGS and mass spectrometry, previously developed and described by [9]. In addition, we used nLC ESI-MS/MS and nLC MALDI-TOF/TOF, associated to a powerful first separation step, OFFGEL electrophoresis, to characterize very complex samples. Finally, we investigated the functionality of our hydrolysate using *in vitro* antibacterial tests performed on Gram – and Gram + bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the Tilapia hydrolysate

Raw materials (head, frames and viscera) from tilapia (*Oreochromis niloticus*) were ground to 6mm and loaded into a 10 L thermostated batch reactor equipped with a central stirrer (40rpm). The by-products were heated to

*corresponding author

50°C, then submitted to enzymatic hydrolysis using Protamex enzyme (Novozymes, Denmark), a Bacillus protease complex, at 0.15% of the raw material. No pH regulation was applied during the 30 mn long hydrolysis process. Then the enzyme was inactivated by increasing the temperature to 80°C for 15min. The hydrolysates were sieved to 500 µm to remove the waste, centrifuged to remove most of the lipid fraction and then spray-dried and stored at 0-4°C.

2.2. Proximate composition and determination of the degree of hydrolysis (DH)

The proximate composition of the hydrolysate was determined by the In vivo Labs laboratory (Saint Nolff, France). The moisture content was obtained by desiccation (103°C, 4h) according to the CE N°152/2009 standard. The total crude protein content (N x 6.25) was determined by the Dumas method (ISO 16634-1) and crude fat by solvent extraction after hot acid hydrolysis (CE N°152/2009). The ash content was measured after incineration (550°C, 8h). The degree of hydrolysis was assayed using the OPA (*o*-phthaldialdehyde) method detailed by [10] and based on the measurement of the amino groups generated during the hydrolysis process. The DH was calculated according to the following formula:

$$DH = \frac{h}{htot} * 100$$

where $htot = 8$ and $h = \frac{(Serine - NH2 - b)}{a}$

with $a = 1$ and $b = 0.4$

$$(Serine - NH2) = \frac{\frac{(OD_{sample} - OD_{blank})}{(OD_{standard} - OD_{blank})}}{\frac{Volume_{sample}(l) * 100}{Weight_{sample}(g) * \%protein_{in\ sample}}} * 0.9516 *$$

2.3. Amino acid analysis

The dietary amino acid composition of the hydrolysate was determined by the In Vivo Labs laboratory (Saint Nolff, FRANCE) using high-performance liquid chromatography after acid hydrolysis (6N HCl, 110°C, 24 h) and performic acid oxidation, to recover all amino acids including methionine and cysteine. The resulting hydrolysates were then adjusted to pH 2.20. The amino acids were separated by ion exchange chromatography and determined using photometric detection at 570 nm (440 nm for proline) after reaction with ninhydrin. For tryptophan determination, each sample was hydrolyzed under alkaline conditions with barium hydroxide and heated in an autoclave at 120°C for 16 hours. Then the hydrolysates were acidified to pH 3.0 using chlorhydric acid. Tryptophan was separated by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) and determined by fluorometric detection.

2.4. Determination of the molecular weight profile by HPSEC

HPSEC characterization was performed on a VARIAN system equipped with a UV (214-nm wavelength) detector. Elution was carried out on a ReproSil 50 SEC column (300 x 8 mm, 5 µm; AIT France) with MeOH/water/TFA (10/89.9/0.1, v/v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min. The peptide extract was dissolved in the HPSEC eluent and 10 µl were injected. The HPSEC system was calibrated with five molecular mass markers: ribonuclease A (13,700 Da), insulin (5,778 Da), vasopressin (1,084 Da), FLRFamide (580 Da), and hydroxytryptophan (220 Da).

2.5. Illumina sequencing

Total RNA was extracted from whole head, viscera, frame of five Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*) to perform the sequencing of 2 x 150 bp on a MiSeq Sequencing System. The preparation of cDNA libraries and the bioinformatic analyses were carried out according to protocols previously described by [9].

2.6. Peptide identification

Structural characterization of the peptides was achieved according to our previously developed experimental strategy [9]. Briefly, peptide extraction was performed in cold 0.1% TFA. Each supernatant obtained by centrifugation (21,000 x *g*, 15 min, 4°C) was loaded onto a Sep-Pak C18ec classic cartridge (Water). To study the low molecular weight (200-1,000 Da) peptide fraction, elution of the Sep-Pak cartridge was performed with 0.1%TFA in 20%ACN. Then, the evaporated sample was separated in a nanoLC system (Ultimate 300, Thermo Scientific) using a Pepmap C18 column (250 x 75 µm, 3 µm; Thermo Scientific) and analyzed by ESI-MS/MS on an LTQ-Orbitrap Discovery (ThermoFischer). To study the high molecular weight peptide fraction (800-4,000 Da), each Sep-Pak cartridge was eluted by 0.1% TFA in 80% ACN. The dried peptide pellets were resuspended in migration buffer and fractionated in solution with an Agilent 3100 OFFGEL fractionator (Agilent Technologies). Peptide electrofocusing was performed on 13-cm IPG strips, pH 3-10 and a 24-well frame set (Agilent Technologies). Each of the 24 fractions was submitted to a second separation step on a nano-LC Prominence system (Shimadzu) using a Zorbax C18 column (150 x 75 µm, Agilent technologies). Then, MS analysis was performed on an AB SCIEX 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and OptiBeam™ on-axis laser irradiation with a 1,000-Hz repetition rate. Finally, peptide and protein precursor identification was carried out by database searching using the Mascot 2.2.04 program (Matrix Science). Three databanks were used: a homemade *O. niloticus* RNAseq database (159,993 entries), the NCBI protein database (24,190 entries) and the NCBI EST database (117,473 entries). In addition, *de novo* peptide sequencing was performed from

ESI-MS data using PEAKS Studio v4.5 software (Bioinformatics Solutions, Toronto, Canada). The results were first filtered by $\geq 90\%$ high confidence scores and then validated (or not) manually according to the fragment peaks attributed on the MS/MS spectra.

2.7. Antibacterial assay

The antibacterial activity of the peptide extracts and rpHPLC fractions was assayed against three bacterial strains: *Edwardsiella tarda* and *Yersinia ruckeri*, two pathogens of freshwater fish, and *Bacillus megaterium*. Each peptide extract obtained from 100 mg of hydrolysate was suspended in 100 μ l of sterile water. This suspension was considered as the 1X concentration. Then it was diluted from 0.5X to 0.01X. The rpHPLC purification step was conducted on a C18 column (NUCLEODUR 250 mm x 10 mm) equilibrated with 0.1% (v/v) TFA aqueous solution at a flow rate of 1 ml/min. Peptide extract obtained from 10 mg was injected for each run. Elution was performed using a linear gradient (2%/min) of acetonitrile/water/TFA (79.9/20/0.1, v/v/v) with absorbance set at 214 nm. HPLC fractions (1 ml) were collected, evaporated and stored at 4°C until antibacterial assays. The antibacterial activity of each sample was determined in triplicate by liquid growth inhibition assays [11]. For more details, see [9].

3. Results and discussion

3.1. Proximate composition and degree of hydrolysis

Our Tilapia by-product hydrolysate had a protein content of 80.2%, out of which 69.8% were soluble proteins. The lipid content was 7.4%, and moisture and the ash content were respectively 3.5% and 5.4%. This proximate composition is close to those described for other fish hydrolysates in various studies, which range between 60% and 90% of the total composition. The fat content we determined was slightly higher than usually reported ($\leq 5\%$) but this parameter is usually influenced by the process (centrifugation, ultrafiltration) applied at the end of the hydrolysis step to concentrate the protein fraction. The high protein content and the relatively low fat content demonstrate the potential for using fish hydrolysates in animal or human nutrition (see [12] for a review). The degree of hydrolysis was 22.1%, similar to that of a fresh Tilapia minced meat hydrolysate [13], and lower than that of a previously described shrimp hydrolysate (59.6%) [9].

3.2. Amino acid composition

The total and free amino acid profiles of our hydrolysate are summarized in Table 1. It was composed of 68.2g/100g of amino acids, out of which 32.5/100g were essential amino acids (EAA). We found the highest concentrations for glutamic acid (9.57 %), glycine (7.00 %), aspartic acid (6.26 %), lysine (5.09 %) and alanine (5.06 %). The hydrolysate contained 14.8 % of free amino acids. (out of the total

amino acids). All EAA were present in their free form, and their content ranged between 0.04 % for cysteine and 1.42 % for leucine. The majority of free amino acids were arginine (1.82 %), followed by leucine (1.42 %), lysine (1.39 %) and phenylalanine (0.96 %). Our hydrolysate had a well-balanced amino acid composition, with all essential amino acids present in higher amounts than the amino acid requirements defined for rainbow trout, a carnivorous fish [13], confirming its potential for use in aquafeed. Inclusion of Tilapia hydrolysate (provided by the same manufacturer) in a diet formulated for a marine fish species maintained specific growth rates of red seabream [14].

3.3. Molecular weight profile

We analyzed the molecular weight profile of our hydrolysate by HPSEC on a ReproSil 50 SEC column (300 x 8 mm, 5 μ m). The results are presented in Figure 1. The main fraction of soluble peptides (46.9%) was composed of polypeptides ($\geq 2,000$ Da) followed by oligopeptides (500–2,000 Da, 35.8%). The hydrolysate contained only 17.3% of di/tri peptides and free amino acids (≤ 500 Da). These results are in accordance with the low degree of hydrolysis we determined. Our hydrolysate had a high content in peptides with a molecular weight above 2,000 Da. This mass range is advantageous for the search of bioactive peptides such as antibacterial peptides whose molecular weight usually ranges between 600 and 5,000 Da [15].

3.3.1. Illumina sequencing and assembly

We assembled the whole transcriptome of our hydrolysate using Trinity workflow. We found 159,993 transcripts ranging from 201 to 73,759 bp, with an average length of 1134.74 bp. Up to 43.7% of the transcripts were annotated by a significant hit with Swissprot database (blastx and blasp searches) or Pfam search using the Trinotate pipeline. Raw reads are available from Genbank under Bioproject PRJNA259816 and BioSample accession n° SRS692422 and experiment SRX689901.

3.4. Peptide composition of the hydrolysate

The experimental strategy used to characterize the peptide fraction yielded 1,374 unique peptides using database searching with Mascot. Their molecular weight ranged between 515.3 Da and 3,624 Da, and the average molecular weight was 1,434 Da (Fig. 2B). We identified 11 more peptides with molecular weights in the 500 - 1,000 Da range using *de novo* peptide sequencing with PEAKs software, so the total number of identified peptides was 1,385. As illustrated in Fig. 2C, most of the identified peptides (874, 63.1%) had a molecular weight in the 1,000 - 2,000 Da range. The 500-1,000 Da mass range included 427 (30.8%) identified peptides. We only identified 84 peptides (6.1%) in the 2,000-5,000 Da mass range and did not detect any peptide with a molecular weight below 500 Da or above 5,000 Da. These results are complementary to the

molecular weight profile obtained by HPSEC; they provide qualitative data to complete the quantitative HPSEC data. Thus, although the 1,000-2,000 Da mass range represented only 24.6% of the compound, it contained the highest diversity of peptides, suggesting that each peptide was present in low quantity. The same was observed in the 500-1,000 Da mass range. Conversely, the 2,000-5,000 Da mass range represented a high ratio (34.7%) of the hydrolysate but only 236 identified peptides, suggesting that they were more concentrated. We did not identify any sequence of hydrolytic peptides with a molecular weight below 500 Da because low-molecular-weight peptides generate low numbers of fragment peaks that result in ambiguous results [16]. Fig.2 illustrates the specificities of each mass spectrometry method we used. We identified a larger number of peptides in MALDI-TOF/TOF (799 peptides) than in ESI-MS/MS (603 peptides) and their molecular distribution differed. The average molecular weight of the ESI-MS/MS peptides was 1,108 Da versus 1,529 Da in MALDI-TOF/TOF. This is a direct result of the respective mass ranges targeted by each technique.

Moreover, a very low number (28) of peptides was detected by the two methods, highlighting the interest of using both. ESI-MS/MS is very well adapted to characterize low-molecular-weight peptides; three times more peptides were identified in the 500-1,000 Da mass range by ESI-MS/MS (320 peptides) than in MALDI-TOF/TOF (102 peptides). These results also highlight how important it is to fractionate complex samples before mass spectrometry analyses: the two-dimension separation before MALDI-TOF/TOF subsequently increased the number of identified peptides. Another determining factor of peptide identification is the quality and quantity of genomic data available. In this study, the number of identified peptides increases with the size of the databank. We identified 689 peptides using the NCBI Protein databank (24,190 entries), 535 peptides using the NCBI-ESTs databank (117,473 entries) and 697 peptides using the RNAseq databank (159,993 entries), confirming that the lack of genomic data about unconventional species is a limiting factor for studying their derived food products. These results support those obtained in a previous study about peptide identification in a shrimp hydrolysate [9]. In that work, 808 peptides were identified by ESI-MS/MS and MALDI-TOF/TOF using Mascot program with the NCBI and a homemade database. The number of identified peptides is 1.7 fold more in the present study. This confirms the efficiency of the present experimental strategy based on 2D peptide fractionation (nLC/OFFGEL electrophoresis), on the use of complementary mass spectrometers (ESI-MS/MS and MALDI-TOF/TOF), and enhanced by the creation of a homemade database from organs used for hydrolysate production. Moreover, these results suggest that Tilapia by-product hydrolysate contains a higher diversity of peptides than the previously described shrimp hydrolysate.

3.5. Antibacterial activity assay

We tested the antimicrobial activity of our peptide extract and rp-HPLC fractions against *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* and *Bacillus megaterium*. The peptide extract of our hydrolysate displayed antibacterial activity against *Yersinia ruckeri* at concentrations ranging between 100X and 7.5X. This activity was conserved after a purification step by rp-HPLC: 8 fractions (the 22nd to 29th minute fractions) displayed similar activity to oxytetracycline at a concentration of 1 µg/µl. Moreover, the peptide extract exhibited antibacterial activity against *Edwardsiella tarda* and *Bacillus megaterium*, but at higher concentrations (100X and 50X). However, we detected no antibacterial activity against *E. tarda* and *B. megaterium* after the purification step by rp-HPLC. Although we did not identify any antimicrobial peptide sequence, our hydrolysate displayed antimicrobial activity likely to improve resistance against pathogens, a major problem in intensive fish-farming. This assumption is reinforced by the work of [14], who demonstrated that a Tilapia hydrolysate (provided by the same manufacturer) improved survival of red seabream challenged by *Edwardsiella tarda*.

4. Conclusion

This study demonstrates the nutritional potential of a Tilapia by-product hydrolysate with a high peptide content and a well-balanced amino acid profile. Moreover, the experimental strategy used to characterize the peptide fraction yielded 1,374 unique peptides and highlighted the high peptide diversity of the hydrolysate. Finally, the hydrolysate exhibited antimicrobial activity against *Yersinia ruckeri* and to a lesser extent against *Edwardsiella tarda* and *Bacillus megaterium*. This work is a preliminary approach before focusing on the diversity of proteins and peptides present in the hydrolysate as well as on the organs they come from. These results will contribute to better characterizing the hydrolysate and understanding its dietary performances in fish. Palatable, nutritional and bioactive performances of dietary Tilapia hydrolysate will have to be determined by conducting *in vivo* trials on fish.

Acknowledgments

This work was supported by the Country Council of Basse-Normandie. Sequencing was performed by the SeSAME platform (Franois Baclesse Center). We thank Dominique Vaur, Angelina Legros and Antoine Roussel for their hospitality and technical support

References

- [1] FAO. State of world fisheries and aquaculture - 2012. Technical report, 2012.
- [2] S. Clement and R. T. Lovell. Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 119(2) :299–310, 1994.
- [3] Fereidoon Shahidi and YVA Janak Kamil. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12(12) :435–464, 2001.
- [4] Zunying Liu, Shiyuan Dong, Jie Xu, Mingyong Zeng, Hongxia Song, and Yuanhui Zhao. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 19(3) :231–235, March 2008.
- [5] Niranjan Rajapakse, Eresha Mendis, Won-Kyo Jung, Jae-Young Je, and Se-Kwon Kim. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2) :175–182, March 2005.
- [6] Jae-Young Je, Pyo-Jam Park, Hee-Guk Byun, Won-Kyo Jung, and Se-Kwon Kim. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresource Technology*, 96(14) :1624–1629, September 2005.
- [7] A. Aksnes, B. Hope, E. Jonsson, B.T. Bjornsson, and S. Albrektsen. 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, 2006.
- [8] Se-Kwon Kim and Isuru Wijesekara. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides : A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1) :1–9, January 2010.
- [9] Marie Robert, Céline Zatylny-Gaudin, Vincent Fournier, Erwan Corre, Gildas Le Corguillé, Benoit Bernay, and Joël Henry. Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*). *Journal of biotechnology*, 186 :30–37, 2014.
- [10] Frank C. Church, Harold E. Swaisgood, David H. Porter, and George L. Catignani. Spectrophotometric assay using o-phthalodialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6) :1219–1227, 1983.
- [11] C Hetru and P Bulet. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 78 :35–49, 1997.
- [12] M. Chalamaiah, B. Dinesh kumar, R. Hemalatha, and T. Jyothirmayi. Fish protein hydrolysates : Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications : A review. *Food Chemistry*, 135(4) :3020–3038, December 2012.
- [13] M. B. K. Foh, M. T Kamara, I. Amadou, B. M Foh, and W Wenshui. Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *Int. J. Biol. Chem.*, 2011.
- [14] Hien Thi Dieu Bui, Sanaz Khosravi, Vincent Fournier, Mikael Herault, and Kyeong-Jun Lee. 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, January 2014.
- [15] Zhe Wang and Guangshun Wang. APD : the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl 1) :D590–D592, 2004.
- [16] Christian EH Schmelzer, Regina Schöps, Renate Ulbrich-Hofmann, Reinhard HH Neubert, and Klaus Raith. Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *Journal of Chromatography A*, 1055(1) :87–92, 2004.
- [17] NRC. *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academies Press, 2011.

Table 1 : Total amino acid and free amino acid profiles of our Tilapia by-product hydrolysate (% of the product)

Amino acid	Total amino acids	Free amino acids	Amino acid requirement (% of diet)*	
EAA				
His	1.53 %	0.23 %	His	0.8 %
Iso	2.66 %	0.42 %	Iso	0.8 %
Leu	4.68 %	1.42 %	Leu	1.5 %
Lys	5.09 %	1.39 %	Lys	2.4 %
Met	1.71 %	0.42 %	Met	0.7
Cys	0.53 %	0.04 %	Met + Cys	1.1 %
Phe	2.64 %	0.96 %	Phe	0. %
Tyr	1.94 %	0.85 %	Phe+Tyr	1.8%
Thr	3.03 %	0.23 %	Thr	1.1
Val	3.14 %	0.46 %	Val	1.15 %
Arg	4.91 %	1.82 %	Arg	1.45 %
Trp	0.66%	0.12%	Trp	0.20 %
NEAA				
Asp	6.26 %	0.22 %		
Ser	3.01 %	0.22 %		
Glu	9.57 %	0.42 %		
Pro	4.82 %	0.11 %		
Gly	7.00 %	0.26 %		
Ala	5.06 %	0.52 %		
Tau	0.79 %	nd		
HPro	2.40 %	nd		

* Amino acid requirement of rainbow trout according to [17]

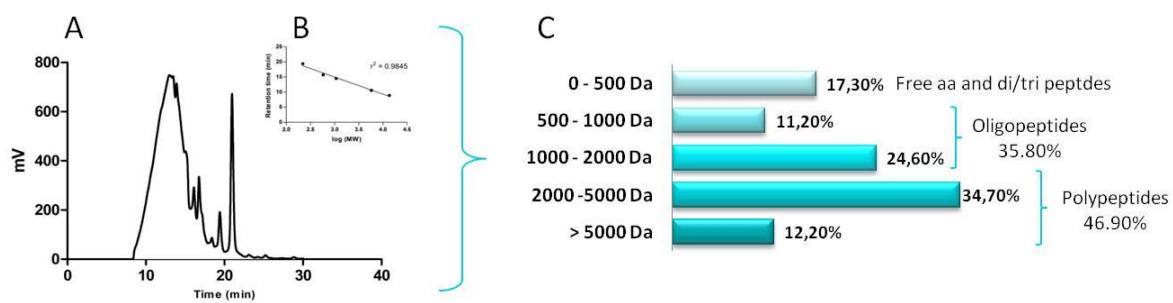


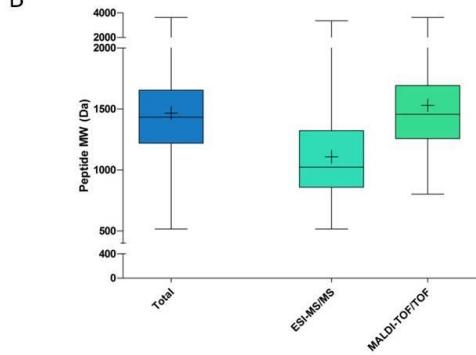
Figure 1: Molecular weight profile of our Tilapia by-product hydrolysate.

Size exclusion chromatogram (A) and calibration curve (B) using a ReproSil column at a flow rate of 0.7 ml/min of MeOH/TFA 0.1% in water (10/90, v/v). Molecular weight distribution (C) was calculated according to the calibration curve.

A

	NCBI-proteins	NCBI-ESTs	RNAseq	Common peptides
MALDI-TOF/TOF	351	167	483	202
ESI-MS/MS	358	378	232	365
Common peptides	20	10	18	

B



C

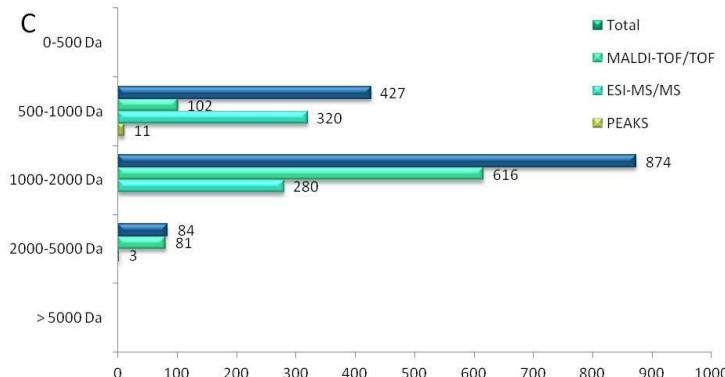


Figure 2: Peptide identification of our Tilapia by-product hydrolysate. A: Number of identified peptides according to the mass spectrometry method used and according to the database used in Mascot identification process. B: Molecular weight distribution of total identified peptides and of peptides identified by ESI-MS/MS or MALDI-TOF/TOF. C: Number of identified peptides in the mass range used in the HPSEC study.

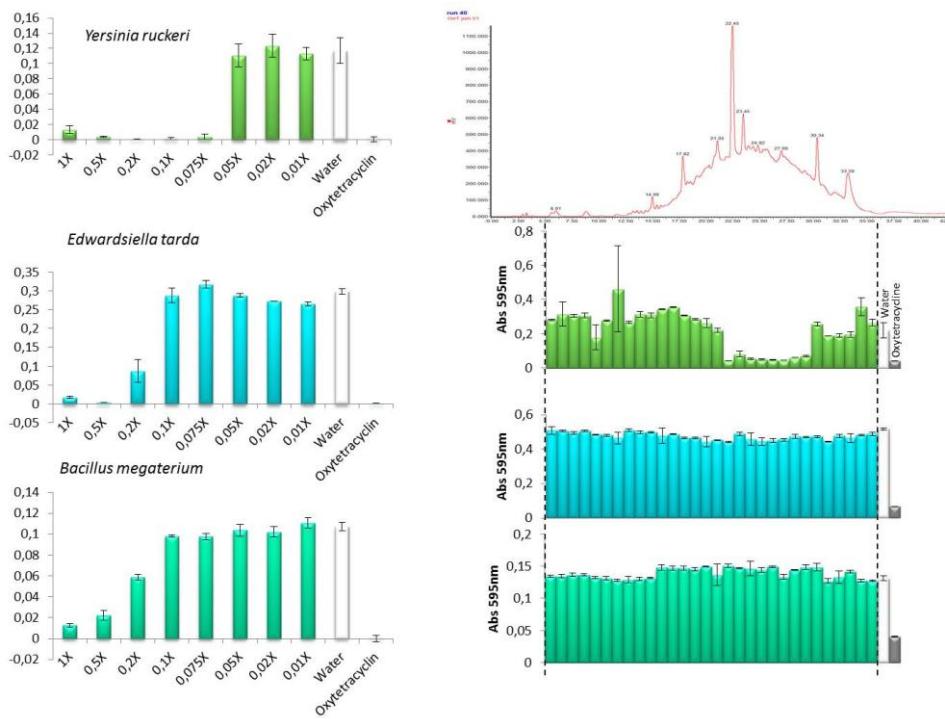


Figure 3: Antimicrobial activity of our peptide extract against *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* and *Bacillus megaterium* (A). Reverse phase chromatogram on a C18 column of the hydrolysate and antimicrobial activity of rpHPLC fractions against *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* and *Bacillus megaterium* (B).

5 Chapitre 3

Les co-produits de tilapia : protéome et peptides hydrolytiques



Ce chapitre est consacré à l'étude des protéines à l'origine de la diversité des peptides hydrolytiques composant l'hydrolysat. Une approche protéomique a été réalisée pour déterminer le protéome des trois co-produits : la tête, les viscères et la carcasse. Ces informations viennent compléter les transcriptomes de chaque co-produit obtenus par séquençage Illumina. L'ensemble de ces données permet de déterminer les familles de protéines générant les peptides hydrolytiques ainsi que leur origine tissulaire. Ces résultats font l'objet d'une publication soumise dans Journal of Proteomics.

Predicting by-product hydrolysate composition from by-product proteome : a tricky approach

Marie Robert^{a,b}, Celine Zatylny-Gaudin^{a,b}, Erwan Corre^e, Gildas Le Corguille^e, Vincent Fournier^d, Benoit Bernay^c,
Joel Henry^{a,b,c,*}

^aUniversit de Caen Basse-Normandie, UMR BOREA, IBFA, F-14032 Caen, France

^bUMR BOREA Biologie des ORganismes et Ecosystmes Aquatiques" MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207

^cProteogen, SFR 146 ICORE, Universit de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France

^dResearch & Development Aqua Platform, AQUATIV Corporation, ZA du Gohelis, 56250 Elven , France

^eABiMS, FR2424 CNRS-UPMC, Station Biologique, 29680 Roscoff, France

Abstract

This study is the first ever work about the correlation between proteins from fish by-products and hydrolytic peptides from a protein hydrolysate of the same by-products. Enzymatic hydrolysis is a common way of recovering proteins from fish by-products and is known to release bioactive peptides encrypted in native proteins. Hydrolysates produced from fish by-products are therefore more and more under focus. The aim of this study is to determine the main protein precursors that generate hydrolytic peptides and then try to establish a correlation with the proteins initially present in our by-products. The multi-omics strategy we used to characterize by-products yielded 115, 103 and 247 non-redundant proteins from tilapia (*Oreochromis niloticus*) head, viscera and frame, respectively. In addition, 95 protein precursors generated 638 hydrolytic peptides from our by-product hydrolysate. The major part of hydrolytic peptides was generated by collagens (42.8%), cytoskeletal proteins (25.1%) and enzymes (15%) that are mainly found in muscle and skin and so probably originated from head and frame. Moreover, there was no direct correlation between the proteins we identified from by-products through a proteomics approach and the protein precursors of the hydrolysate peptides.

Keywords: *Oreochromis niloticus* hydrolysate, Illumina sequencing, Fish proteome, transcriptomics, proteomics, peptidomics.

1. Introduction

There is currently increased interest in naturally occurring functional compounds from raw material and processed food, especially health-promoting compounds. These functional compounds include linolenic acid, vitamin E, glucosinolates, omega-3 fatty acids, phenolic acids, flavonoids, terpenes, organosulfur compounds, proteins, peptides and others [1]. Among them, proteins and peptides are one of the most important food components that influence functional and biological activity of food products. Dietary proteins are indeed a source of bioactive peptides that are inactive in their latent state within native proteins and can be released by enzymatic hydrolysis during digestion or food processing [2]. Various protein sources such as milk, meat, fish, egg, soybean, rice, cereals are known to produce bioactive peptides [3]. Among them, fish and especially fish by-products are particularly interesting for the food industry. The fish industry is a growing food production sector that produces around 180 million tons of fish and shellfish per year. However, only 40% of this production is used for human consumption [4] and

the remaining 60% are by-products, which include head, skin, trimmings, fins, frames, viscera and roes. These by-products are generally discarded or used as fertilizers or animal feed [5]. But conversion of these wastes into high-value functional ingredients may provide a solution for dealing with the legal restrictions, high cost and environmental problems associated with the disposal of such waste material [6]. The common way to recover proteins from fish by-products is enzymatic hydrolysis, which releases nutritional and functional peptides. In the recent decades, an increased number of studies has highlighted various biological activities in fish by-product hydrolysates. Newly discovered bioactive peptides include antioxidant peptides such as a 7 amino-acid-peptide in hoki skin hydrolysate [7], ACE-inhibitory peptides in pollack skin or frame hydrolysates [8, 9] or in sea bream scale hydrolysate [10]. Moreover, antimicrobial, anticoagulant, anti-obesity, anti-hypertensive or anticancer peptides have also been identified in fish by-product hydrolysates [11–14].

In recent decades, peptidomics and proteomics studies have emerged as an important part of a holistic approach to food sciences and technology [15] to investigate the fields of food quality/authentification/safety/allergens, nutrition or biological activity [1]. Biological activity has

*corresponding author

been particularly investigated through -omics approaches involving both *in silico* or *in vitro* approaches [16] as illustrated in Fig.1. The *In vitro* approach is the classical way to identify bioactive peptides from food products. This approach generally involves several steps that are summarized in [1]. After protein selection, peptide production can be achieved by *in vitro* gastrointestinal digestion, food processing, storage or *in vitro* hydrolysis by various proteolytic enzymes. Then, separation steps typically performed by ultrafiltration, size exclusion chromatography, ion exchange chromatography or reverse phase HPLC are associated to *in vitro* or *in vivo* screening of biological activities. Finally, peptide identification is obtained by Edman degradation or mass spectrometry [2]. A large number of bioactive peptides has been identified that way [3]. However, food matrices are generally highly complex, so analytical tools like mass spectrometry techniques have to be improved to develop this research area [17]. In addition, a second approach based on the use of bioinformatics tools has been developed to speed up the screening of high-potential bioactive peptides. *In silico* analysis can be useful in several areas, especially in biological activity prediction and proteolysis simulation [18, 19]. A first screening of biological activities can be performed on various bioactive peptide databanks such as SwePep, BioPD, PepBank or BIOPEP, focusing on food-derived peptides [20]. To confirm that bioactive peptides can actually be released from the protein precursor by hydrolysis, *in silico* digestion can be performed. This approach has been used in several studies [21–23] but it does not ensure that *in silico* peptides can be reproduced experimentally due to the complex nature of protease-protein interactions [24]. More particularly, by-product hydrolysates are complex mixtures of peptides and other compounds, so *in silico* prediction of their peptide composition is not so easy. To our knowledge, no study has yet been conducted about the relationship between the protein composition of by-product raw material and the protein composition of a hydrolysate produced from the same by-products. In this context, the aim of this study is to investigate what kind of proteins generate the hydrolytic peptides found in a tilapia by-product hydrolysate produced from head, viscera and frame by-products. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a freshwater fish. It is one of the most farmed species in the world: its production reached around 3.4 million tons in 2012 (FAO). Its processing leads to approximately 60–70% of by-products, including meat remains, head, viscera, skin, bones and scales [25], so raw material is abundant. To investigate the correlation between by-product composition and hydrolytic peptide content, we used a multi-omics approach (Fig. 2). First, we performed a transcriptomics analysis of each of the three by-products composing the hydrolysate (head, frame and viscera) by Illumina sequencing to create targeted transcriptomics data libraries and determine the major expressed transcripts in each by-product. Then we carried out a proteomics approach to determine the proteome of each by-product. In parallel,

we used a peptidomics approach to determine the peptide composition of the hydrolysate and find the protein precursors of these peptides. Finally, we compared by-product proteins with hydrolysate protein precursors to determine whether it was possible to predict hydrolysate composition from the by-product proteome.

2. Materials and methods

2.1. Transcriptomics analysis of by-products by Illumina sequencing

Total RNA was extracted in TriReagent from whole head, viscera and frame (muscles/bones, skin and tail) of five Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The total RNA concentration of each sample was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher) and RNA quality was verified using a TapeStation 2200 (Agilent Technologies). cDNA libraries were prepared using the Illumina MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, Part # 15034097 Rev. B) according to the manufacturers protocol, from 4 µg of total RNA of each sample. Briefly, poly-(A)-mRNAs were purified with magnetic oligo dT beads and reverse-transcribed into first strand cDNAs. Then, the second cDNA strands were synthesized. dsDNAs were cleaved into 300-bp fragments using Covaris S220 (Applied Biosystems) (Duty cycle : 5%, Intensity : 3, bursts per second : 200, duration : 50s). Then, each sample was tagged and adapters were ligated to the dsDNA ends. A PCR step was performed to amplify the amounts of DNA in the library. Sample quality was assessed by Tape station 2200 (Agilent Technologies). Finally, cDNA libraries were loaded onto a flow cell (Illumina TruSeq PE Cluster Kit v2 - cBot - GA) channel at a total concentration of 2 pM per lane. The sequencing of 2x150 bp paired-ends reads was performed on an Illumina Genome Analyser MIseq. The whole raw dataset was filtered and trimmed using Trimmomatic (version 0.32 [26]), and the cleaning process was checked using fastQC (version 0.10.01 <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). The transcripts resulting from all the cleaned reads were assembled using Trinity (release 2013-11-10 - [27]), the genome-independent transcriptome assembler including digital normalization by a k-mer coverage step. Low coverage contigs (FPKM < 1) and rare isoforms (< 1%) were filtered by remapping the full set of cleaned reads using Bowtie (version 2.1.0- [28]) and relative abundances were estimated using RSEM (version 1.2.0 [29]) to get the FPKM values. Finally, reads corresponding to the different organs were remapped independently on the full transcriptome to identify organ-specific transcripts (the two software programs were launched through the Trinity package Wrapper). Low coverage transcripts (FPKM < 1) and rare isoforms (< 1%) were excluded from the organ-specific transcriptomes. Annotation was performed using the Trinotate pipeline (<http://trinotate.sourceforge.net>) including an ORF discovery step using Transdecoder, a blastp and blastx (ver-

sion 2.2.28+) similarity search against the Uniprot_swissprot database (June 2014 version), an hmmscan (hmmer v.3.1b1) search against the Pfam A database (v 27.0) , a signalP (v. 4.0) and tmhmm (v 2.0c) analysis, and an rRNA annotation step using RNAMMER.

2.2. Proteomics analysis of by-products

2.2.1. Protein extraction

Frozen tilapia by-products (head, viscera and frame) were separately ground to a fine powder in liquid nitrogen. The powder was homogenized in a PBS buffer (PBS 1X, 10 mM DTT, 0.4 mM PMSF) and a Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0.4 mM PMSF) and incubated at 4°C for 30 min. After a centrifugation step at 20,000 x g for 10 min, each supernatant was recovered and proteins were precipitated in 4 volumes of -20°C acetone and then dried. Protein concentrations were determined using Bradford's method [30].

2.2.2. OFFGEL electrophoresis separation

The PBS and Tris-HCl protein extracts of each by-product were pooled (see previous paragraph) and then 300 µg of total protein extracts were fractionated in-solution with an Agilent 3100 OFFGEL fractionator (Agilent Technologies). Protein electrofocusing was performed with 13-cm, pH 3-10 IPG strips and a 12-well frame set (Agilent Technologies). The IPG strips and paper wicks were rehydrated with 40 µl of OFFGEL rehydration solution for 15 min. The solution was prepared by mixing 560 µl of Protein OFFGEL Stock Solution 1.25X (2.4 M thiourea, 8.4 M urea, 78 mM DTT, 6% glycerol, OFFGEL ampholyte pH 3-10) and 140 µl of water. Samples were solubilized in the same buffer and loaded (150 µl) in each well. The wells were sealed, and mineral oil was added to each end of the strip. Then, the strips were focused until 20 kV hr was reached with a max voltage of 8,000 V, (50 µA and 200 mW) and a hold setting of 500 V. After each run (approximately 24 h), each fraction was removed and precipitated in 4 volumes of -20°C acetone for 1 h and dried.

2.2.3. Protein digestion

Dried OFFGEL fractions were solubilized in 50 mM ammonium bicarbonate. Reduction and alkylation were performed by incubation with 100mM DTT at 95°C for 5 min and 40mM iodoacetamide in the dark for 20 min. Finally, samples were hydrolyzed with trypsin (Promega) at 6 ng/ µl at 37°C overnight, and tryptic peptides were analyzed by mass spectrometry.

2.3. Preparation of the tilapia by-product hydrolysate

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) raw materials (heads, frames and viscera) were ground to 6 mm and loaded into a 10-L thermostated batch reactor equipped with a central stirrer (40 rpm). The by-products were heated to 50°C, then submitted to enzymatic hydrolysis using Protamex

enzyme (Novozymes, Denmark), a Bacillus protease complex, at 0.15% of the raw materials. No pH regulation was applied during the 30 mn long hydrolysis process. Then the enzymes were inactivated by increasing the temperature to 80°C for 15 min. The hydrolysates were sieved to 500 µm to remove the waste, centrifuged to remove most of the lipid fraction and then spray-dried and stored at 0-4°C.

2.4. Hydrolysate composition: Extraction and fractionation of hydrolytic peptides

One gram of hydrolysate was homogenized in 10 ml of cold 0.1% TFA (HPLC-grade, SIGMA) overnight and centrifuged 15 min at 21,000 x g at 4°C. The supernatant was filtered and concentrated on a Sep-Pak C18ec classic cartridge (Waters), and then evaporated on a speed vac concentrator. The dried peptide extract was solubilized in Peptide OFFGEL Stock Solution (Agilent Technologies) and fractionated in-solution with an Agilent 3100 OFFGEL fractionator (Agilent Technologies). Peptide electrofocusing was performed with 24 cm, pH 3-10 IPG strips and a 24 well frame sets (Agilent Technologies) according to the protocol described in 2.2.2. Ten µL of each of the 24 fractions were recovered, desalting and concentrated onto a µC18 Omix (Varian). Then a chromatographic separation was performed for each fraction on an nLC system (Prominence, Shimadzu). Peptides were concentrated on a Zorbax 5 x 0.3 mm C18 precolumn (Agilent) and separated on a Zorbax 150 x 75 µm C18 column (Agilent Technologies). Mobile phases consisted of 0.1% TFA, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% TFA, 20% water in 79.9% ACN (v/v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nl/min, and the gradient profile was as follows: constant 7% B for 5 min, from 7 to 70% B in 183 min, from 70 to 100% B in 5 min, and back to 7% B. The 300 nl/min volume of the peptide solution was mixed with 1.2 µL/min of 5 mg/ml CHCA matrix prepared in a diluent solution of 50% ACN with 0.1% TFA. Thirty-second fractions were spotted by an AccuSpot spotter (Shimadzu) on stainless steel Opti-TOF™384 targets.

2.5. Mass spectrometry

2.5.1. MALDI-TOF/TOF

Tryptic peptides from the proteomics analysis and hydrolytic peptides from hydrolysate extraction were analyzed by mass spectrometry. MS analyses were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and OptiBeam on-axis laser irradiation with 1,000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of des-Arg-Bradykinin, Angiotensin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18-39), ACTH (7-38) and mass precision was better than 50 ppm in reflectron mode. A laser intensity of 3,200 was typically used for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1,000 single spectra (5 x 200) in the 800-4,000 Da mass range.

MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2,500 single spectra (10 x 250) with a laser intensity of 3900. For tandem MS experiments, the applied acceleration voltage was 1 kV and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings.

2.5.2. nLC-ESI-MS/MS

Peptide extracts of the tilapia by-product hydrolysate were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by online nanoLC-MS/MS (Ultimate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos pro, Thermo Fischer Scientific). Peptides were sampled on a 300 μ m x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 μ m x 250 mm C18 column (PepMap, Dionex). The nanoLC method consisted of a 60-minute gradient at a flow rate of 300 nl/min, ranging from 0% to 30% acetonitrile in 0.1% formic acid. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Spray voltage was set at 1.4 kV; heated capillary was adjusted to 200°C. Survey full-scan MS spectra ($m/z = 2001,000$) were acquired in the Orbitrap with a resolution of 60,000 after accumulation of 106 ions (maximum filling time 500 ms). The twenty most intense ions including 1+ ions from the preview survey scan delivered by the Orbitrap were fragmented by collision-induced dissociation (collision energy 35%) in the LTQ after accumulation of 104 ions (maximum filling time 100 ms).

2.6. Peptide and protein precursor identification from MS/MS analysis

Fragmentation patterns were used to determine peptide sequences. Database searching was performed using the Mascot 2.2.04 program (Matrix Science) on our home-made *Oreochromis niloticus* by-product transcriptome databases obtained by RNAseq (described in 2.1). For proteomics analyses, the following variable modifications were allowed: C-carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, dioxidation. Trypsin was selected. For peptidomics analyses, the following variable modifications were allowed: C-carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, dioxidation, C-terminal amidation, and N-terminal pyroglutamate. No enzyme was selected. Mass accuracy was set to 100 ppm and 0.6 Da for the MS and MS/MS modes, respectively.

3. Results

3.1. Assessment of by-product composition by transcriptomic and proteomic approaches

3.1.1. Overview of sequencing

We performed de novo RNAseq assembly using Illumina paired-end technology to obtain the transcriptome of tilapia head, viscera and frame by-products. Based on these high-quality reads, we assembled and filtered contigs based on isoform representation and FPKM values into 159,993 unique sequences ranging between 201 and

73,759 bp, with an average length of 1134.74 bp. 43.7% of these sequences were annotated by at least one annotation step described in the Trinotate step. We then remapped cleaned reads resulting from each organ library separately on the full transcriptome, and thus identified organ-specific transcripts presented in Table 1. Sequences are available from NCBI SRA under Bioproject SRP045891 and BioSample accession numbers SRS692422. Among organs, viscera data generated 57,952 sequences with an average length of 1612.15bp, head data generated 76,324 sequences with an average length of 1634.31bp, and frame data generated 93,672 sequences with an average length of 1375.14bp.

3.1.2. Overview of the tilapia by-product proteome

The two-dimension protocol we used to elucidate the proteome of tilapia by-products yielded 116, 103 and 247 non-redundant proteins from head, viscera and frame data, respectively. The complete list of identified proteins is shown in supplementary data 1. We recovered a few proteins in common to two or three co-products. The largest overlap was between the head and the frame proteomes, with 47 proteins in common. We detected 27 common proteins to the frame and the viscera proteomes, and 18 common proteins to the head and viscera proteomes. Among the 115 non-redundant proteins we identified in the head proteome, 21 were enzymes and 8 were cytoskeletal proteins. No collagen was detected. The viscera proteome was distinguishable by a higher diversity of enzymes, with 34 enzymes and among them two pancreatic enzymes involved in protein and starch digestion: trypsinogen and amylase. Moreover, 10 proteins belonged to the cytoskeletal protein class, and one (the alpha (XII) chain) belonged to collagen-type proteins. The frame proteome was composed of a high number of proteins (247). Among them, 31 cytoskeletal proteins, 47 enzymes and 2 collagen chains (collagen alpha-1 (XII) chain and collagen alpha-3 (VI) chain).

3.2. Peptide and protein composition of the tilapia by-product hydrolysate

3.2.1. Peptide molecular weight distribution

We analyzed hydrolytic peptides from our tilapia by-product hydrolysate by OFFGEL-nLC-MALDI-TOF/TOF and nLC-ESI-MS/MS. We identified 697 unique peptides: 483 by OFFGEL-nLC-MALDI-TOF/TOF and 232 by nLC-ESI-MS/MS, with only 18 peptides in common to both analytical methods. Their molecular weight distribution, illustrated in Fig. 3, showed that 177 peptides (25.4%) had molecular weights below 1,000 Da, 470 peptides (67.4%) had molecular weights ranging between 1,000 and 2,000 Da, 49 peptides (7.0%) had molecular weights ranging between 2,000 and 3,000 Da and only 1 peptide had a molecular weight above 3,000 Da.

3.2.2. Protein precursors identified in the hydrolysate

We generated a list of peptides and associated protein precursors from mass spectrometry analyses. We validated each precursor manually based on the quality of transcriptomic sequences and on the number and the Mascots score of attached peptides. Thus, in some cases peptides were validated but their protein precursor was not, so such peptides were named orphan. We found 59 orphan peptides, *i.e.* 8.5% of the peptides we identified. Finally, we detected 130 transcripts from our hydrolysate and annotated 61% of them. We categorized transcripts according to protein classes defined by PANTHER to determine the number of protein precursors and the number of hydrolytic peptides in each protein class (Fig. 4). The best represented protein class was extracellular matrix proteins, with 51 transcripts. These transcripts corresponded to 28 proteins and generated 279 hydrolytic peptides, that is 43.7% of all hydrolytic peptides. Among the 28 proteins, 24 corresponded to collagen chains (Table 2) and represented 263 peptides (42.8%). We detected different types of collagens: several types (types I, II, V, XI, XXIV and XXVII) belonged to the fibril-forming collagen family. In addition, we detected type-IX and type-XII collagens that belong to the fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACIT) collagens. Finally, we also detected types IV, VIII and X collagens that belong to network-forming collagens. All these collagen types were predominantly expressed in the frame, except type II which was more expressed in head than in frame (Table 2). The FPKM of viscera collagens was very low (≤ 6.34).

The cytoskeletal protein class generated a large diversity of hydrolytic peptides (160, *i.e.* 25.1% of total identified peptides). These peptides were generated from 22 transcripts corresponding to 16 proteins (Table 3). Most of the cytoskeletal protein precursors were muscle proteins. We detected several forms of myosin: 5 transcripts corresponded to heavy chains and 3 to light chains. Heavy chains were mainly expressed in frame (FPKM: 9572.6) and to a lesser extent in head (FPKM: 2882.7). Light chain transcripts were also more expressed in frame ($449.8 \leq \text{FPKM} \leq 737.4$) than in head ($248.0 \leq \text{FPKM} \leq 507.0$). We found myosin light chains in the head and frame proteomes but we did not find any heavy chains. Three forms of actin were in our hydrolysate: 2 transcripts corresponding to alpha-actin and 1 transcript to beta-actin. Alpha-actin transcripts were highly expressed in frame ($3659.5 \leq \text{FPKM} \leq 5067.7$) and head ($2235.4 \leq \text{FPKM} \leq 2350.7$) but we only found them in the frame proteome. Beta-actin was highly expressed in frame (FPKM: 4012.7), viscera (FPKM: 1160.4) and head (FPKM: 5884.8) and was detected in the three proteomes. We also detected the following other muscle proteins: tropomyosin, troponin, titin and myomesin. Their expression level was lower than actin and myosin expression levels and their FPKM was consistently higher in frame than in head and viscera. Only tropomyosin was detected in the frame proteome and sur-

prisingly also in the viscera proteome (FPKM: 2.3). We also identified two actin-associated proteins: alpha-actinin and coronin-6-like. These two proteins had low expression levels in the three transcriptomes ($\text{FPKM} \leq 20$) and were not detected in the proteomes. Finally, we detected two forms of keratin: type-I K13 and type-II K8. These two proteins belong to the intermediate filament protein family. They were mainly expressed in frame ($1378.1 \leq \text{FPFM} \leq 4505.4$) and then in head ($1096.6 \leq \text{FPFM} \leq 2533.6$) and viscera ($235.7 \leq \text{FPFM} \leq 736.4$).

A high proportion (33%) of protein precursors corresponded to enzymes and generated 99 hydrolytic peptides, that is 15% of total identified peptides (Table 4). The most expressed enzymes were nucleoside diphosphate kinase and creatine kinase. Diphosphate kinase was mainly expressed in head (FPKM: 1916.1) and then in frame (FPKM: 1059.7) whereas creatine kinase was highly expressed in frame (FPKM: 2697.8) and then in head (FPKM: 1221.4). Both enzymes had FPKM values below 1.5 in viscera. However, they were both detected in all three proteomes. Among the 24 proteins we identified, 6 (25%) were glycolysis enzymes. The most expressed one was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with FPKM values of 452.2 in frame, 273.4 in viscera and 268.5 in head; it was also detected in the frame and viscera proteomes. Two enzymes, fructose biphosphate aldolase and beta-enolase were detected in all three proteomes. Fructose biphosphate aldolase was more expressed in frame (FPKM: 686.3) and head (FPKM: 308.6) than in viscera (FPKM: 1.28). Beta-enolase was also more expressed in frame (FPKM: 490.9) than in head (FPKM: 334.4) and viscera (96.7). Moreover, phosphoglycerate kinase, glucose-6-phosphate isomerase and pyruvate kinase were detected. Other enzymes were involved in various biological processes including fatty acid metabolism, protein degradation processes. Other protein classes were detected, *i.e.* transfer/carrier proteins (2 proteins and 15 hydrolytic peptides), a calcium-binding protein (1 protein, 34 hydrolytic peptides), ribonucleoproteins (2 proteins, 7 hydrolytic peptides), nucleic acid binding proteins (6 proteins, 13 hydrolytic peptides), cell adhesion proteins (2 proteins, 5 hydrolytic peptides) and an Immunity protein (1 protein, 2 hydrolytic peptides). Finally, 13 transcripts corresponding to non-annotated or unclassified proteins generated 24 hydrolytic peptides, that is 3.8% of the peptides we identified.

3.2.3. Localization of hydrolysate protein precursors in the by-products

One of the aims of this study was to determine the contribution of each by-product to the hydrolytic peptide diversity found in the hydrolysate. To investigate this point, we carried out an *in silico* study of the transcription levels of the protein precursors identified in hydrolysate in each transcriptome. Moreover, we also performed a comparison between the protein precursors we found in the hydrolysate and the proteins we identified in each proteome. *In silico* analysis of the transcription levels of pro-

tein precursors identified in the hydrolysate revealed that 12 frame transcripts, 11 head transcripts and only 1 viscera transcript had FPKM values above 1,000. Twenty-seven transcripts had FPKM values ranging between 100 and 1,000 in frame, 21 in head and 10 in viscera. These first results suggest that the protein precursors we identified from the hydrolysate mainly came from frame and head by-products. Indeed, among the 130 transcripts we detected, 60% were highly expressed in frame compared to other by-products and 35% were highly expressed in head.

3.3. Comparison of the by-product proteomes and the protein precursors of hydrolytic peptides

We conducted a comparative study between the by-product proteomes and the protein precursors that generated hydrolytic peptides. We detected a total of 23 proteins in common (Table 5). We identified 95 protein precursors in the hydrolysate, but only 24.2% of them were also found in the by-product proteomes. Among these 23 proteins, 13 proteins were in common with the head proteome, 12 proteins were in common with the viscera proteome and 19 were in common with the frame proteome. Thus, only 11.3% of head proteins, 11.7% of viscera proteins and 12.9 of frame proteins were found in the hydrolysate. Common proteins mainly belonged to the cytoskeletal protein class and to the enzyme class. Indeed, 10 cytoskeletal proteins were common to the hydrolysate and by-product proteomes that is keratins, myosins, actins, titin, tropomyosin and alpha-actinin. Moreover, 8 common proteins were enzymes: fructose-bisphosphate aldolase a, creatine kinase m-type-like, phosphoglycerate kinase 1, beta-enolase-like isoform 1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36-like, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like, nucleoside diphosphate kinase a-like, and pyruvate kinase pkm-like isoform x1. The remaining proteins were ceruloplasmin, an extracellular matrix protein, hemoglobin subunit alpha b and beta a, ubiquitin-40s ribosomal protein s27a, and parvalbumin.

4. Discussion

This study provides a first overview of the protein and peptide composition of a complex by-product hydrolysate. The peptidomics strategy previously developed to characterize hydrolytic peptides in hydrolysates [31] led to the identification of 697 peptides in our tilapia by-product hydrolysate. Although genomic data about tilapia (*O. niloticus*) were available in public databases, we focused on the identification of hydrolytic peptides from our homemade transcriptome databanks constructed by assembling Illumina sequencing data to assess the expression levels of protein precursors from each by-product. Thanks to the characterization of hydrolytic peptides, we identified 130 transcripts corresponding to 95 hydrolysate protein precursors, mainly belonging to the extra-cellular matrix, cytoskeletal and enzyme protein classes. This study highlights that a

major part of the diversity of identified peptides can be attributed to a relatively low number of protein precursors. Thus, collagen proteins generated 42.8% of the hydrolytic peptides, and cytoskeletal proteins (especially myofibrillar proteins) 25.1%. Moreover, enzymes were the third class of proteins which contributed to hydrolytic peptide composition, with 15% of total identified peptides. The richness in collagen-releasing peptides is supposed to be related to the high proline content of collagen chains [32] because proline-containing peptides are known to be relatively resistant to enzyme degradation [33]. These findings open very interesting perspectives about the potential applications of tilapia by-product hydrolysate. Collagens are a class of proteins with various applications. Non-denatured collagen forms insoluble fibers with a high tensile strength and right-handed triple super helical rods consisting of three polypeptide chains [32]. They have applications in the food, cosmetics, biomedical and pharmaceutical industries. Collagen is also used in its denatured form, *i.e.* gelatin. In that case, it corresponds to a soluble protein compound obtained by partial hydrolysis of collagen, especially in the food and pharmaceutical industries that use the gel-forming capacity and viscosity of collagen [34]. In addition, collagen hydrolysates arouse increasing interest since collagen- and gelatin-derived bioactive peptides have been identified with antimicrobial activity, immunomodulatory activity, mineral-binding capacity or beneficial effects on skin, bone or joint health [35–40]. Moreover, antioxidant and antihypertensive activities have also been associated to collagen-released peptides [41–44]. Finding collagen sources has been of increased interest in recent years and fish sources have already been investigated to replace traditional collagen sources (pig skin, bovine hide, pig and cattle bones) because sanitary crises such as the bovine spongiform encephalopathy (BSE) crisis or the foot-and-mouth disease (FMD) crisis were death blows to these industries [45]. In this study, we demonstrate that enzymatic hydrolysis is a powerful way to recover collagen-released peptides from the whole by-products of fish (head, viscera and skin). The second class of proteins accounting for hydrolytic peptide diversity in our hydrolysate was cytoskeletal proteins. Most of the protein precursors we identified corresponded to myofibrillar proteins, especially myosin and actin. Recent studies demonstrate *in vitro* activity of fish myofibrillar proteins hydrolysates, suggesting a relevant potential for this protein class in functional food. For example, a peptide with ACE-inhibitory activity was identified from a haruan myofibrillar protein hydrolysate [46]. More recently, three peptides, VPKNYFHDIV, LVMFLD-NQHRVIRH and FVNQPYLLYSVHMK isolated from a patin myofibrillar protein hydrolysate revealed antioxidant activity [47]. These results suggest that the major part of hydrolytic peptide diversity is supported by two main classes of proteins (collagens and myofibrillar proteins) that can both potentially release bioactive peptides. However, our study provides only qualitative data on protein precursors. Therefore further investigations about the rel-

ative abundance of peptides released by these protein precursors are an up-coming challenge to unravel the potential of by-product hydrolysate as functional food.

The second aim of this study was to investigate the correlation between by-product raw material composition and resulting hydrolysate composition. We developed a transcriptomics approach coupled to a proteomics approach to assess the protein composition of tilapia by-products. That way, in addition to the identification of 95 protein precursors in our hydrolysate, the proteomics study of each by-product allowed us to detect 116, 103 and 247 proteins in head, viscera and frame, respectively. A high number of frame and head proteins were similar to proteins identified in the sarcoplasmic proteome of several fish species by [48] or in skin proteome [49]. In addition, *in silico* analysis of protein precursor expression levels in our hydrolysate showed that most of the protein precursors were mainly expressed in frame and/or head tissues. Although collagen chains represent around 50% of fish skin protein content [50], we did not detect any of these proteins in the proteome. These results suggest that muscle and skin were two tissues that highly contributed to the protein composition of by-products and hydrolytic peptide diversity in our hydrolysate. These tissues are abundant in head and frame, suggesting that viscera contributed less to the hydrolytic peptide content of our hydrolysate. The comparison between the by-product proteomes and the protein precursors that generated hydrolytic peptides revealed a few proteins in common. On the one hand, less than 13% of proteins detected in the by-products were also detected in the hydrolysate, and on the other hand, only 25.3% of protein precursors of hydrolytic peptides were found in all three proteomes. These findings demonstrate that the correlation between by-product proteins and proteins generating hydrolytic peptides is far from being obvious. The difference between these two pools of proteins suggests that very few raw material proteins contributed to hydrolytic peptide diversity. Thus, a complete *in silico* approach to determine hydrolytic peptides from transcriptomics data or a proteomics approach associated to *in silico* digestion to determine hydrolytic peptides from detected proteins cannot be used to accurately describe the protein composition of a hydrolysate. This difference can be partly explained by total hydrolysis of one part of the proteins and/or too low concentrations to detect released peptides in our experimental design. But the different experimental treatments are probably the main cause for this hurdle. Although we used two extraction protocols, the pools of detected proteins did not match with hydrolysate protein precursors, probably due to particular processing conditions of enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis process consists of a first pre-treatment step when by-products are homogenized in water, followed by a hydrolysis step when the mix is heated to 50°C and the enzyme cocktail is added, and then a last step when enzymes are inactivated by increasing the temperature to 80°C [51]. There is no pH regulation. Thus, the enzy-

matic hydrolysis process could lead to the hydrolysis of insoluble proteins into soluble peptides likely to be recovered that way. For example, this is probably what occurred with collagen. Collagen extraction yield by traditional processes is low [52] but addition of pepsin cleaves the telopeptide region of collagen and can significantly improve collagen extraction [53–55]. Conversely, proteomics studies use standardized protocols. Protein extractions are performed in a controlled environment, the pH is regulated and endogenous enzymes are inhibited. Moreover, a single enzyme, trypsin, generates peptides further analyzed by mass spectrometry. By contrast, enzymatic hydrolysis to produce hydrolysates on an industrial scale is complex. It involves adding exogenous enzymes such as Protamex enzymes used in this study but also all the endogenous enzymes, such as exopeptidases and endoproteases naturally present in tissues. The large number of enzymes really involved in enzymatic hydrolysis makes the prediction of hydrolytic peptide composition by *in silico* digestion very complex. These findings lead us to reconsider the use of *in silico* approaches to characterize food-releasing peptides after enzymatic digestion.

5. Conclusion

One could have thought that it was possible to use the data provided by *in silico* digestion from transcriptomics data or from proteomics analysis to predict the generation of hydrolytic peptides. But through a comparative approach, we presently show for the first time that such is not the case. The gap we observed between proteomes and the pools of proteins that generate hydrolytic peptides is probably related to variation in extraction and hydrolysis conditions. In the by-product hydrolysate, enzymatic hydrolysis is performed by a very complex enzyme cocktail without prior extraction. It probably generates soluble hydrolytic peptides from insoluble proteins that are not detected by a classical proteomics approach. Thus, we demonstrate that the profile of hydrolytic peptides remains to be determined by a peptidomics approach whose efficiency is based on the availability of a large transcriptomics dataset. Otherwise, we demonstrate that the major part of hydrolytic peptides is composed of collagens (42.8%), cytoskeletal proteins (25.1%) and enzymes (15%). These proteins are mainly found in muscle and skin tissues and therefore probably originate from head and frame. Finally, the peptides of the hydrolysate co-products are cleaved from a relatively small number of proteins. Considering the categories of proteins involved in the production of hydrolytic peptides, these new experimental data can provide substantial help to select the most interesting by-products and reach the growth performances or physiological functionalities needed in shrimp- and fish-farming.

References

- [1] Janet Carrasco-Castilla, Alan Javier Hernandez-Alvarez, Cristian Jiménez-Martínez, Gustavo Fidel Gutiérrez-López, and Gloria Dávila-Ortiz. Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4) :224–243, 2012.
- [2] Roberta Di Bernardini, Pádraigín Harnedy, Declan Bolton, Joseph Kerry, Eileen O'Neill, Anne Maria Mullen, and Maria Hayes. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4) :1296–1307, February 2011.
- [3] L. Saavedra, E. M. Hebert, C. Minahk, and P. Ferranti. An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Research International*, 54(1) :925–934, November 2013.
- [4] Evelien Dekkers, Sivakumar Raghavan, Hordur G. Kristinsson, and Maurice R. Marshall. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food chemistry*, 124(2) :640–645, 2011.
- [5] Fabienne Guérard, Nicolas Decourcelle, Claire Sabourin, Corinne Flöch-Laizet, Laurent Le Grel, Pascal Le Floc'h, Florence Gourlay, Ronan Le Delezir, Pascal Jaouen, Patrick Bourreau, and others. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications : a review. *Journal des sciences Halieutique et Aquatique*, 2 :21–27, 2010.
- [6] Pádraigín A. Harnedy and Richard J. Fitzgerald. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish : A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1) :6–24, January 2012.
- [7] Eresha Mendis, Niranjan Rajapakse, and Se-Kwon Kim. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3) :581–587, 2005.
- [8] Hee-Guk Byun and Se-Kwon Kim. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36(12) :1155–1162, 2001.
- [9] Jae-Young Je, Pyo-Jam Park, and Se-Kwon Kim. Antioxidant activity of a peptide isolated from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38(1) :45–50, January 2005.
- [10] Arsyad Fahmi, Shigeru Morimura, Hong-Cheng Guo, Toru Shigematsu, Kenji Kida, and Yasuko Uemura. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10) :1195–1200, 2004.
- [11] Ines Jemil, Mourad Jridi, Rim Nasri, Naourez Ktari, Rabeb Ben Slama-Ben Salem, Mohamed Mehiri, Mohamed Hajji, and Moncef Nasri. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* a26. *Process Biochemistry*, 49(6) :963–972, June 2014.
- [12] B. Cudennec, R. Ravallec-Plé, E. Courois, and M. Fouchereau-Peron. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111(4) :970–975, 2008.
- [13] Shabeena Yousuf Naqash and R. A. Nazeer. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of bioactive peptide isolated from nemipterus japonicus backbone. *International Journal of Food Properties*, 15(6) :1200–1211, 2012.
- [14] Niranjan Rajapakse, Won-Kyo Jung, Eresha Mendis, Sung-Hoon Moon, and Se-Kwon Kim. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysates inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22) :2607–2619, 2005.
- [15] Jian-Zhong Han and Yan-Bo Wang. Proteomics : present and future in food science and technology. *Trends in food science & technology*, 19(1) :26–30, 2008.
- [16] Martin Kussmann and Peter J. Van Bladeren. The extended nutrigenomics—understanding the interplay between the genomes of food, gut microbes, and human host. *Frontiers in genetics*, 2, 2011.
- [17] Alexandre Panchaud, Michael Affolter, and Martin Kussmann. Mass spectrometry for nutritional peptidomics : How to analyze food bioactives and their health effects. *Journal of Proteomics*, 75(12) :3546–3559, June 2012.
- [18] J. Dziuba, P. Minkiewicz, D. Nalecz, and A. Iwaniak. Database of biologically active peptide sequences. *Food/Nahrung*, 43(3) :190–195, 1999.
- [19] Piotr Minkiewicz, Jerzy Dziuba, Małgorzata Darewicz, Anna Iwanicka, Marta Dziuba, and Dorota Nalecz. Food peptidomics. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1) :1–10, 2008.
- [20] Lei Shi, Qipeng Zhang, Wei Rui, Ming Lu, Xia Jing, Tong Shang, and Jian Tang. BioPD : a web-based information center for bioactive peptides. *Regulatory Peptides*, 120(1–3) :1–3, August 2004.
- [21] Yuchen Gu, Kaustav Majumder, and Jianping Wu. QSAR-aided in silico approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides. *Food Research International*, 44(8) :2465–2474, October 2011.
- [22] Isabelle ME Lacroix and Eunice CY Li-Chan. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an *in silico* approach. *Journal of Functional Foods*, 4(2) :403–422, 2012.
- [23] Chibuike C. Udenigwe, Min Gong, and Sihong Wu. In silico analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochemistry*, 48(11) :1794–1799, 2013.
- [24] Chibuike C. Udenigwe. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2) :137–143, April 2014.
- [25] S. Clement and R. T. Lovell. Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 119(2) :299–310, 1994.
- [26] Anthony M Bolger, Marc Lohse, and Bjoern Usadel. Trimmomatic : a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, page btu170, 2014.
- [27] Manfred G. Grabherr, Brian J. Haas, Moran Yassour, Joshua Z. Levin, Dawn A. Thompson, Ido Amit, Xian Adiconis, Lin Fan, Rakimma Raychowdhury, and Qiandong Zeng. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7) :644–652, 2011.
- [28] Ben Langmead, Cole Trapnell, Mihai Pop, and Steven L. Salzberg. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*, 10(3) :R25, 2009.
- [29] Bo Li and Colin N Dewey. RSEM : accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12 :323, 2011.
- [30] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1) :248–254, 1976.
- [31] Marie Robert, Céline Zatylny-Gaudin, Vincent Fournier, Erwan Corre, Gildas Le Corguillé, Benoît Bernay, and Joël Henry. Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*). *Journal of biotechnology*, 186 :30–37, 2014.
- [32] Kolja Gelse, E. Pöschl, and T. Aigner. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12) :1531–1546, 2003.
- [33] Damian F. Cunningham and Brendan O'Connor. Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343(2) :160–186, 1997.
- [34] M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, ME al López-Caballero, and M. P. Montero. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources : A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8) :1813–1827, 2011.
- [35] Gómez Guillén, M. E. López Caballero, A. Alemán, Antonio López de Lacey, B. Giménez, Pilar Montero García, and others. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. 2010.
- [36] Hu Hou, Bafang Li, Xue Zhao, Yongliang Zhuang, Guoyan Ren, Mengyan Yan, Yangpeng Cai, Xiukun Zhang, and Li Chen. The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food chemistry*, 115(3) :945–950, 2009.
- [37] Won-Kyo Jung, Rohan Karawita, Soo-Jin Heo, Bae-Jin Lee, Se-Kwon Kim, and You-Jin Jeon. Recovery of a novel ca-binding peptide from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41(9) :2097–2100, 2006.
- [38] Won-Kyo Jung, Pyo-Jam Park, Hee-Guk Byun, Sung-Hoon Moon, and Se-Kwon Kim. Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2) :333 – 340, 2005.
- [39] Roland W. Moskowitz. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. In *Seminars in arthritis and rheumatism*, volume 30, pages 87–99. Elsevier, 2000.
- [40] Youzhuo Zhang, Tomomi Kouguchi, Kazuo Shimizu, Mikako Sato, Yoshihisa Takahata, and Fumiaki Morimatsu. Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6-KOR-ApoEshl mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3) :208–210, 2010.
- [41] Se-Kwon Kim and Eresha Mendis. Bioactive compounds from marine processing byproducts—a review. *Food Research International*, 39(4) :383–393, 2006.
- [42] Zhongrui Li, Bin Wang, Changfeng Chi, Yandan Gong, Hongyu Luo, and Guofang Ding. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akajei* and *Raja porosa*. *Food Research International*, 51(1) :283–293, 2013.
- [43] Lin Lin, Shun Lv, and Bafang Li. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*, 131(1) :225–230, 2012.
- [44] A. Aleman, M. C. Gómez-Guillén, and P. Montero. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 54(1) :790–795, 2013.
- [45] Anguchamy Veeruraj, Muthuvvel Arumugam, and Thangavel Balasubramanian. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48(10) :1592–1602, 2013.
- [46] Masomeh Ghassem, Keizo Arihara, Abdul Salam Babji, Mamot Said, and Saadiah Ibrahim. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS. *Food chemistry*, 129(4) :1770–1777, 2011.

- [47] Leila Najafian and Abdul Salam Babji. Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 2014.
- [48] Mónica Carrera, Benito Cañas, and José M. Gallardo. The sarcoplasmic fish proteome : Pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences. *Journal of proteomics*, 78 :211–220, 2013.
- [49] Binoy Rajan, Jorge M. O. Fernandes, Christopher M. A. Caipang, Viswanath Kiron, Jan H. W. M. Rombout, and Monica F. Brinchmann. Proteome reference map of the skin mucus of atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(2) :224–231, August 2011.
- [50] T. Nagai and N. Suzuki. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3) :277–281, 2000.
- [51] Takeshi Nagai, Eiji Yamashita, Kei Taniguchi, Norio Kanamori, and Nobutaka Suzuki. Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*, 72(4) :425–429, 2001.
- [52] Takeshi Nagai and Nobutaka Suzuki. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus(*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. *Food Chemistry*, 76(2) :149–153, 2002.
- [53] Shan He, Chris Franco, and Wei Zhang. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1) :289–297, January 2013.
- [54] Sitthipong Nalinanon, Soottawat Benjakul, Wonnop Visessanguan, and Hideki Kishimura. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2) :593–601, 2007.
- [55] A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, and M. Tanaka. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3) :475–484, 2005.

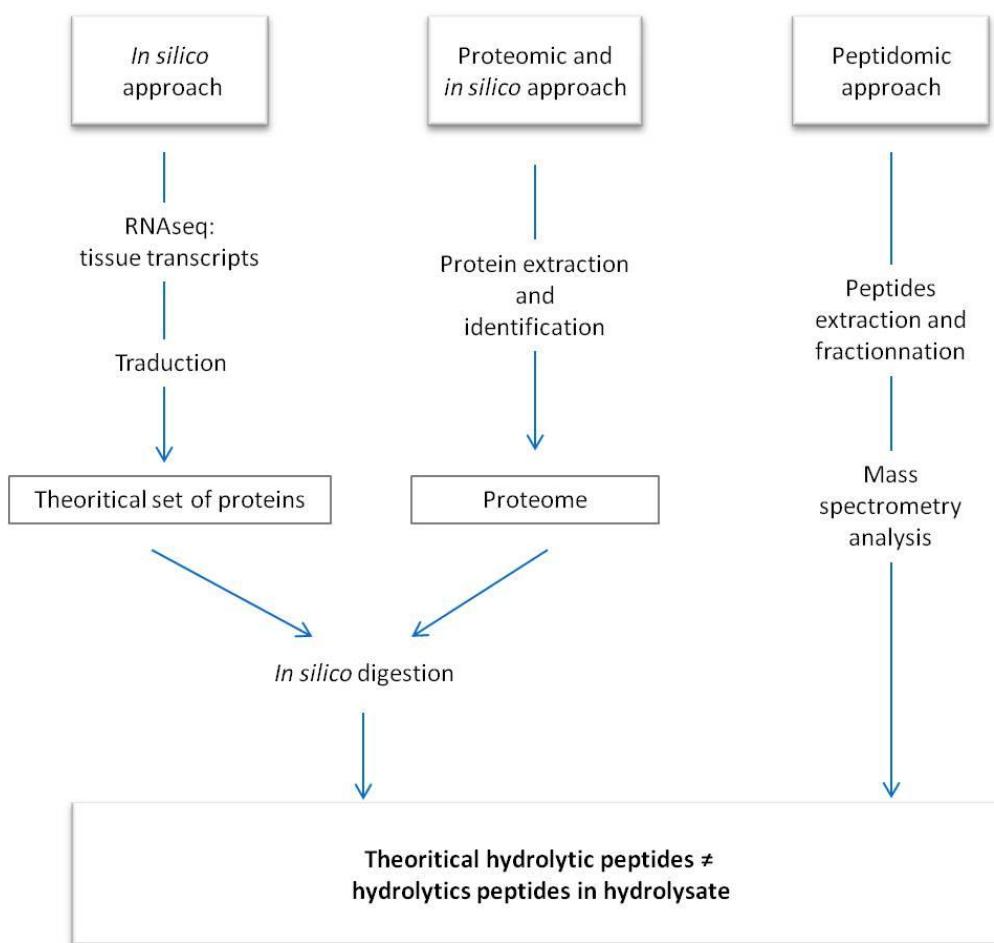


Figure 1: Multi-omics approaches developed to study hydrolytic peptides derived from food products.

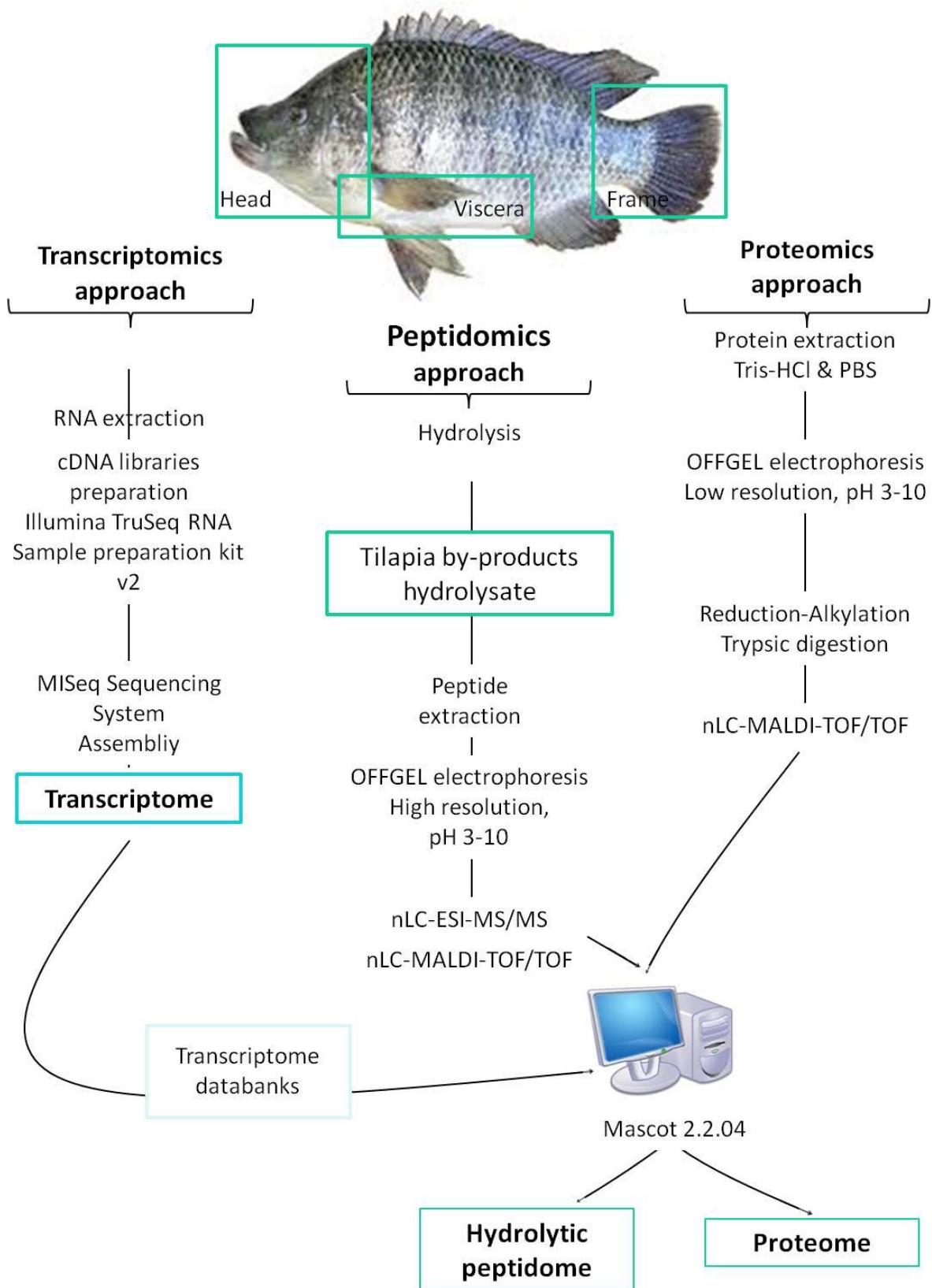


Figure 2: Experimental design aimed at comparing the protein precursors of the hydrolytic peptides from a by-product hydrolysate with the proteome identified *via* a proteomics approach.

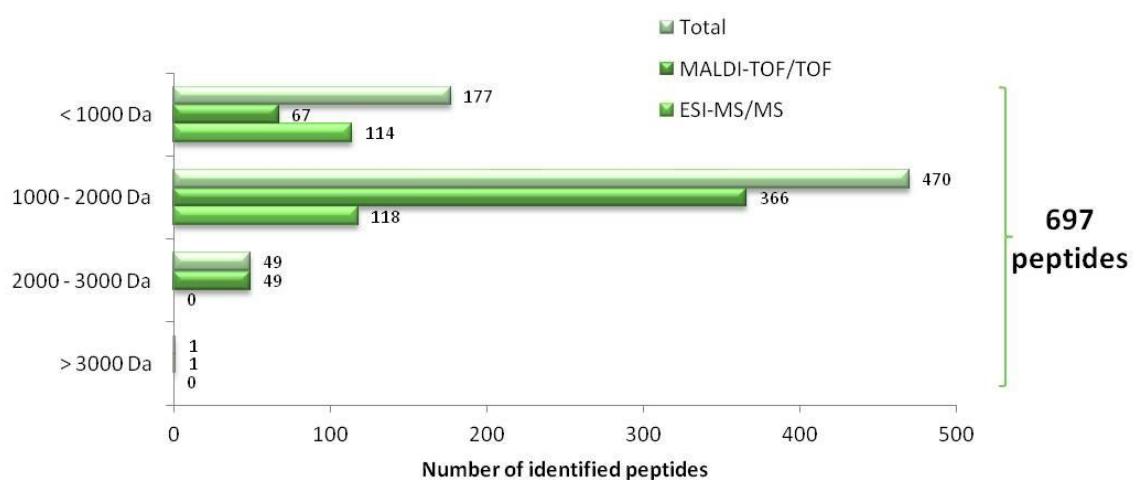


Figure 3: Molecular weight distribution of the peptides identified by OFFGEL-nLC-MALDI-TOF/TOF and nLC-ESI-MS/MS in our tilapia by-product hydrolysate

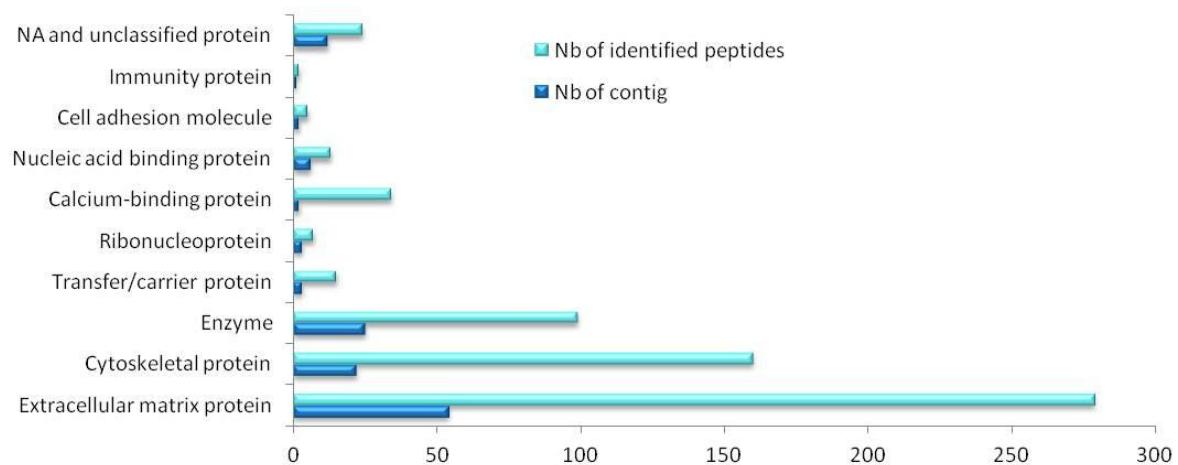


Figure 4: Protein precursors of the peptides identified in our tilapia by-product hydrolysate: distribution of contigs and identified peptides according to 10 protein classes.

Table 1: Overview of sequencing, assembly and annotation

Organs	No of reads	No of cleaned read	No of sequences	Average sequence length
Head	5,856,894	5,620,463	76,324	1,634.31
Viscera	6,372,502	6,189,986	57,952	1,612.15
Frame	10,423,347	10,292,539	93,672	1,375.14

Table 2: Collagen proteins detected in our tilapia by-product hydrolysate

Collagens	No. of transcripts	Proteome detection	FPKM Head	Viscera	Frame
collagen alpha-1 (I) chain-like	10	(--)	39,58	0,91	94,69
collagen alpha-2 (I) chain-like	7	(--)	253,95	6,34	635,66
collagen alpha-1 (II) chain	2	(--)	23,14	0	7,23
collagen alpha-1 (IV) chain-partial	1	(--)	0	0	5,61
collagen alpha-2 (IV) chain	2	(--)	28,16	5,51	43,14
collagen alpha-4 (IV) chain-like	1	(--)	9,02	0	0,14
collagen alpha-5 (IV) chain-like	4	(--)	38,58	1,47	17,57
collagen alpha-6 (IV) chain-like	1	(--)	3,25	0,1	1,92
collagen alpha-2 (V) chain-like	3	(--)	25,7	2,36	78,29
collagen alpha-1 (VIII) chain-like	1	(--)	5,57	0,09	3,66
collagen alpha-2 (VIII) chain-like	1	(--)	6,99	0,33	4,89
collagen alpha-1 (IX) chain	1	(--)	0,96	0,24	3,93
collagen alpha-2 (IX) chain-like	1	(--)	4,18	(--)	1,69
collagen alpha-3 (IX) chain-like	1	(--)	3,47	0,62	1,56
collagen alpha-1 (X) chain-like	1	(--)	64,67	0,1	521,35
collagen alpha-1 (XI) chain-like	4	(--)	13,03	0,94	30,67
collagen alpha-1 (XXIV) chain	2	(--)	2,22	0,93	4,49
collagen alpha-1 (XXVII) chain-like	2	(--)	4,01	0,9	8,03
collagen (undefined chain)	6	(--)	375,66	1,12	551,54

Table 3: Cytoskeletal proteins detected in our tilapia by-product hydrolysate

Cytoskeletal proteins	No. of transcripts	Proteome detection	Head	FPKM Viscera	FPKM Frame
myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like	5	(--)	2882,69	4,09	9572,56
myosin light chain 2	1	Frame, head	296,48	0,42	499,95
myosin light chain 1	1	Frame, head	248	(--)	449,81
myosin light chain skeletal muscle isoform-like	1	Frame, head	507,02	(--)	737,36
alpha cardiac muscle 1-like	1	(--)	2235,54	(--)	3659,49
beta-actin	1	Frame, head , viscera	5884,77	1160,39	4012,73
alpha skeletal muscle	1	Frame	2350,72	1,8	5067,71
tropomyosin alpha-1 chain isoform x1	1	Frame, viscera	146,45	2,26	264,32
troponin cardiac muscle isoforms-like	1	(--)	157,18	0	188,38
titin (<i>Oreochromis niloticus</i>)	2	Frame, head	11,58	0,08	52,07
myomesin-2-like	1	(--)	28,25	0,33	53,86
keratin type i cytoskeletal 13-like	1	Frame, viscera	1096,56	235,74	1378,05
keratin type ii cytoskeletal 8-like	2	Frame, head, viscera	2533,54	736,35	4505,39
alpha-actinin-3-like isoform x3	1	(--)	14,23	(--)	32,03
alpha-actinin-4-like isoform x2	1	(--)	10,16	2,05	15,92
coronin-6-like isoform x1	1	(--)	1,9	(--)	2,35

Table 4: Enzymes detected in our tilapia by-product hydrolysate

Enzymes	No. of transcripts	Proteome detection	Head	FPKM Viscera	Frame
nucleoside diphosphate kinase a-like	1	Frame, head, viscera	1916,13	1,21	1059,71
fructose-bisphosphate aldolase a	1	Frame, head, viscera	308,6	1,28	686,26
creatine kinase m-type-like	2	Frame, head, viscera	1221,38	1,86	2697,78
phosphoglycerate kinase 1	1	Frame	307,28	119,27	278,61
tryptase-2-like	1	(--)	13,55	4,23	13,39
beta-enolase-like isoform 1	1	Frame, head, viscera	334,42	96,69	490,90
glucose-6-phosphate isomerase-like	1	(--)	62,76	0,24	87,82
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	1	Frame, viscera	268,47	273,41	452,23
glycogen phosphorylase, muscle form	1	(--)	101,11	0,53	214,47
pyruvate kinase pkm-like isoform x1	1	(--)	193,12	23,08	91,52
probable e3 ubiquitin-protein ligase trim8-like	1	(--)	9,74	8,53	8,71
DNA topoisomerase 2-beta-like isoform x1	1	(--)	18,23	5,19	10,25
phosphatidylinositol-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase pten-like isoform x1	1	(--)	7,75	4,4	3,67
2-acylglycerol o-acyltransferase 2-a-like	1	(--)	3,07	9,03	4,55
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36-like	1	(--)	2,07	2,02	1,82
fatty-acid amide hydrolase 2-a-like	1	(--)	5,57	14,08	2,89
u5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kda helicase	1	(--)	36,33	20,79	35,64
chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7-like	1	(--)	2,44	1,05	1,09
histone acetyltransferase p300-like isoform x3	1	(--)	3,5	1,57	2,40
ATP synthase subunit mitochondrial isoform x1	1	(--)	0,39	0,17	64,86
double-stranded rna-specific adenosine deaminase-like isoform x1	1	(--)	2,78	1,24	2,27
mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim23-like	1	(--)	0	0	5,13
dexamethasone-induced ras-related protein 1-like	1	(--)	2,34	1,52	2,28
tumor susceptibility gene 101 protein isoform x1	1	(--)	3,11	1,58	2,36

Table 5: Proteins in common to by-product proteins and protein precursors of hydrolytic peptides

Protein	Transcript	By-product
Matrix extracellular protein		
ceruloplasmin-like	comp39756_c0_seq1	Frame
Cytoskeletal proteins		
Keratin type i cytoskeletal-13 like	comp15096_c1_seq1	Viscera
Keratin type ii cytoskeletal-8 like	comp15348_c0_seq1 comp35405_c0_seq2	Head, frame, viscera
myosin light chain 1	comp44580_c0_seq1	Head, frame
myosin light chain 2	comp35755_c0_seq2	Head, frame
myosin light chain 3	comp46885_c1_seq1	Head, frame
beta-actin	comp36215_c1_seq1	Head, frame, viscera
Predicted : titin (oreochromis niloticus)	comp42003_c1_seq1	Frame
tropomyosin alpha-1 chain isoform x1	comp43587_c0_seq6	Head, frame, viscera
Actin alpha skeletal muscle	comp46837_c0_seq1	Frame
alpha-actinin-4-like isoform x2	comp42756_c0_seq27	Viscera
Enzymes		
fructose-bisphosphate aldolase a	comp15810_c1_seq1	Head, frame, viscera
creatine kinase m-type-like	comp18802_c0_seq1 comp18802_c0_seq2	Head, frame, viscera
phosphoglycerate kinase 1	comp19223_c0_seq1	Frame
beta-enolase-like isoform 1	comp31387_c0_seq1	Head, frame, viscera
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36-like	comp42499_c0_seq2	Frame
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	comp41318_c0_seq2	Frame, viscera
nucleoside diphosphate kinase a-like	comp46871_c0_seq1	Head, frame, viscera
pyruvate kinase pkm-like isoform x1	comp37949_c0_seq1	Frame
Transfer/carrier proteins		
hemoglobin subunit beta-a-like	comp41510_c1_seq1 comp41510_c1_seq3	Head, frame, viscera
hemoglobin subunit alpha-b-like	comp15132_c1_seq1	Head
Ribunucleoproteins		
ubiquitin-40s ribosomal protein s27a	comp46833_c0_seq1 comp14822_c0_seq1	Viscera
Ca-binding proteins		
parvalbumin beta-like	comp46916_c0_seq1 comp15149_c0_seq1	Head, frame

6 Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans cette première partie a permis de comparer structuralement les hydrolysats de co-produits de crevette et de tilapia.

La mesure du degré d'hydrolyse ainsi que le profil de masse moléculaire établi en HPLC sur colonne d'exclusion stérique mettent en évidence la différence de composition des deux hydrolysats. L'hydrolysat de crevette a un degré d'hydrolyse élevé (59.6%) et est riche en acides aminés libres et en di/tri-peptides (41.9% des composés ont une masse moléculaire apparente inférieure à 500 Da). A l'inverse, l'hydrolysat de tilapia a un degré d'hydrolyse plus faible (22.1%) et est majoritairement composé de peptides de masse moléculaire comprise entre 1000 et 5000 Da (59.3%). Ce travail de thèse propose une stratégie performante pour la caractérisation à grande échelle des peptides hydrolytiques composant un hydrolysat.

Une seconde approche expérimentale combinant l'obtention de données transcriptomiques ciblées et l'optimisation de la préparation des échantillons en amont des analyses en spectrométrie de masse a été développée et a permis une caractérisation pointue de la fraction peptidique. Ainsi, grâce à l'ensemble des données génomiques disponibles, 808 et 1374 peptides ont pu être identifiés respectivement dans l'hydrolysat de crevette et dans celui de tilapia. La caractérisation d'hydrolysats, en particulier issus de co-produits, est un défi technique car il s'agit de matrices très complexes associant peptides, acides aminés libres, oligonucléotides, sucres et bien d'autres molécules. De plus, les peptides hydrolytiques sont présents sous des formes plus ou moins tronquées possédant des caractéristiques physico-chimiques proches, les rendant donc difficiles à séparer. Cette approche permet d'identifier les familles de protéines qui sont à l'origine des peptides hydrolytiques. Ainsi, l'hydrolysat de crevette se compose majoritairement de peptides issus des hémocyanines, des protéines cuticulaires et des enzymes digestives. L'hydrolysat de tilapia, quant à lui, contient des peptides issus des collagènes, 1 des protéines du cytosquelette et des enzymes en majorité.

Par ailleurs, nous avons souhaité explorer une stratégie alternative à l'approche peptidomique développée pour la caractérisation des hydrolysats. Cette stratégie repose sur la détermination du protéome des co-produits suivie d'une digestion *in silico* afin de prédire une composition théorique en peptidiques hydrolytiques. Cette étude a été réalisée sur les co-produits de tilapia et met en évidence un faible recouvrement entre le protéome des coproduits (avant hydrolyse) et les protéines à l'origine des peptides hydrolytiques. Les résultats obtenus démontrent que cette stratégie ne peut s'appliquer à des hydrolysats aussi complexes. L'approche peptidomique reste donc incontournable pour déterminer la composition peptidique

des hydrolysats de co-produits. Des paramètres tels que la solubilisation des protéines ou la résistance des peptides hydrolytiques aux exopeptidases lors du process d'hydrolyse sont peu prédictibles et influent probablement beaucoup sur la composition finale en peptides hydrolytiques et acides aminés libres. L'activité antibactérienne de ces deux hydrolysats a de plus été mesurée *in vitro* sur deux bactéries Gram - pathogènes pour les poissons, *Y. ruckeri* et *E. tarda* ainsi qu'une bactérie Gram +, *B. megaterium*. Les résultats obtenus montrent que les extraits peptidiques bruts ainsi que certaines fractions issues d'une première étape de séparation en rp-HPLC possèdent une activité antibactérienne. Néanmoins, les étapes de purification ultérieures mènent systématiquement à la perte de l'activité biologique ce qui tend à démontrer que l'activité antibactérienne résulte de plusieurs peptides agissant en synergie qui n'ont pas pu être identifiés.

Cette première partie a permis la caractérisation structurale des deux hydrolysats et met en avant des différences tant au point de vue de la répartition massique des peptides hydrolytiques que de leurs précurseurs protéiques. L'influence de ces paramètres sur les performances *in vivo* des hydrolysats chez le bar commun fait l'objet de la seconde partie de ce travail.

Quatrième partie

Caractérisation fonctionnelle des hydrolysats chez le bar commun

Dicentrarchus labrax

1 Introduction

La nutrition est un domaine clé pour l'aquaculture, et plus particulièrement pour l'aquaculture intensive. Ce type d'élevage dépend en effet intégralement d'une alimentation exogène qui représente par conséquent une part élevée des charges d'exploitation, pouvant atteindre 60% (Kaushik, 2009). Cette activité soumise à de fortes contraintes, aussi bien économiques qu'environnementales doit disposer d'aliments performants. L'aliment doit ainsi être adapté aux besoins nutritionnels de l'espèce tout en répondant à un certain nombre de contraintes : coût et disponibilité des matières premières, procédé de fabrication, impact faible sur l'environnement...

Comme il a été décrit dans l'introduction générale, les aliments sont aujourd'hui composés principalement de protéines d'origine végétale. Ces matières premières, moins bien adaptées aux besoins nutritionnels des poissons, ont toutefois une plus grande disponibilité et un prix plus faible. Elles ont ainsi été substituées progressivement aux farines de poisson utilisées traditionnellement.

La recherche et les progrès technologiques ont permis d'améliorer les procédés de fabrication et ainsi les qualités nutritionnelles des farines d'origine végétale (Médale et Kaushik, 2009). Par conséquent, de bonnes performances de croissance sont aujourd'hui obtenues pour des taux élevés d'incorporation (80% à 100%). L'introduction des hydrolysats protéiques en faible proportion est intéressante car elle permet d'améliorer les qualités nutritionnelles des aliments à haute teneur en protéines végétales ce qui se traduit par un impact positif sur la croissance. De nombreuses études sur les effets de l'inclusion de tels hydrolysats dans l'alimentation des poissons d'élevage sont menées. Ainsi si certains auteurs constatent une amélioration de la croissance chez certaines espèces pour des taux de substitution de la farine de poisson compris entre 5 et 25 % (Aksnes *et al.*, 2006; Srichanun *et al.*, 2014; Refstie *et al.*, 2004), d'autres ne rapportent pas de tels effets (Savoie *et al.*, 2006). Aujourd'hui, peu de connaissances sont disponibles sur l'impact physiologique des hydrolysats. Néanmoins, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cet effet. Certains auteurs l'attribuent à une augmentation de la prise alimentaire grâce à une augmentation de l'appétence (Refstie *et al.*, 2004) et/ou à une augmentation de l'efficacité alimentaire, c'est-à-dire une augmentation du gain de poids pour une même quantité d'aliment ingéré (Aksnes *et al.*, 2006).

Chez les poissons, la majorité des nutriments absorbés est utilisée dans l'accrétion musculaire (Mommsen, 2001). De plus, les muscles représentent 40 à 60% de la masse d'un poisson selon les espèces, suggérant ainsi une corrélation directe entre les protéines absorbées par l'alimentation et la croissance de l'animal (Verri *et al.*, 2011). On peut alors supposer que le gain de croissance

apporté par les hydrolysats provient de l'augmentation de la quantité de protéines absorbées. L'assimilation des protéines d'origine alimentaire par l'organisme résulte de deux étapes fondamentales : l'étape de digestion ou protéolyse mise en œuvre par des protéases et des peptidases stomachales, pancréatiques et intestinales puis l'étape d'absorption des produits de dégradation des protéines par les entérocytes. Ces produits de dégradation, les di/tri-peptides et les acides aminés libres, sont absorbés dans l'intestin grâce à un ensemble de transporteurs présents dans les membranes apicales et basolatérales des entérocytes. Ces deux phénomènes peuvent être modulés par l'alimentation et ainsi déterminer l'efficacité alimentaire d'un aliment.

Les hydrolysats sont composés de peptides hydrolytiques et d'acides aminés libres. Ils sont ainsi plus riches en produits directement assimilables par les entérocytes que les farines de poisson ou les farines d'origine végétale. C'est pourquoi, l'étude de l'impact de l'ingestion des hydrolysats sur les transporteurs de di/tri-peptides et d'acides aminés libres est particulièrement intéressante pour améliorer la compréhension de l'impact des hydrolysats sur la croissance. Parmi ces transporteurs, l'un des plus étudié chez les poissons est le transporteur de di/tri peptides, PepT1.

Ce transporteur appartient à la famille des Proton Oligopeptide Cotransporters et est composé de 12 domaines transmembranaires (Fig 2B). Il forme une structure pore-like associée à une poche dans laquelle le substrat se lie (Rubio-Aliaga et Daniel, 2002). La séquence de ce transporteur est connue chez de nombreuses espèces dont le bar commun (Fig 2A). Ce transporteur a une faible affinité mais une forte capacité, il est ainsi capable de transporter tous les di-peptides et tri-peptides ainsi que d'autres composés comme les β -lactams (Ganapathy *et al.*, 1995). De plus, il est aujourd'hui bien démontré que l'absorption des produits issus de la protéolyse sous la forme de di/tri peptides est plus rapide et moins coûteuse en énergie que sous la forme d'acides aminés libres (Daniel, 2004). De par ces caractéristiques, PepT1 est un marqueur potentiel de la qualité nutritionnelle d'un aliment, notamment chez les poissons où son niveau d'expression dans l'intestin semble directement lié à la croissance (Verri *et al.*, 2011). Néanmoins, l'absorption des acides aminés libres est également une part importante de l'absorption des protéines. Les systèmes de transport d'acides aminés sont peu connus chez les poissons, mais on suppose qu'ils sont similaires aux transporteurs des mammifères décrits dans le chapitre 5 de l'introduction générale. Ainsi, il existe plusieurs familles de transporteurs ayant des substrats spécifiques : acides aminés neutres, basiques ou acides. L'étude de la régulation de leur expression en fonction de l'alimentation, associée à celle de PepT1, pourrait permettre d'expliquer les différences d'efficacité alimentaire des aliments et constituer un indicateur intéressant pour évaluer les performances d'un aliment en terme de croissance. Néanmoins, les études dans ce domaine sont limitées par la faible quantité de données génomiques disponibles. Chez le bar commun, une banque d'ESTs disponible sur SIGEN@E (<http://www.sigenae.org/>) a toutefois permis cependant la sélection de deux séquences partielles d'ARNm codant pour deux transporteurs d'acides aminés libres intestinaux. Il s'agit du transporteur de la taurine et d'un

A

>gi|212381177|gb|ACI49693.2| peptide transporter [Dicentrarchus labrax]

MADGKKSKSATA**DT 1**CGYPISIFFIVVNEFCERFSYGMRAVLVLYFKYFLRWDDD**DT 2**FATTIYHTFVA
DT 3
LCYLTPILGAIVADSWLGKFKTIVYLSIVYTLGQIVMAISAIHDITDSNKDGIPDNMTFH**VALS**
DT 4
MVGLLILIALGTGGIKPCVAAFGGDQFEDHQEKQRSTFF**DT 5**SIFYLSINAGSLLSTVITPILRA**QEC**
DT 6
GIHTQQKCYPL**AFGVPAALMVVAL**IVFIVGSGMYNKTAPQGNIVQVCKCIGFAIKNRFRHRAR
DT 7
EHPCRTHWMDWAEEKYDKLLIAQVKM**VLKVLFLYIPLPMFWALE**DQQGSRWTLQATTMDGDFGA
DT 8
LIIQPDQM**QTVPNIPILILVLVPIMDSLVYPLI**SKCKLNFSPLKR**DT 9**MTVGMFLAALAFIAALVQIQ
IDQTLPKFPSSTVGQAKFINMVNRALNINAGPNSFTLESYKANEYFNNGPFKLNLGSGNAFL
GNIPAGTRATIVIIDQGTKPRPTQFRDIKSKEQGTNAIRFLNGFGSVLNATVGTLEFGNTITN
NMSEYISVPQGNAQFHIRDNSGQECVYTQKLGFSSYTLIIPPTFAFGPNCESIQPVVVDIKPT
DT 10
TIHMAWQ**IPQYFLITAGEVVFSVTGLEFSY**SQAPS NMKSVLQ**DT 11**AGWLLTVAVGNIIIVLIVAEAAT
DT 12
LPDQWA**EYIILFASLLILVCIIIFAVMAYF**TYLDPAKIEAEFAHEEPEDEKRKSLEMAKKDSVE
HHKEDRRSSDSSSDEEETKQTKI

B

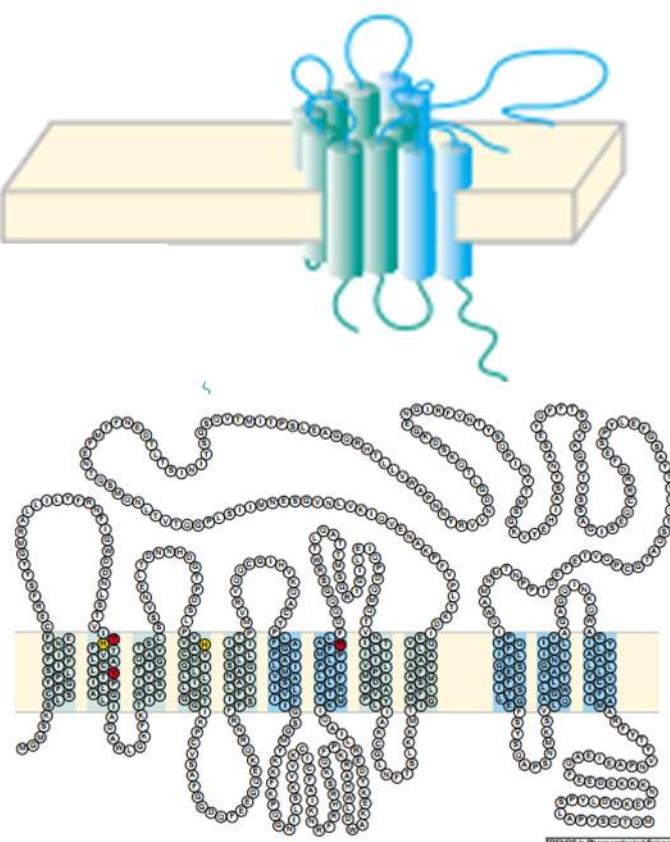


Figure 43 – Séquence et structure de PepT1. (A) Séquence protéique de PepT1 chez le bar commun, les séquences en vert représentent les 12 domaines transmembranaires (D'après Terova, 2009). (B) Représentation 3D du transporteur PepT1 chez les mammifères (Rubio-Aliaga et Daniel, 2002).

transporteur d'acides aminés cationiques appartenant à la famille des y^+ L amino acid transporters. L'alignement de ces séquences partielles avec les séquences de deux autres espèces de poisson et de l'homme sont présentés dans la figure 44. La taurine est un dérivé soufré d'acide aminé (acide 2-aminoethanesulfonique) présent en forte concentration dans les tissus animaux. Contrairement aux mammifères qui synthétisent la taurine à partir de la méthionine, les poissons ont besoin un apport exogène de taurine (Lim *et al.*, 2013). Hors, les farines d'origine végétale présentes aujourd'hui en forte concentration dans les aliments aquacoles contiennent beaucoup moins de taurine que les farines de poisson. Par conséquent, l'étude de ce transporteur est très intéressante dans un contexte où l'impact des farines de poisson et des farines d'origine végétale sur la croissance des animaux d'élevage est comparé.

Outre l'expression des transporteurs de di/tri peptides et d'acides aminés libres dans les entérocytes, un impact de la composition de l'aliment sur la surface d'absorption intestinale peut être envisagé. En effet, les effets bénéfiques des hydrolysats pourraient être provoqués en partie par un effet bénéfique sur la qualité et/ou le développement de la muqueuse intestinale. Parmi les enzymes digestives présentes sur la bordure en brosse des entérocytes, une enzyme revêt un rôle particulier, il s'agit de la phosphatase alkaline. En effet, cette enzyme est utilisée comme marqueur des entérocytes matures (Bates *et al.*, 2007) mais elle est également impliquée dans le maintien de la barrière intestinale (Geddes et Philpott, 2008).

Pendant longtemps, la recherche en nutrition a mis l'accent principalement sur l'optimisation des performances de croissance mais depuis quelques années, un nouveau champ de recherche axé sur les bienfaits sur la santé s'est ouvert. En effet, l'aquaculture intensive expose les animaux à des pathologies, favorisées par les fortes densités dans les élevages de poissons mais également de pathogènes. L'apparition et la propagation de tels événements infectieux peut constituer un facteur limitant affectant la croissance (Costello, 2009; Pridgeon et Klesius, 2013; Zagmutt *et al.*, 2013), et par conséquent provoquer des pertes économiques importantes pour les exploitations aquacoles en raison des baisses de production liées aux mortalités, aux poissons rendus impropre à la consommation en raison des signes cliniques provoqués par l'infection ou au coût des traitements curatifs. Par exemple, un épisode d'épidémie provoqué par *E. tarda* peut engendrer jusqu'à 90-95% de mortalité chez le turbot adulte et 70-80% de mortalité chez les juvéniles de cette espèce (Wang *et al.*, 2006). Les moyens de lutte contre ces infections sont l'utilisation de traitements prophylactiques en amont des épisodes infectieux (iode actif, chloramine T, ammonium quaternaire, peroxyde d'hydrogène, glutaraldéhyde) et de traitements curatifs par les antibiotiques (fluméquine, oxytetracycline, acide oxolinique) lorsque l'épisode infectieux est avéré. Cependant l'utilisation de ces produits chimiques n'est pas sans conséquences sur l'environnement. Ainsi, depuis quelques années, émerge un nouveau champ de recherche, l'immunonutrition (Pohlenz et Gatlin III, 2014) visant à étudier la modulation du système immunitaire par les aliments dans le but d'améliorer la résistance des animaux d'élevage aux infections et ainsi de limiter l'utilisation des traitements chimiques et les pertes

Taurine Transporter

Danio rerio	-----MAQKEKLQCLKDFHKDILKPSPGTRPEDEAEGKHPQ	40
Salmo salar	-----MAQKEKLQCLKDFHKDILKPSPGTRPEDEAEGKPIQ	40
Homo sapiens	-----MATKEKLQCLKDFHKDILKPSPGTRPEDEAEGKPPQ	40
Dicentrarchus labrax	GPRSKDIKRTKNTKSHHQRMAQKEKLQCLKDFHKDILKPSPGTRPEDEAEGKHPQ	120
	*****	*
Danio rerio	REWKASKLDFLLSVAGGFVGLGNWRF PYLCYKNGGGAFLIPYFIFLFGGGLPVFFLEVA	100
Salmo salar	REWKASKLDFILSVAGGFVGLGNWRF PYLCYKNGGGAFLIPYFIFLFGGGLPVFFLEVA	100
Homo sapiens	REWKASKIIDEVLSVAGGFVGLGNWRF PYLCYKNGGGAFLIPYFIFLFGSGLPVFFLEII	100
Dicentrarchus labrax	REWKASKLDFVL SVAGGFVGLGNWRF PYLCYKNGGGFLIPYFIFLFGGGLPVFFLEVA	180
	*****	*****
Danio rerio	LGQFTSEGGITCWEKLCPIFTGIGYASIVIVSLLNYYIVILAWGLYYLFQCFQPELPWA	160
Salmo salar	LGQYTSEGGITCWEKLCPIFTGIGYASIVIVSLLNYYIVILAWGLYYLFQCFQPELPWA	160
Homo sapiens	IGQYTSEGGITCWEKICPLFSGIGYASVVIVSLLNVYYIVILAWATYYLFQSFKELPWA	160
Dicentrarchus labrax	LGQFTSEGGITCWEKLCPIFTGIGYASIVIVSLLNYYIVILAWGLYYLFQCFQPELPWA	240
	*****	*****
Danio rerio	SCNNKWNTENCVEDTLRRNKTLLWAAANATNFTSPVTEFWERNVLSISDGIEEVGHVKWDL	220
Salmo salar	KCNQBWNTDRCVEDTFRKNKTLMIAANITNFTSPVTEFWERNVLSISSGIDDIGPLKWDL	220
Homo sapiens	HCNHSWNTPHCMEDTMRKKNKS梧WITISSTNFTSPVIEFWERNVLSLSPGIDHPGSLKWDL	220
Dicentrarchus labrax	KCNHPWNTDRCIEDTYRX-----	258

Y+L amino acid Transporter

Danio rerio	-----MASYSPTPAEEASPEVSNGNLKASSS---QESMKLKKEI	36
Salmo salar	-----MASYSAPTQE PANNGGSTSLKSGGGDNDMSKLKKEI	39
Homo sapiens	-----MVDSTEYEVASQPEVETSPLGDGASPGPEQVKLKKEI	37
Dicentrarchus labrax	FCGSILSPLLGFPGCLVCPLFHSLSLPCLLVEAEGCKLLTMVAEVNSVSHGNGVQLKQEI	120
	.. : ..**: **	
Danio rerio	SLLNGVCLIVGNMIGSGIFVSPKGVLMYSGSYGLSLVVWTIGGIIFSVFGALCYAELGTTI	96
Salmo salar	SLLNGVCLIVGNMIGSGIFVSPKGVLISASYGLSLVVWTIGGIIFSVFGALCYAELGTTI	99
Homo sapiens	SLLNGVCLIVGNMIGSGIFVSPKGVLISASFGLSLVIVAVGGLFSVFGALCYAELGTTI	97
Dicentrarchus labrax	SLLHGVCCLIVGNMIGSGIFVSPKGVLKYTGSGFLSLEVWAI GGVSFGALCYAELGTTI	180
	*****	*****
Danio rerio	TKSGASAYILEAFGGGFLAFIRLWTSLLIIEPTSQAVIAITFSNYMVQP IFPTCIA PYVA	156
Salmo salar	TKSGASAYILEAFGGGFLAFIRLWTSLLIIEPTSQAVIAITFSNYMVQP VFTCIA PYLA	159
Homo sapiens	KKSGASAYILEAFGGGFLAFIRLWTSLLIIEPTSQAVIAITFSNYMVQP LFPSCFAPYAA	157
Dicentrarchus labrax	RKSGASAYILKAFGGFLAFIRLWTSLLIIEPTCQAVIALTFSNYLQPFYPTWSSPYX-	239
	*****	*****

Figure 44 – Alignement des séquences des deux transporteurs d'acides aminés ciblés dans ce travail : le transporteur de la taurine et un transporteur de la famille des Y+L amino acid transporter. Les séquences partielles d'ARNm codant pour ces transporteurs sont disponibles dans SIGEN@E(TauT : FM014367; CaaT : FM005770), les séquences chez *S. salar* (TauT : AAM90737.1; CaaT : NP_001133512.1), *D. rerio* (TauT : AAX55331.1; CaaT : NP_001032648.1), et *H. sapiens* (TauT : AAC50443.1; CaaT : NP_001119578.1), sont disponibles sur NCBI. Les acides aminés conservés sont signalés en vert.

Tableau 18 – Effecteurs du système immunitaire des poissons

	Système immunitaire inné	Système immunitaire acquis
Réponse cellulaire	Barrière physique (mucus)	Lymphocytes B
	Macrophages, neutrophiles	Lymphocytes T
	Cellules dendritique	
Réponse humorale	Système du complément	IgM
	lyzozyme, peptides antimicrobiens, Acute phase proteins, lectins	IgD IgZ/I

économiques. Le système immunitaire des poissons est composé en premier lieu par des barrières physiques (peau, muqueuses digestives et branchiales) visant à empêcher l'introduction de pathogènes tels que les virus et les bactéries dans l'organisme (Alberts *et al.*, 2002). Si les agents pathogènes pénètrent dans l'organisme une réponse rapide et non spécifique est mise en place par le système immunitaire inné (Litman *et al.*, 2005). Puis le système immunitaire acquis est activé et une réponse spécifique est mise en place par les effecteurs (Rauta *et al.*, 2012). Les différents effecteurs de la réponse cellulaire et de la réponse humorale de ces systèmes sont exposés dans le tableau 18. Le système immunitaire des poissons est très proche de celui des vertébrés supérieurs, néanmoins la composante acquise y est moins 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 (Gut-Associated Lymphoid Tissue). 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'antigen processing et de la production d'immunoglobine. Le GALT est également très développé chez les poissons, il se distingue par une forte infiltration de lymphocytes T dans l'épithelium intestinal et de lymphocytes B dans la lamina propria. On trouve également des granulocytes et des cellules eosinophiles (Rauta *et al.* pour revue, voir 2012).

Les mécanismes mis en place en premier lieu lors d'une infection résultent ainsi du système immunitaire inné et de ses effecteurs : peptides antimicrobiens, lysozyme, lectins, acute phase proteins et système du complément. Les peptides antimicrobiens sont notamment présents dans les sécrétions de mucus à la surface de la peau. Ces peptides appartenant à diverses familles (Hepcidins...) sont capables de désorganiser la paroi bactérienne induisant ainsi leur lyse. Le lysozyme a également une activité antibactérienne. Cette enzyme est une hydrolase acide catalysant l'hydrolyse de la liaison β -(1,4)-glycosidique des constituants de la paroi des bactéries, les NAM (N-acétyl-muramique) et les NAG (N-acétyl-glucosamine) (Salton et Ghysen, 1959). Cette enzyme est présente dans le mucus, les tissus lymphoïdes, le plasma et dans de nombreux organes (Saurabh et Sahoo, 2008), elle est synthétisée dans le foie et dans le site extra-hépatique (Bayne et Gerwick, 2001). Les lectines sont des molécules capables de lier certains sucres, elles entraînent l'agglutination des cellules puis leur précipitation. Elles peuvent avoir une action opsonin-like et favoriser la phagocytose (Kuhlman *et al.*, 1989). Elles sont également capable

d'activer le système du complément (Ohta *et al.*, 1990). Les protéines de la phase aigue ou C-réactive protéines sont présentes en forte concentration dans le plasma des poissons (Kodama *et al.*, 1989). Elles ont un rôle dans la limitation de la dispersion des agents pathogènes, l'inhibition des protéases (Bayne et Gerwick, 2001), le soutien à la phagocytose (Nakanishi *et al.*, 1991) et l'élimination des cellules apoptotiques (Nauta *et al.*, 2003). Elles interviennent également dans la voie classique de l'activation du système du complément (de Haas *et al.*, 2000). Le système du complément est un composant central du système immunitaire inné. Il est constitué par une famille de protéines majoritairement synthétisées dans le foie. Parmi ces protéines, le complément C3 est l'effecteur principal, cette glycoprotéine de 190 kDa est clivée lors de son activation en fragment C3a et C3b. Le fragment C3a agit comme une anaphylatoxine, avec une action pro-inflammatoire et immunomodulatrice. 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 sécréter 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, TCR α , TCR β , TCR γ et TCR δ (Yazawa *et al.*, 2008; Bernard *et al.*, 2006). Les lymphocytes B sont quant à eux capables de produire des immunoglobulines (Ig). Des Ig de la classe des IgM, IgD, IgT et IgZ/IgT ont été identifiées (Ohta et Flajnik, 2006; Ryo *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2005; Du Pasquier, 2001; Ryo *et al.*, 2010)

L'alimentation, notamment la composition en protéines de l'aliment, module le système immunitaire des poissons. Plusieurs auteurs mettent en évidence une régulation des effecteurs immunitaires par les farines d'origine végétale. Une étude sur la dorade royale (*S. aurata*) montre que la substitution de plus de 75% de la farine de poisson par un mélange de farines d'origine végétale entraîne l'apparition d'une stéatose hépatique accompagnée d'une diminution de l'activité du complément (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005). Une diminution de l'activité des macrophages est rapportée chez la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) nourrit par un régime riche en farine de soja (Burrells *et al.*, 1999). Lin et Luo (2011) mettent en évidence une diminution de l'activité du lysozyme induite par une augmentation du taux de farine d'origine végétale dans l'aliment chez le tilapia (*O. niloticus* x *O. aureus*). Cependant, la substitution de 40% de la farine de poisson par de la farine de lupin dépelliculé n'influe pas sur les paramètres immunitaires humoraux (lysozyme, activité antiprotéase, taux d'immunoglobulines et production de radicaux libres de l'oxygène) et la survie chez le saumon (*S. salar*) infecté par *V. anguillarum* (Bransden *et al.*, 2001).

L'objectif de cette seconde partie est d'évaluer les performances *in vivo* des deux hydrolysats de co-produits caractérisés dans les chapitres 1, 2 et 3 de la partie 1. Elle est articulée autour de deux axes : l'influence de la nature des hydrolysats sur les performances de croissance et sur l'état de santé des animaux. Cette étude est menée chez le bar commun, *D. labrax*,

un poisson marin carnivore d'intérêt commercial en Europe. Des expériences de conditionnement alimentaire ont été menées afin de mesurer les paramètres zootechniques témoignant des performances de croissance et d'utilisation de l'aliment. De plus, une étude transcriptomique ciblée sur les transporteurs de di/tri-peptides et d'acides aminés libres décrit précédemment ainsi que sur la phosphatase alcaline a été réalisée afin d'évaluer l'influence des hydrolysats sur la phase d'absorption. Dans un second temps, des expériences similaires ont été réalisées pour évaluer l'influence des hydrolysats sur l'état de santé des animaux. Dans cette optique, une étude histologique complétée par un suivi du profil d'expression a été réalisée. Elle est ciblée sur la présence de lymphocyte dans le GALT et sur les niveaux d'expression du lysozyme et du complément C3 dans le foie.

2 Démarche expérimentale

L'étude de l'influence des hydrolysats sur la croissance, la physiologie digestive et la santé du bar commun a été menée grâce à des expériences de conditionnement alimentaire réalisées dans les infrastructures du centre IFREMER de Brest. Les essais ont impliqué 5 régimes expérimentaux. Trois de ces régimes contiennent respectivement 5%, 10% et 20% de farine de poisson (FM5, FM10 et FM20). Les deux autres régimes contiennent 5% de farine de poisson et 5% d'hydrolysat de crevette (SH) ou de tilapia (FH). Les régimes FM5, FM10 et FM20 sont utilisés comme régimes témoins. Le premier est celui qui contient le taux le plus élevé de farine d'origine végétale, il sert de témoin négatif ainsi que de régime de base complété par les hydrolysats. Le régime FM20 constitue le témoin positif et correspond à la composition des aliments utilisés actuellement en aquaculture. Enfin, le régime FM10 a été introduit comme témoin car il contient le même taux de farine d'origine végétale que les régimes FH et SH. Il permet ainsi de faire la différence entre les effets provoqué par les hydrolysats et les effets imputables aux taux de protéines animales dans l'aliment sans tenir compte du degré d'hydrolyse de ces protéines.

Le design du conditionnement alimentaire repose sur des expériences réalisées en amont. Ainsi les animaux sont soumis à un jeun d'une semaine avant le début du conditionnement alimentaire. Le jeun a un impact sur l'expression de marqueurs tel que PepT1. Hakim *et al.* (2009) ont démontré que l'expression de PepT1 est maximale après 7 jours de jeun chez le bar commun. Les aliments expérimentaux ont donc été introduits après cette période pour optimiser leur effet grâce à une forte expression des transporteurs. Pour éviter des biais expérimentaux dus à la cinétique d'expression des biomarqueurs, le nourrissage a été standardisé avec une durée d'1 heure par jour et à heure fixe. Les prélèvements ont été réalisés 16 heures après le nourrissage pour se situer en dehors du pic d'expression de PepT1 induit par l'alimentation.

Dans le cadre d'une première expérience de conditionnement alimentaire, les prélèvements ont été effectués après 45 jours d'alimentation pour déterminer l'influence des régimes expérimentaux sur l'assimilation des protéines. Les paramètres zootechniques ont été suivis ainsi que l'expression des transporteurs PepT1, CaaT et TauT et de la phosphatase alcaline. Le profil d'expression de ces marqueurs a été déterminé dans les caeca pyloriques, l'une des zones de l'intestin où l'expression de PepT1 est la plus forte (Terova *et al.*, 2009). De plus cette zone est facilement identifiable et permet de limiter les biais de prélèvements. Dans le cadre d'une seconde expérience de conditionnement alimentaire, des prélèvements d'intestin et de foie ont été réalisés après 65 jours de nourrissage pour évaluer l'impact des régimes expérimentaux sur

l'intégrité intestinale et sur le système immunitaire. Un suivi histologique de la paroi de l'intestin a été mené dans les parties proximale et distale. Un profil d'expression de deux marqueurs de l'inflammation a également été réalisé dans la partie distale de l'intestin, zone où les signes d'inflammation sont les plus intenses(Urán, 2008). Enfin, le profil d'expression de deux effecteurs du système immunitaire inné, synthétisés dans le foie a été établi dans cet organe.

3 Chapitre 1 :

Performances de croissance des deux hydrolysats et impact sur la physiologie digestive du bar commun *Dicentrarchus labrax*



Une première expérience de conditionnement alimentaire est réalisée pendant 45 jours pour évaluer l'impact des hydrolysats de crevette et de tilapia sur les performances de croissance du bar commun. De plus, afin de déterminer l'influence des régimes expérimentaux sur l'assimilation des protéines, le profil d'expression de trois transporteurs d'acides aminés et de di/tri-peptides a été déterminé au niveau des caeca pyloriques. Ces marqueurs interviennent dans la phase finale de la digestion des protéines d'origine alimentaire, c'est à dire la phase d'absorption par les entérocytes. Cette étape est particulièrement intéressante dans le cadre d'une étude sur les hydrolysats protéiques car ces derniers sont riches en produits de dégradation des protéines directement absorbables, les acides aminés libres et les di/tri-peptides. Enfin, le profil d'expression de la phosphatase alcaline a été réalisé pour évaluer l'impact des régimes expérimentaux sur la muqueuse intestinale. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication soumise dans Aquaculture.

Nutritional and functional performances of two protein hydrolysates in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed a low fish meal diet

Marie Robert^{a,b}, Joel Henry^{a,b,c,*}, Vincent Fournier^d, Mikael Herault^d, Magali Hervy^d, Celine Zatylny-Gaudin^{a,b}

^aUniversit de Caen Basse-Normandie, UMR BOREA, IBFA, F-14032 Caen, France

^bUMR BOREA Biologie des ORganismes et Ecosystmes Aquatiques" MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207

^cProteogen, SFR 146 ICORE, Universit de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France

^dAquativ (Diana group), ZA du Gohelis, 56250 Elven, France

Abstract

We investigated the effects of dietary fish hydrolysate (FH) and shrimp hydrolysate (SH) on the growth performances and expression of intestinal digestive markers of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). We fed the fish to apparent satiation on five different isoenergetic and isoproteic diets for 45 days. We assessed three diets containing different dietary levels of fish meal (5, 10 and 20% of the diet) and two diets containing 5% of FH or SH instead of 15% of fish meal. We compared gene expression of PepT1 (Peptide transporter 1), CaaT (cationic amino acid carrier), TauT (Taurine carrier) and AP (Alkaline phosphatase) in the fish pyloric caeca after 45 days of diet conditioning. At the end of the trial, dietary fish meal reduction yielded significantly lower zootechnical performances (survival, growth and feed utilization). Dietary inclusion of the hydrolysates significantly improved fish and feed performances compensating for the missing 15% fish meal. Regarding biomarkers of protein absorption, both the different dietary levels of fish meal and hydrolysate supplementation modified their gene expression. PepT1 expression was significantly down-regulated by an increased fish meal level and hydrolysate inclusion into diets. Only dietary inclusion of FH significantly up-regulated CaaT and AP expression compared to all the other diets. The expression of the Taurine Transporter gene was correlated to the diet content in marine raw materials. The present study shows that hydrolysates are efficient to replace high levels of fish meal in European seabass diet while keeping high fish and feed performances. However, hydrolysate specifications (raw material origin and peptide profile) could influence the performances of the final product, so they should be carefully taken into account. These results suggest the establishment of a compensatory mechanism in the intestine of fish in response to imbalanced dietary protein quality.

Keywords: Sea bass, protein hydrolysate, growth performances, amino acid absorption, PepT1, gene expression

1. Introduction

Global production of farmed fish and shrimp has grown dramatically over the past decades up to around 59.9 million tonnes in 2010 (FAO, 2012). The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) suggests that this increase will continue in the coming years but nutrient supply and feed inputs will need to grow at a comparable rate. However, fish meal, the most important protein source in aquafeed, is an increasingly limited resource. Fish meal is traditionally produced from low-value fish and by-products, but the depletion of wild low-value fish in recent decades has made it less available and caused fish meal prices to increase. Omnivorous or carnivorous fish-farming represented 41.6% of global production in 2008 (FAO) and was dependent upon the supply of external manufactured feeds. To limit dependence on fish meal, plant proteins (*e.g.* soybean meal) were introduced in aquafeed. Several studies highlight that substituting plant proteins for fish

meal in the diet of several farmed species like salmonids or marine fish does not alter their growth (Collins et al., 2013; Albrektsen et al., 2006). Nevertheless, total replacement of marine ingredients by plant proteins significantly decreased growth or feed efficiency in most of the species studied, as in salmonids (Opstvedt et al., 2003; Morris et al., 2005). Such lower zootechnical performances are often associated with fish metabolic disorders. Thus, inflammation in the distal intestine has been reported in carp (Uran et al., 2009) and in salmonids (Van den Ingh et al., 1991) fed dietary plant proteins. Moreover, in salmonids again, digestive enzyme activity and nutrient transporter activity in the distal intestine decreased (Bakke-McKellep et al., 2000; Nordrum et al., 2000). Antinutritional factors and imbalanced amino acid profiles of plant-based meals are often pointed out as hindering fish meal replacement in carnivorous fish diets (Francis et al., 2001). However, the many attempts to use plant protein concentrates, mixtures of plant meal from different origins and free amino acids to balance low fish meal feeds did not recover the performances of high fish meal feeds. Besides

*corresponding author

poor palatability of plant-based raw materials, the lack of specific compounds (taurine, hydroxyproline, peptides) in plant-based meal is also suspected (Aksnes, 2005). Marine by-product hydrolysates have been used as substitutes for dietary fish meal to improve performances of larval feeds (Cahu et al., 1999) and grower feeds containing high levels of plant-based raw materials (Hardy, 1996). Several studies have investigated the effect of dietary fish meal substitution by marine hydrolysates on the growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), carp (*Cyprinus carpio*), and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Most of these studies concluded to an improvement of growth in *O. mykiss* (Aksnes et al., 2006), *S. salar* (Refstie et al., 2004), *L. calcarifer* (Srichanun et al., 2014) and *D. labrax* (Cahu et al., 1999) but some authors also reported no significant improvement of growth or survival (Savoie et al., 2006).

Raw material origin, the hydrolysis method and the degree of hydrolysis may influence hydrolysate performances (Kotzamanis et al., 2007). In fact, although high contents in low-molecular-weight compounds are often hypothesized to explain the beneficial effects of hydrolysates, peptide profiles may play an important role too. Understanding how dietary proteins influence digestive tract physiology is a key element to explain zootechnical performances of diets and thus improve their formulation and processing. Amino acid carriers and di/tri-peptide carriers are particularly interesting targets because hydrolysates are rich in free amino acids and di/tri-peptides that can be directly absorbed by enterocytes. Dietary protein assimilation is the result of digestion and absorption processes. The first step of protein digestion involves pancreatic enzymes like trypsin and chymotrypsin that cleave proteins into peptides while the last step of protein hydrolysis occurs to the brush border of enterocytes where enzymes such as Leucine aminopeptidase catalyze the hydrolysis of peptides into free amino acids and di/tri-peptides that can be readily absorbed by enterocytes (Ganapathy et al., 2009). Amino acids are transported into enterocytes by a variety of amino acid carriers that are substrate specific and exhibit dependency on various ions and various translocation mechanisms, while, di/tri-peptides are transported into enterocytes by PepT1 transporter (SLC15A1), a member of the proton oligopeptide transporter family (Fei et al., 1994). So although amino acid transport is mediated by many different transporters with high specificity to amino acids, PEPT1 is potentially the only transporter in vertebrates for all combinations of di/tri-peptides (Daniel, 2004). In vertebrates, absorption of di/tri-peptides appears to be faster, more efficient and less costly in energy than absorption of free aminotri acids (Daniel, 2004). Studies conducted on terrestrial vertebrates showed that hydrolysates were absorbed faster than their intact protein or amino acid equivalents (Gilbert et al., 2008; Kodera et al., 2006; Manninen, 2009). The PepT1 intestinal transporter is well characterized in fish. Genes coding for PepT1 have been sequenced in several species including zebra

fish (*Danio rerio*; Verri et al. 2003), icefish (*Chionodraco hamatus*; Maffia et al. 2003), Atlantic cod (*Gadus morhua*; Ronnestad et al. 2007), Asian weatherloach (*Misgurnus anguillicaudatus*; Goncalves et al. 2007), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*; Terova et al. 2009), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Ostaszewska et al. 2010b), common carp (*Cyprinus carpio*; Ostaszewska et al. 2010a) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*; Liu et al. 2013). PepT1 is the most extensively studied marker of protein absorption in fish but the influence of diet composition on its expression remains unclear (Verri et al., 2011). PEPT1 has been well characterized in seabass, especially regarding its spatial distribution along the gastrointestinal tract. It is widely expressed in the upper region of the digestive tract (Terova et al., 2009). Some studies also demonstrate that PEPT1 gene expression and spatial distribution could be modulated by nutritional factors (Ostaszewska et al., 2010b,a; Terova et al., 2009; Bakke et al., 2010)) and could be considered as an important biomarker of dietary protein quality and animal growth (Verri et al., 2011). Although very little information is available on amino acid carriers in fish, transport systems orthologous to mammals are hypothesized (Margheritis et al., 2013). In mammals, transporters specific for basic amino acids (rBAT, b^{0,+AT}, CAT1 and 2, y⁺LAT1 and 2), neutral amino acids (B⁰AT, LAT1) and anionic amino acids (EAAT3) are well characterized (Gilbert et al., 2008). In sea bass, ESTs of a Taurine carrier (TauT) and a cationic amino acid carrier (CaaT) are among the ESTs available in SIGEN@E database. Dietary hydrolysates also have a health-promoting effect (Liang et al., 2006; Tang et al., 2008). For instance, they improve the integrity of intestine mucosa in mice (Marchbank et al., 2009). To assess intestinal development, the brush border enzyme alkaline phosphatase is particularly interesting as a marker of enterocyte maturity (Bates et al., 2007) and for its involvement in gut barrier maintenance (Geddes and Philpott, 2008).

In this context, we assessed the nutritional and functional performances of two commercial hydrolysates (a shrimp-based one and a fish-based one) in European seabass (*D. labrax*). We particularly focused on the influence of hydrolysate low-molecular-weight proteins on fish growth and on biomarkers of the absorption of dietary protein digestion end-products (di/tri-peptides and free amino acids) in the pyloric caeca. The pyloric caeca are one of the proximal intestines where nutrient breakdown and uptake take place (Buddington et al., 1996) and where PepT1 is the most expressed (Terova et al., 2009). We measured PEPT1 and CaaT (cationic amino acid carrier) gene expression and the expression of TauT, a gene involved in the transport of taurine, a derivative amino acid specifically found in marine raw materials. Finally, we assessed intestinal integrity by measuring alkaline phosphatase gene expression.

2. Materials and methods

2.1. Diet, animals and growth experiment

We carried out the trial in the experimental flow-through facilities of IFREMER (centre de Brest, France). Seawater (salinity: 35g/l) was filtered through a high-pressure sand filter and thermo-regulated (water temperature: 20 ±1°C). Triplicate groups of 40 juvenile European sea bass each (initial mean body weight: 6.54 ±0.02g) were reared in 15 tanks of 80 l capacity (flow rate: 3 l/min; photoperiod: 12 h light: 12 h dark). Three tanks were randomly allotted to each diet. The feeds were distributed to the fish in slight excess by an automatic feeder (Arvotech, Finland) every day for 1h between 3:00PM and 4:00PM for 45 days. The feed level was finely tuned every day according to the uneaten feed collected the day before. Uneaten feed was collected every day by home-made feed waste collectors, pooled and kept frozen till the end of the trial, then dried and weighed. At the beginning of the trial, at the end of it, and after four weeks, the fish were left unfed for 24h, counted and the biomass of each group was determined.

2.2. Diets

We formulated five diets: 3 diets contained fish meal at 5%, 10% and 20% of dry matter (diets FM5, FM10 and FM20). We formulated the FM20 diet as the reference and we used the FM5 diet to assess the performance of two other dietary treatments, FM5 + SH and FM5 + FH, that respectively contained shrimp-based and fish-based hydrolysate included at 5%.

Hydrolysates were produced from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) frames, both by-products from plants processing fish-farming products for human food. The hydrolysates were provided by AQUATIV (Diana Group, France). All the diets were balanced for deficient amino acids according the requirements determined for European sea bass (Wilson, 2002). Their composition is detailed in Table 1.

2.3. Analytical methods

The proximate composition of the diets was determined by the In vivo Labs laboratory (Saint Nolff, France). The moisture content was obtained by desiccation (103°C, 4h) according to the CE N°152/2009 standard. The total crude protein content (N x 6.25) was determined by the Dumas method (ISO 16634-1) and the crude fat content by solvent extraction after hot acid hydrolysis (CE N°152 /2009,). The ash content was measured after incineration (550°C, 8h).

2.4. Sampling

At the end of the trial, fish were sampled 16h after feeding. They were anesthetized with 0.2% of 2-phenoxyethanol and then sacrificed by cervical section. The pyloric caeca of 9 fish per diet were immediately sampled and frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until transcriptomic analysis.

2.5. High Pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC)

We performed HPSEC characterization on a VARIAN HPLC system equipped with a UV (214-nm wavelength) detector. Elution was carried out on a ReproSil 50 SEC column (300x8 mm, 5 µm; AIT France) with MeOH/water /trifluoroacetic acid (10/89.9/0.1, v/v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min. For peptide extraction from FH, we diluted FH in 10 volumes of cold 0.1% TFA, left it that way overnight and then centrifuged it 15min at 21,000 x g at 4°C. Each supernatant was filtered and concentrated on a Sep-Pak C18ec classic cartridge (Waters), evaporated on a speed vac concentrator and kept at 4°C until use. The peptide extract was dissolved in the HPSEC eluent and 10 µl were injected. We calibrated the HPSEC system with five molecular mass markers: ribonuclease A (13,700 Da), insulin (5,778 Da), vasopressin (1,084 Da), FLRFamide (580 Da), and hydroxytryptophan (220 Da). We used the SH molecular weight profile from a previous study (Robert et al., 2014).

2.6. Amino acid composition of the hydrolysates

The dietary amino acid composition of the hydrolysates was determined by the In Vivo Labs laboratory (Saint Nolff, FRANCE), by high-performance liquid chromatography after acid hydrolysis (6N HCl, 110°C, 24 h) and performic acid oxidation to recover all amino acids including methionine and cysteine. The resulting hydrolysates were then adjusted to pH 2.20. The amino acids were separated by ion exchange chromatography and determined using photometric detection at 570 nm (440 nm for proline) after reaction with ninhydrin. For tryptophan determination, each sample was hydrolyzed under alkaline conditions with barium hydroxide and heated in an autoclave at 120°C for 16 hours. Then the hydrolysates were acidified to pH 3.0 using chlorhydric acid. Tryptophan was separated by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) and determined by fluorometric detection.

2.7. Quantitative real time PCR (qPCR)

Total RNA was extracted from all samples using TriReagent (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Total RNA concentrations were quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific) and RNA quality was checked using a bioanalyser (Agilent Technologies). A treatment with DNase RQ1 (Promega) was carried out and 300ng of each sample were reverse-transcribed using 20 U of RNasin (Promega), 0.5 mM RNase-free dNTPs and 200 U of MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase, Promega). Specific primers (Table 2) were designed with Primer3web (version 4.0.0,<http://primer3.ut.ee/>) from sequences available on the GeneBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) or on SIGENAE (<http://www.sigenae.org/>). We

used AmplifX version 1.7.0 program (<http://crn2m.univ-mrs.fr/AmplifX>) to simulate primer efficiency during amplification. We performed quantitative RT-PCR analysis on a MiQ Cycler (BioRad, France) using the GoTaq qPCR Master Mix (Promega). We used 5 µl of cDNA from each sample. PCR conditions were as follows: 90 s at 95°C and 45 cycles consisting of 15 s at 95°C and 45 s at 60°C. We assessed accurate amplification of the target sequence by constructing melting curves (80 cycles of 10 s, increasing the temperature by 0.5°C steps from 55°C to 95°C). We used Actin and Elongation Factor 1 (EF1) as reference genes.

2.8. Statistical analysis

Values are presented as means $\pm SEM$. We analyzed all data by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fishers test for the zootechnical data. For gene expression, we used Kruskal-Wallis test followed by Students t-test to study the influence of experimental diets.

3. Results and discussion

3.1. Zootechnical performances

Replacing fish meal by high levels of plant proteins often leads to reduced growth (Refstie et al., 2001) and to negative effects on digestive enzymes (Silva et al., 2010). We assessed the effects of three levels of fish meal (5%, 10% and 20%) and two by-product hydrolysates instead of fish meal on sea bass. In this trial, dietary fish meal replacement by plant based raw materials lead to a significant reduction in fish and feed performances (p-value < 0.05). Fish feed intake and feed utilization were negatively impacted by fish meal replacement while fish survival was also significantly affected (Table 3). Lowering the dietary fish meal level from 20% to 5% significantly affected growth performances and survival, suggesting a depletion of immunity in the groups of fish fed the lowest level of fish meal. We observed intermediate results in the FM10 group; the survival rate was not significantly different from the FM5 and FM 20 groups but the specific growth rate was higher than in the FM5 group (p-value < 0.05). Utilization of marine hydrolysates has been widely studied in recent years especially for their ability to enhance feed palatability and improve feed digestibility. In the present trial, inclusion of 5% of SH and FH in replacement of 15% of fish meal restored both survival and specific growth rates in sea bass to the same level as the high fish meal diet FM20. Moreover, dietary inclusion of FH and SH increased feed intake compared to the FM5 and FM10 groups. These results are in agreement with previous studies in which the inclusion of hydrolysate improved fish's growth performances and feed utilization. (Bui et al., 2014) substituted fish meal by 4% of shrimp or tilapia hydrolysate (provided by the same manufacturer as in this study) and thus improved red seabreams growth performances and feed utilization. Similar conclusions were obtained in Atlantic salmon with an inclusion rate of 10-15%

(Refstie et al., 2004) or in yellow croaker at the same inclusion level (Tang et al., 2008). By contrast, other studies report that dietary hydrolysate did not improve fish and feed performances in juvenile turbot (Oliva-Teles et al., 1999) or in gilthead seabream (Kolkovski and Tandler, 2000), suggesting that the beneficial effects of hydrolysates could be dependent on the target species and/or the characteristics of hydrolysates such as their molecular weight profile (Aksnes et al., 2006).

3.2. Amino acid composition and molecular weight profile of SH and FH

The percentage of free amino acids belonging to the neutral, cationic, and anionic amino acid categories and the taurine content of SH and FH are shown in Table 4. SH contained around twice as many free neutral amino acids and free cationic amino acids as FH. The free anionic amino acid content was 3.6 times higher in SH than in FH. Taurine levels were similar in the two hydrolysates. The HPSEC chromatogram and the molecular weight distribution of the soluble peptides and amino acids are shown in Fig.1. Significant differences between the two hydrolysates appeared. In SH, the main fraction of soluble peptides (46.3%) was composed of oligopeptides (500-2,000 Da) followed by di/tri-peptides (41.9%) and polypeptides (11.8%), whereas FH contained a high level of polypeptides (46.9%) and oligopeptides (25.8%) but was poor in di/tri-peptides (17.3%) compared to SH. The shrimp hydrolysate allowed for the best fish and feed performances compared to the fish hydrolysate, even though the results were not all statistically significant for the parameters we recorded and calculated. These results confirm data from (Aksnes et al., 2006) who suggested that a high level of low-molecular-weight compounds was one of the inducers of the growth-promoting effects of hydrolysates, but also pointed out the importance of hydrolysate origin and specifications (*i.e.* the peptide profile) on the product performances. The benefits of small nitrogen compounds in fish feed performances have also been highlighted in salmon fed low fish meal diets enriched or not with fish meal stickwater (Kousoulaki et al., 2009).

3.3. Expression pattern of brush border peptides and amino acid carriers

To improve knowledge about the effects of hydrolysates on peptide and amino acid absorption in the digestive tract, we monitored the expression of the genes encoding the peptide transporter PepT1 and the two amino acid carriers CaaT and Taut in pyloric caeca of fish fed experimental diets for 45 days (Fig. 2). Figure 2A shows that dietary fish meal level significantly influenced PepT1 gene expression in pyloric caeca. PepT1 mRNA level decreased when the level of fish meal increased. In the same way, supplementation with either of the hydrolysates influenced PepT1 expression too. Inclusion of 5% of SH significantly down-regulated PepT1 gene expression compared to the

FM5 group but did not significantly change it compared to the FM10 group. FH-fed fish displayed the lowest expression of PEPT1, even lower than FM20 fish (p -value < 0.05). Our results show that both dietary fish meal and dietary hydrolysates influenced gene expression of the di/tri-peptide transporter PEPT1 in pyloric caeca. A similar effect on PEPT1 gene expression has already been evidenced in gilthead seabream fed on dietary plant raw materials (Terova et al., 2013) but the other way round: a high dietary level of plant protein down-regulated the expression of PEPT1 in proximal intestine. Ostaszewska et al. (2010b,a) highlighted different responses depending on fish species; dietary supplementation with free amino acids (Lys, Gly) or di-peptides (Lys-Gly) increased PepT1 expression in carp intestine while it transiently decreased it in rainbow trout intestine. In terrestrial vertebrates like rats and chicken, high-level and high-quality dietary proteins up-regulated intestinal PepT1 gene expression (Chen et al., 2005; Erickson et al., 1995; Shiraga et al., 1999). Most of these results support the hypothesis of a positive correlation between PepT1 gene expression and growth in fish as in terrestrial animals (Verri et al., 2011). Our results suggest that the presence of high-quality marine proteins in fish diet down-regulated PepT1 gene expression. This study focused only on the response in pyloric caeca, one of the area where the intestinal transporter PEPT1 is expressed at the highest level in European seabass (Terova et al., 2009). Further investigations on the influence of dietary proteins in the spatial expression of PepT1 in the intestine of sea bass are required to confirm the PEPT1 response along the intestine. In fact, recent studies suggest that a compensatory mechanism in response to imbalanced dietary proteins could spread the absorption process along the intestine. In *Sparus aurata* and *Oncorhynchus mykiss*, an increased dietary level of plant proteins decreased nutrient absorption in pyloric caeca but not in the whole intestine (Ostaszewska et al., 2010b,a; Terova et al., 2013). Moreover, in cod (*Gadus morhua*), dietary introduction of fish hydrolysate tended to decrease PepT1 gene expression in pyloric caeca (no significant difference) but increased it in the distal intestine (Bakke et al., 2010). Interestingly, the same study showed that using the ultra filtration retentate of fish hydrolysate ultra filtration influences the distribution of protein molecular weights in the final product modified PepT1 expression in other intestine segments. Tissue sampling times could also have an influence when studying the response of PEPT1 to nutritional factors and could explain discrepancies among studies. In a preliminary study (data not shown), we observed that PEPT1 gene expression was highly dependent on fish-feeding rhythm. PEPT1 expression increased a few hours before the time of a unique daily feeding to return to a basal level a few hours after feeding. That is why; we fed the fish once a day and sampled tissues within the time lapse of maximum PEPT1 expression.

Regarding amino acid carrier gene expression, dietary inclusion of increasing levels of fish meal did not modify

CaaT expression but influenced TauT expression (Fig 2B and 2C). While an increase in fish meal level from 5% to 10% did not significantly change TauT mRNA levels, 20% fish meal significantly down-regulated TauT gene expression (p -value < 0.001). CaaT gene expression was not influenced by dietary SH inclusion (Fig. 2B). Fig. 2C shows that the SH groups TauT mRNA levels were significantly lower than the FM5 groups, did not differ from the FM10 groups and were significantly higher than the FM20 groups. Dietary inclusion of FH significantly increased CaaT mRNA levels compared to all other experimental diets (Fig. 2B). FH did not significantly modify TauT gene expression compared to the FM5 and FM10 groups (Fig. 2C). Interestingly, dietary inclusion of the hydrolysates significantly influenced peptide and free amino acid transporter gene expression in a different way. FH inclusion brought about a totally different profile of biomarker expression although fish growth performances were quite similar to the other dietary treatments. Dietary FH induced very low expression of PEPT1 associated to high expression of CaaT, The expression pattern was the opposite in fish fed dietary SH, which was richer than FH in free amino acids and small peptides. These results could suggest that decreased di/tri-peptide absorption was offset by increased free amino acid absorption to maintain fish growth performances. Such data are important and highlight the role of dietary protein quality on protein metabolism in fish, i.e. raw material origin and protein molecular weights and amino acid profiles.

Very limited information is available about amino acid carriers and their regulation in fish. We studied CaaT and TauT, respectively specialized in cationic amino acid and taurine transport in enterocytes. We selected these two genes because cationic amino acid levels differed between the two hydrolysates while taurine levels were similar. Taurine is a derivative of cysteine mainly present in animal tissues. It is essential for fish growth (Lim et al., 2013). In the present study, lower levels of taurine in diets containing more plant proteins led to an up-regulation of TauT in pyloric caeca. These findings further support the hypothesis that a compensatory mechanism is set up in the digestive system of fish fed on an imbalanced dietary protein profile.

3.4. Expression pattern of alkaline phosphatase

Protein hydrolysates are known to promote overall health in fish, especially by stimulating their immune system (Liang et al., 2006). To investigate this aspect, we studied alkaline phosphatase gene expression in pyloric caeca. As shown in Fig. 3, dietary fish meal levels had not influence on AP gene expression in pyloric caeca, and neither did dietary inclusion of SH, but FH significantly up-regulated AP mRNA levels. AP is an anti-inflammatory enzyme located in the intestine and involved in the control of intestinal homeostasis (Lalles, 2014) It is often used as an intestinal integrity marker. To our knowledge the influence of dietary protein quality on AP activity has only

been studied in fish. Dietary inclusion of fish protein hydrolysate increased AP activity in the whole intestine of sea bass larvae and stimulated intestine maturation (Delcroix et al., 2014; Kotzamanis et al., 2007). Dietary inclusion of lupin or rapeseed meals decreased AP activity in the proximal intestine of gilthead sea bream but not in goldfish (Silva et al., 2010). In this study, only FH had a positive effect on intestine integrity of sea bass. This property could be correlated with the peptide profile of the hydrolysate. FH's high content in oligopeptides may contribute to the production of bioactive peptides after enzymatic digestion. Such peptides with biological activity on intestinal integrity have been detected in milk. Bioactive peptides derived from -casein regulated mucin secretion and increased the number of goblet cells and paneth cells along the small intestine of rats (Plaisancie et al., 2013). These assumptions on the health benefits of hydrolysates are further supported by a recent study showing that dietary FH improved survival and immunological parameters in red sea bream challenged with *Edwardsiella tarda* (Bui et al., 2014).

4. Conclusion

This study shows that replacing 15% of fish meal by 5% of fish or shrimp hydrolysate is efficient to maintain growth performances, feed utilization and survival in European seabass. Dietary hydrolysates and more generally dietary protein quality could influence relative gene expression of carriers involved in protein absorption by enterocytes. The balance among oligopeptides, polypeptides and free amino acids should be taken into account when including hydrolysates to aquafeeds to anticipate feed and fish performances. To our knowledge, this is the first study showing such a clear influence of dietary protein quality on the relative expression levels of di/tri-peptide and amino acid transporter genes in enterocytes to maintain optimal growth and feed utilization in fish. These results suggest the establishment of a compensatory mechanism in the intestine of fish in response to imbalanced dietary protein quality; this mechanism occurs through the regulation of transporter gene expression to optimize nutrient absorption. Focusing on more transporters and other intestinal segments will allow us to confirm these first promising results and open new ways of formulating fish feeds.

Acknowledgments

This work was supported by the Country Council of Basse-Normandie. Sea bass were kept in IFREMER (Brest, France) facilities. We thank all the staff for their welcoming behavior and help. We thank Francis Orvain for his precious help in statistical analysis.

References

- AKSNES, A. (2005). Feed ingredients. the impacts of nitrogen extractives in aqua feed ingredients. *Int. Aqua Feed*, 8:28–30.
- AKSNES, A., HOPE, B., JONSSON, E., BJORNSSON, B. et ALBREKTSSEN, 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.
- ALBREKTSSEN, S., MUNDHEIM, H. et AKSNES, A. (2006). Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources. *Aquaculture*, 261(2):626–640.
- BADO-NILLES, A., QUENTEL, C., MAZURAIS, D., ZAMBONINO-INFANTE, J. L., AUF-FRET, M., THOMAS-GUYON, H. et LE FLOCH, S. (2011). *In vivo* effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linneé). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7):1896–1904.
- BAKKE, S., JORDAL, A.-E. O., GÓMEZ-REQUENI, P., VERRI, T., KOUSOULAKI, K., AKSNES, A. et RONNESTAD, I. (2010). Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 156(1):48–55.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M., NORDRUM, S., KROGDAHL, A. et BUDDINGTON, R. K. (2000). Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(1):33–44.
- BATES, J. M., AKERLUND, J., MITTGE, E. et GUILLEMIN, K. (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell host & microbe*, 2(6):371–382.
- BUDDINGTON, R. K., KROGDAHL, A. et BAKKE-MCKELLEP, A. M. (1996). The intestines of carnivorous fish : structure and functions and the relations with diet. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 638:67–80.
- 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.
- 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.
- CHEN, H., PAN, Y., WONG, E. A. et WEBB, K. E. (2005). Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. *The Journal of nutrition*, 135(2):193–198.
- COLLINS, S. A., ØVERLAND, M., SKREDE, A. et DREW, M. D. (2013). Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids : Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*, 400–401:85–100.
- DANIEL, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66(1):361–384.
- DELACROIX, J., GATESOUPE, F. J., DESBRUYÈRES, E., HUELVAN, C., LE DELLIOUT, H., LE GALL, M.-M., QUAZUEL, P., MAZURAIS, D. et ZAMBONINO-INFANTE, J.-L. (2014). The effects of dietary marine protein hydrolysates on the development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and associated microbiota. *Aquaculture Nutrition*, in press.
- ERICKSON, R. H., GUM, J. R., LINDSTROM, M. M., McKEAN, D. et KIM, Y. S. (1995). Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, 216(1):249–257.
- FAO (2012). State of world fisheries and aquaculture - 2012. Rapport technique.
- FEI, Y.-J., KANAI, Y., NUSSBERGER, S., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., ROMERO, M. F., SINGH, S. K., BORON, W. F. et HEDIGER, M. A. (1994). Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*.
- FRANCIS, G., MAKKAR, H. 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.
- GANAPATHY, V., GANAPATHY, M. E. et LEIBACH, F. H. (2009). Protein digestion and assimilation. *Textbook of gastroenterology*, page 464.
- GEDDES, K. et PHILPOTT, D. J. (2008). A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135(8–12).
- GILBERT, E. R., WONG, E. A. et WEBB, K. E. (2008). Board-invited review : Peptide absorption and utilization : Implications for animal nutrition and health. *Journal of animal science*, 86(9):2135–2155.
- GONCALVES, A. F., CASTRO, L. F. C., PEREIRA-WILSON, C., COIMBRA, J. et WILSON, J. M. (2007). Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish ? *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 2(4):345–355.
- HARDY, R. (1996). Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal Feed Science and Technology*, 59(1):71–80.
- KODERA, T., HARA, H., NISHIMORI, Y. et NIO, N. (2006). Amino acid absorption in portal blood after duodenal infusions of a soy protein hydrolysate prepared by a novel soybean protease d3. *Journal of food science*, 71(7):S517–S525.
- KOLKOVSKI, S. et TANDLER, A. (2000). The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6(1):11–16.
- KOTZAMANIS, Y., GIBERT, E., GATESOUPE, F., 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, K., ALBREKTSSEN, S., LANGMYHR, E., OLSEN, H., CAMPBELL, P. et AKSNES, A. (2009). The water soluble fraction in fish meal (stickwater) stimulates growth in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given high plant protein diets. *Aquaculture*, 289(1–2):74–83.
- LALLES, J.-P. (2014). Intestinal alkaline phosphatase : novel functions and protective effects. *Nutrition reviews*, 72(2):82–94.
- LIANG, M., WANG, J., CHANG, Q. et MAI, K. (2006). Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). *Aquaculture Research*, 37(1):102–106.
- LIM, S.-J., OH, D.-H., KHOSRAVI, S., CHA, J.-H., PARK, S.-H., KIM, K.-W. et LEE, K.-J. (2013). Taurine is an essential nutrient for juvenile parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture*, 414:274–279.
- LIU, Z., ZHOU, Y., FENG, J., LU, S., ZHAO, Q. et ZHANG, J. (2013). Characterization of oligopeptide transporter (PepT1) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 164(3):194–200.
- MAFFIA, M., RIZZELLO, A., ACIERNO, R., VERRI, T., ROLLO, M., DANIELI, A., DÖRING, F., DANIEL, H. et STORELLI, C. (2003). Characterisation of intestinal peptide transporter of the antarctic haemoglobinless teleost *Chionodraco hamatus*. *Journal of experimental biology*, 206(4):705–714.
- MANNINEN, A. H. (2009). Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutr & Metab*, 6:38–43.
- MARCHBANK, T., ELIA, G. et PLAYFORD, R. J. (2009). Intestinal protective effect of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Regulatory Peptides*, 155(1–3):105–109.
- 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 Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 166(2):285–292.
- MORRIS, P. C., GALLIMORE, P., HANDLEY, J., HIDE, G., HAUGHTON, P. et BLACK, A. (2005). Full-fat soya for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater : Effects on performance, composition and flesh fatty acid profile in absence of hind-gut enteritis. *Aquaculture*, 248(1):147–161.
- NORDRUM, S., BAKKE-MCKELLEP, A. M., KROGDAHL, A. et BUDDINGTON, R. K. (2000). Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3):317–335.
- OLIVA-TELES, A., CERQUEIRA, A. L. et GONÇALVES, P. (1999). The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 179(1):195–201.

- OPSTVEDT, J., AKSNES, A., HOPE, B. et PIKE, I. (2003). Efficiency of feed utilization in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 221(1-4):365–379.
- OSTASZEWSKA, T., DABROWSKI, K., KAMASZEWSKI, M., GROCHOWSKI, P., VERRI, T., RZEPKOWSKA, M. et WOLNICKI, J. (2010a). The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 157(2):158–169.
- OSTASZEWSKA, T., KAMASZEWSKI, M., GROCHOWSKI, P., DABROWSKI, K., VERRI, T., AKSAKAL, E., SZAKTOWSKA, I., NOWAK, Z. et DOBOSZ, S. (2010b). The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 155(1):107–114.
- PLAISANCIE, P., CLAUSTRE, J., ESTIENNE, M., HENRY, G., BOUTROU, R., PAQUET, A. et LÉONIL, J. (2013). A novel bioactive peptide from yogurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and paneth cells along the small intestine. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(1):213–221.
- 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.
- REFSTIE, S., STOREBAKKEN, T., BAEVERFJORD, G. et ROEM, A. J. (2001). Long-term protein and lipid growth of atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture*, 193(1):91–106.
- RØNNESTAD, I., GAVAIA, P. J., VIEGAS, C. S., VERRI, T., ROMANO, A., NILSEN, T. O., JORDAL, A.-E. O., KAMISAKA, Y. et CANCELA, M. L. (2007). Oligopeptide transporter PepT1 in atlantic cod (*Gadus morhua* L.) : cloning, tissue expression and comparative aspects. *Journal of Experimental Biology*, 210(22):3883–3896.
- ROBERT, M., ZATYLYN-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.
- SAVOIE, A., LE FRANÇOIS, N. R., CAHU, C., BLIER, P. U. et ANDREASSEN, I. (2006). Do protein hydrolysates improve survival and growth of newly-hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor*), a non-metamorphic aquaculture fish species ? *Aquaculture*, 261(2):782–788.
- SHIRAGA, T., MIYAMOTO, K.-I., TANAKA, H., YAMAMOTO, H., TAKETANI, Y., MORITA, K., TAMAI, I., TSUJI, A. et TAKEDA, E. (1999). Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal h⁺/peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, 116(2):354–362.
- 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.
- SIRICHANUN, M., TANTIKITTI, C., KORTNER, T. M., KROGDAHL, A. 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.
- 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.
- TEROVA, G., CORÀ, S., VERRI, T., RIMOLDI, S., BERNARDINI, G. et SAROGGLIA, M. (2009). Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 294(3–4):288–299.
- TEROVA, G., ROBAINA, L., IZQUIERDO, M., CATTANEO, A., MOLINARI, S., BERNARDINI, G. et SAROGGLIA, M. (2013). PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *SpringerPlus*, 2(1):1–14.
- URAN, P. A., SCHRAMA, J. W., ROMBOUT, J. H. W. M., TAVERNE-THIELE, J. J., OBACH, A., KOPPE, W. et VERRETH, J. A. J. (2009). Time-related changes of the intestinal morphology of atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *Journal of Fish Diseases*, 32(9):733–744.
- VAN DEN INGH, T., KROGDAHL, A., OLLI, J. J., HENDRIKS, H. et KONINKX, J. (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.
- VERRI, T., KOTTRA, G., ROMANO, A., TISO, N., PERIC, M., MAFFIA, M., BOLL, M., ARGENTON, F., DANIEL, H. et STORELLI, C. (2003). Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter. *FEBS letters*, 549(1):115–122.
- VERRI, T., TERESA, G., DABROWSKI, K. et SAROGGLIA, M. (2011). Peptide transport and animal growth : the fish paradigm. *Biology letters*, page rsbl20101164.
- WILSON, R. P. (2002). Amino acids and proteins. *Fish nutrition*, page 143.

Table 1: Formulation and proximal composition of the diets used to feed sea-bass for 45 days

Raw materials and Ingredients	FM5	FM10	FM20	FM5 + 5% SH	FM5 + 5% FH
Fish meal LT	5.00%	10.00%	20.00%	5.00%	5.00%
Tilapia hydrolysate	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.00%
Shrimp hydrolysate	0.00%	0.00%	0.00%	5.00%	0.00%
Wheat gluten meal	21.83%	19.45%	14.53%	20.08%	19.81%
Corn gluten meal	16.90%	15.40%	11.40%	15.57%	15.37%
Soybean meal 48% CP	15.89%	15.36%	15.14%	14.70%	14.52%
Rapeseed meal	10.24%	9.24%	7.24%	9.43%	9.31%
Wheat meal	11.64%	13.06%	16.22%	12.53%	13.47%
DL-Methionine	0.59%	0.55%	0.45%	0.54%	0.54%
Lysine HCL	1.67%	1.48%	1.08%	1.54%	1.52%
Mono Calcium Phosphate	2.60%	2.15%	1.25%	2.38%	2.34%
Fish oil	11.28%	10.97%	10.33%	10.88%	10.77%
Mineral and vitamin premix	2.36%	2.36%	2.36%	2.36%	2.36%
Proximal composition (% diet)					
Dry matter	92.90%	94.00%	94.00%	93.80%	93.60%
Crude protein	46.90%	47.30%	48.70%	47.60%	47.40%
Crude fat	16.10%	16.40%	16.80%	16.10%	16.30%
Ash	6.00%	6.30%	6.40%	6.30%	6.10%
Energy (Kcal/g)	5.17	5.18	5.18	5.18	5.19
soluble N (% protein)	13.20%	13.80%	15.00%	18.50%	18.80%

Table 2: Primer sequences for real time qPCR.

Gene	Accession number	forward (F) and reverse (R) primer sequences		Amplicon size
		5'	3'	
Actin	AJ537421	F	ACGTTGACATCCGTAAGGAC	214 bp
		R	ATCCACATCTGCTGGAAGGT	
EF-1*	AJ866727	F	GCTTCGAGGAAATCACCAAG	153 bp
		R	CAACCTTCCATCCCTTGAAC	
PepT1	FJ237043	F	GTACATCCCGCTTCCAACA	181 bp
		R	CTCCATCTTCTACCTGTCAAT C	
CaaT	FM005770	F	CCTGAAGGCCTTGGAGGAT	120 bp
		R	AAGGGCTGGACCAGGTAGTT	
TauT	FM014367	F	TTTTCCACTGCTGCTGATGTC	159 bp
		R	CCCTTGTCCGTTCGTCTTG	
AP	FJ860000	F	GCTAAATGGCAGAGTGGAG	140 bp
		R	CCTTGACCCCACAGAGGTAA	

* (Bado-Nilles et al., 2011)

Table 3: Zootechnical performances of European sea bass fed dietary treatments for 45 days *

Diets	Initial Body Weight (g)	Final Body Weight (g)	Survival rate (%)	Specific Growth Rate (%)	Feed Conversion Ratio	Feed Intake (g/kg ABW/d)
FM5	6.54±0.04	17.31±0.18c	90.83±2.04b	2.32±0.01c	1.00±0.04c	19.77±0.28b
FM10	6.53±0.01	18.96±0.39ab	95.83±2.70ab	2.54±0.04b	0.94±0.01b	20.72±0.53b
FM20	6.57±0.03	20.06±0.74ab	99.17±1.02a	2.72±0.08ab	0.89±0.01a	21.33±0.71ab
SH	6.52±0.01	20.46±0.49a	100.00±0.00a	2.79±0.06a	0.90±0.01ab	22.17±0.32a
FH	6.56±0.00	18.90±0.00b	96.25±1.77ab	2.58±0.00ab	0.98±0.00bc	22.43±0.07a

* Values are means ± SD (n=3). Means that do not share a common superscript letter in a same column are significantly different (P < 0.05)

Table 4: Amino acid distribution in SH and FH based on their electrical charge (g/100g dry matter)

	Shrimp hydrolysate	Fish Hydrolysate
Free neutral amino acids	21.5%	10.4%
Free cationic amino acids	7.5%	3.8%
Free anionic amino acids	2.9%	0.8%
Taurine	0.75%	0.79%

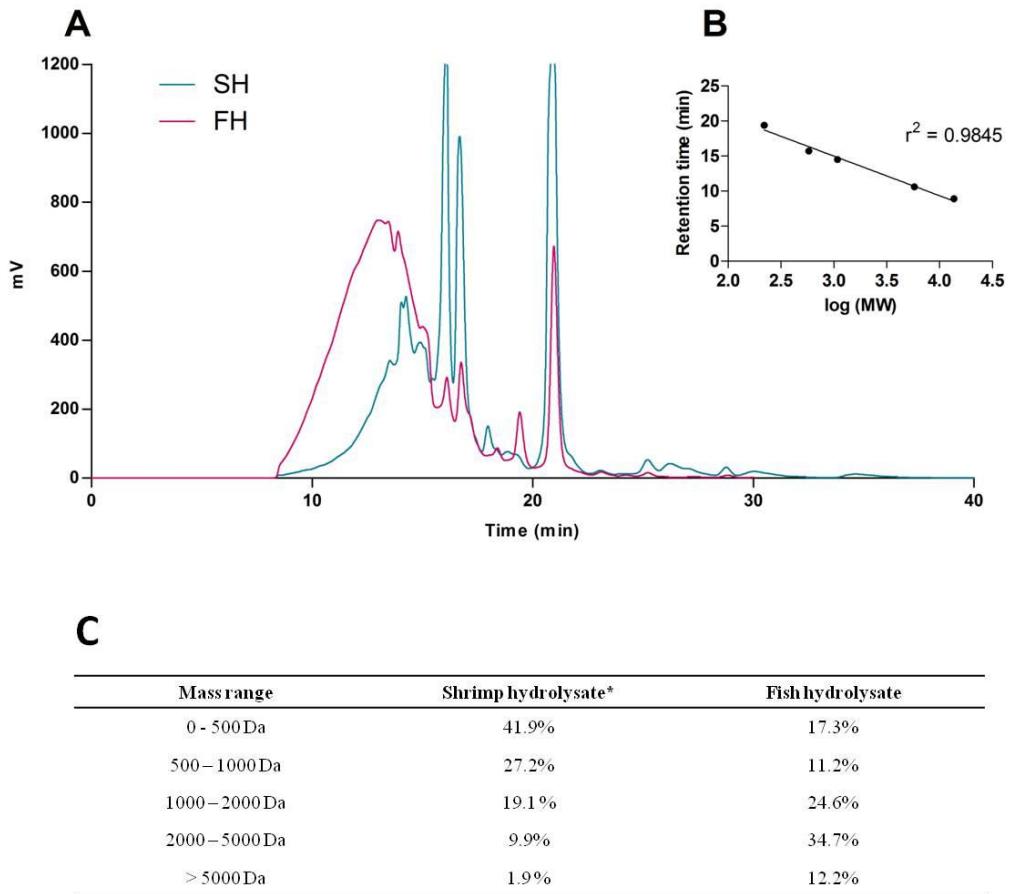


Figure 1: Molecular weight profiles of SH and FH. HPSEC chromatogram (A) and calibration curve (B) were obtained using a ReproSil column at a flow rate of 0.7ml/min of MeOH/TFA 0.1% in water (90/10, v/v). The total surface area of the chromatogram was integrated and separated into 5 ranges expressed as percentages of the total surface area according to the calibration curve (C). * (Robert et al., 2014)

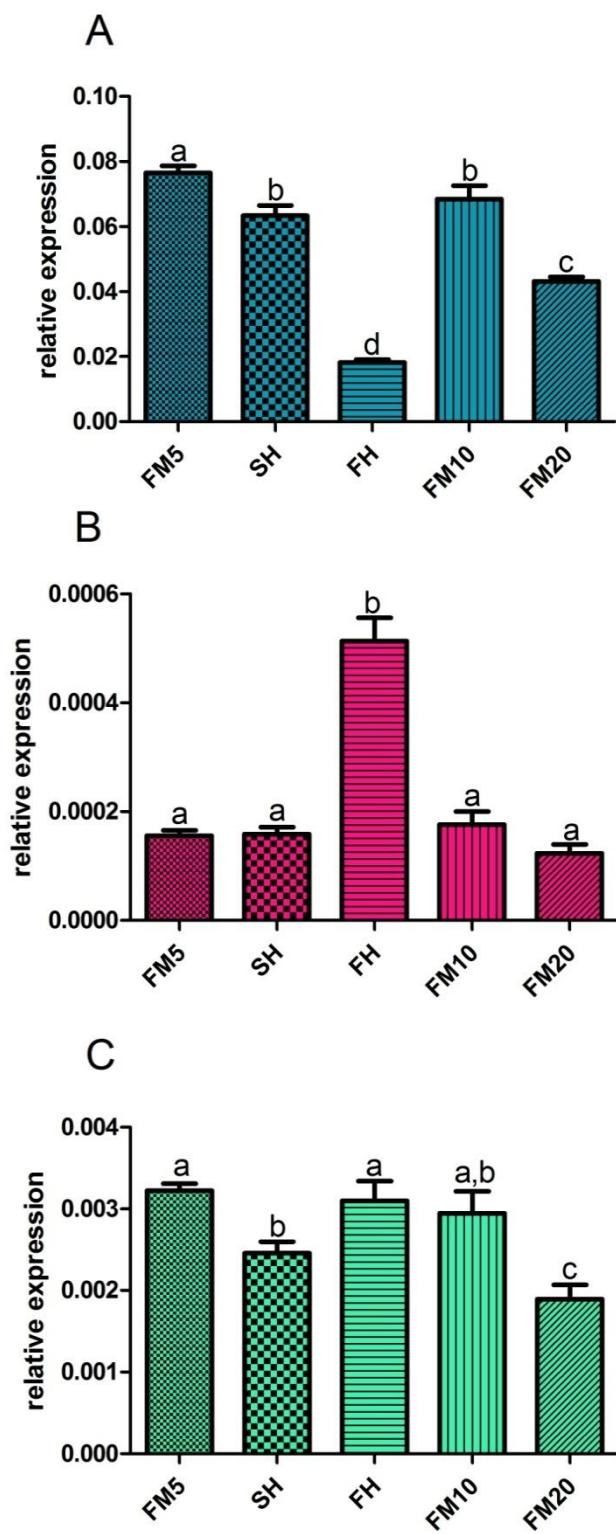


Figure 2: Changes in the relative expression of the PepT1 (A), CaaT (B) and TauT (C) genes in pyloric caeca of sea bass fed with three levels of fish meal (5%, 10% and 20%) or 5% of SH and FH included into the FM5 diet. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis test followed by Student's t-test. Means that do not share a common superscript letter are significantly different (p -value < 0.05)

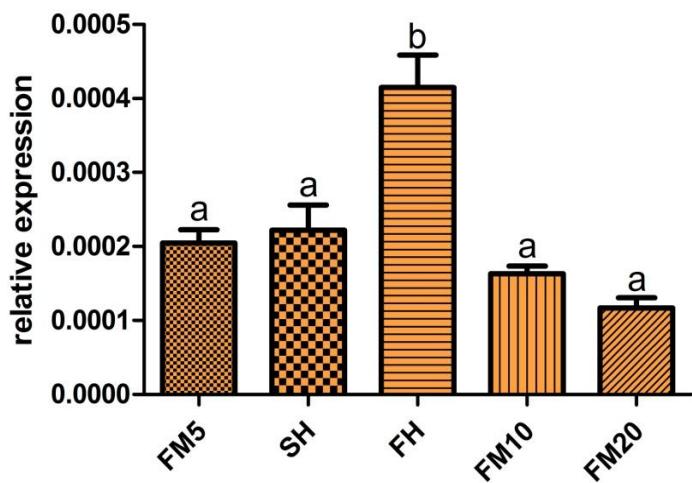


Figure 3: Changes in the relative expression of alkaline phosphatase in pyloric caeca of sea bass fed with three levels of fish meal (5%, 10% and 20%) or 5% of SH and FH included into the FM5 diet. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis test followed by Student's t-test. Columns with the same superscript letter do not differ significantly (p -value > 0.05).

4 Chapitre 2 :

Impact des hydrolysats sur l'intégrité de la muqueuse intestinale et le système immunitaire inné du bar commun *Dicentrarchus labrax*



Les travaux réalisés dans le chapitre précédent ont permis de mettre en évidence une influence du régime alimentaire sur la croissance et l'absorption des di/tri-peptides ainsi que sur l'absorption des acides aminés libres chez le bar commun. Les résultats obtenus ont également montré que l'introduction de 5% d'hydrolysat de tilapia pouvait induire la surexpression de la phosphatase alcaline, un marqueur potentiel de l'intégrité intestinale. L'utilisation d'aliments à forte teneur en farine végétale peut entraîner le développement d'une inflammation du tube digestif chez certaines espèces de poisson contribuant aux mauvaises performances de croissance obtenues avec ce type d'aliment (Van den Ingh *et al.*, 1991). Ce second chapitre a pour objectif d'étudier l'impact des régimes alimentaires à haute teneur en farine d'origine végétale sur la muqueuse intestinale chez le bar commun par une approche histologique complétée par le profil d'expression de marqueurs moléculaires de l'inflammation. En parallèle, l'effet potentiel des hydrolysats sur la muqueuse intestinale et sur le système immunitaire hépatique a été étudié, pour confirmer l'hypothèse émise à l'issue de nos premiers travaux, à savoir un effet protecteur de l'hydrolysat de tilapia au niveau digestif.

4.1. Introduction

L'introduction des farines d'origine végétale dans l'alimentation des poissons d'élevage se traduit généralement par une diminution des performances de croissance. Cette diminution est inversement proportionnelle à leur teneur dans l'aliment lorsque le régime de référence est constitué de farine de poisson de haute qualité (Venold *et al.*, 2012) et s'accompagne notamment, d'altérations du tractus gastro-intestinal. Ainsi, la farine de soja, l'une des principales sources végétales utilisées en aquaculture (Gatlin *et al.*, 2007), entraîne des modifications importantes de la muqueuse intestinale. Ces altérations se traduisent par une diminution de la longueur des villosités, une diminution de la longueur et de la taille des microvillosités, l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires, l'apparition de signes d'entérite ainsi qu'une sensibilité accrue aux infections bactériennes (Baeverfjord et Krogdahl, 1996; Bakke-McKellep *et al.*, 2007b; Heikkinen *et al.*, 2006; Krogdahl *et al.*, 2000, 2003; Merrifield *et al.*, 2009; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005). Toutes ces modifications de la muqueuse intestinale limitent les performances de croissance. La régression des villosités et des microvillosités se traduit par une diminution de la surface d'absorption, particulièrement dans les caeca pyloriques et la partie proximale de l'intestin où la majeure partie de l'absorption des nutriments a lieu (Bakke-McKellep *et al.*, 2000b). De plus, l'apparition d'une inflammation du tube digestif participe à la baisse de croissance (Urán *et al.*, 2008; Nordrum *et al.*, 2000). L'entérite se caractérise par de nombreuses modifications histologiques : réduction de la taille des villosités associée à une diminution de la capacité d'absorption, diminution de la taille et de la densité des vacuoles supranucléaires, amincissement de la *lamina propria* et de la muqueuse sous-épithéliale, infiltration importante de cellules inflammatoires, particulièrement de macrophages, de lymphocytes T et de granulocytes éosinophiles et augmentation du nombre de cellules caliciformes (Baeverfjord et Krogdahl, 1996; Krogdahl *et al.*, 2003; Urán, 2008). Ces changements histologiques s'accompagnent d'une modification de l'expression de gènes associés au système immunitaire tels que les gènes spécifiques des lymphocytes T et des cytokines anti ou pro-inflammatoires (Bakke-McKellep *et al.*, 2007a; Lilleeng *et al.*, 2009; Uran *et al.*, 2009)). Enfin, les farines d'origine végétale induisent des modifications du système immunitaire entraînant une résistance plus faible aux infections (Burrells *et al.*, 1999; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005).

L'introduction de nouveaux ingrédients tels que les prébiotiques, les probiotiques ou les hydrolysats permet de diminuer les impacts négatifs des farines d'origine végétales sur l'intégrité intestinale et le système immunitaire. Les travaux de Marchbank *et al.* (2009) montrent par exemple qu'un hydrolysat de poisson améliore la prolifération des cellules de la lignée HT29 et limite la gravité de l'apoptose induite artificiellement par l'indométhacine. Plusieurs études ont démontré un effet protecteur des hydrolysats contre les infections bactériennes, notamment chez le bar commun et la dorade japonaise (Bui *et al.*, 2014; Kotzamanis *et al.*, 2007).

L'objectif de cette étude est de compléter les résultats obtenus dans l'article précédent (Nutritional and functional performances of two protein hydrolysates in European seabass (*D. labrax*) fed a low fish meal diet. *In prep*) en se focalisant sur l'impact des différents régimes expérimentaux sur la muqueuse intestinale et sur le système immunitaire. Le conditionnement alimentaire a été réalisé dans les mêmes conditions que pour l'étude précédente. Trois régimes expérimentaux, contenant respectivement 5%, 10% et 20% de farine de poisson ont été testés ainsi que deux régimes contenant 5% de farine de poisson et 5% d'hydrolysat de crevette (SH) ou de tilapia (FH). Le développement des villosités intestinales a été mesuré sur des coupes histologiques de la partie proximale et de la partie distale de l'intestin après 65 jours de conditionnement alimentaire. La présence de signes inflammatoires a été vérifiée en histologie et par le suivi de l'expression d'un marqueur de lymphocyte T (TCR- β) et d'une cytokine (TGF- β). Enfin, l'impact des régimes expérimentaux sur le système immunitaire a été évalué par le suivi de l'expression dans le foie de deux effecteurs du système immunitaire inné : le lyzozyme et le complément C3.

4.2. Résultats

4.2.1. Etude histologique de l'intestin

Développement de la muqueuse intestinale

Afin d'évaluer l'impact des régimes expérimentaux testés dans cette étude sur la surface d'absorption intestinale, des coupes histologiques de l'intestin proximal et de l'intestin distal ont été réalisées. Les rapports Diamètre externe/Diamètre interne (DE/DI) et Perimètre interne/Perimètre externe (PI/PE) ont été mesurés dans ces deux zones de l'intestin (Tableau 19). Le rapport DE/DI permet d'évaluer la taille de la lumière intestinale et le rapport PI/PE permet d'évaluer la surface de l'épithélium intestinal en se ramenant à la taille de l'intestin.

Tableau 19 – Etude morphométrique de coupes d'intestin proximal et distal de bar commun nourri pendant 65 jours avec cinq régimes expérimentaux (FM5, SH, FH, FM10 et FM20)*

		FM5	SH	FH	FM10	FM20
DE/DI	prox	4.4±1.4	6.6±2.3	6.2±2.0	6.1±1.9	3.6±1.6
	dist	2.7±1.0	5.2±4.5	5.0±3.9	3.8±1.4	2.1±0.6
PI/PE	prox	6.3±0.8	7.4±1.1	7.1±0.9	7.0±0.5	6.8±0.8
	dist	3.9±0.8	4.2±0.3	3.9±0.4	3.9±0.8	4.1±0.6

* Les valeurs représentent la moyenne ±SEM (n = 9). Une ANOVA a été réalisée.

L'analyse statistique des mesures effectuées indique que l'alimentation n'a pas d'influence sur les paramètres DE/DI et PI/PE. Le taux de farine de poisson dans l'aliment ou l'ajout des hydrolysats n'influe donc pas significativement sur le développement des villosités intestinales et sur la surface d'absorption. Cependant, la forte variabilité entre les individus au sein d'un même groupe expérimental peut expliquer les résultats obtenus à l'issue de l'analyse statistique. En effet, une légère augmentation (non significative) des rapports DE/DI et PE/PI est observée chez les groupes expérimentaux SH et FH, montrant un développement plus important des villosités intestinales et une augmentation de la surface d'absorption chez les animaux nourris avec les hydrolysats.

Inflammation du tube digestif

La présence de signes d'inflammation a été évaluée par une étude histologique au niveau de l'intestin proximal et distal. Le nombre de cellules caliciformes a été mesuré dans des coupes d'intestin au niveau proximal et distal. Une étude semi-quantitative a été réalisée pour évaluer l'infiltration des agrégats lymphocytaires dans la muqueuse, l'infiltration des cellules lymphocytaires et granulocytes éosinophiles dans la sous-muqueuse. Un score est attribué pour chaque individu : 0 (absence du critère), 1 (présence légère), 2 (présence modérée) et 3 (présence sévère). Les résultats sont exposés dans le tableau 20 et correspondent à la moyenne des 9 individus étudiés par groupe.

Tableau 20 – Etude histologique de coupes d'intestin proximal et distal de bar commun nourri pendant 65 jours avec cinq régimes expérimentaux (FM5, SH, FH, FM10 et FM20)

		FM5	SH	FH	FM10	FM20
Nb c. caliciformes	Prox	9.1±1.3 a	14.7±2.3 a,b	14.8±1.5 a,b	11.2±3.8 a	22.7±3.7 b
	Dist	26.3±4.0 a	39.3±4.8 b	34.1±5.2 a,b	31.7±2.4 a,b	41.1±5.8 b
Aggrégat de c. lymphocytaire (muqueuse)*	Prox	0.7±0.2 a	0.8±0.3 a	0.2±0.1 a	0.2±0.2 a	0.0±0.0 a
	Dist	0.2±0.1 a	0.7±0.3 a	0.0±0.0 a	0.2±0.1 a	0.2±0.2 a
Infiltration de c. lymphocytaire (sous-muqueuse)*	Prox	1.1±0.1 a	1.2±0.1 a	1.2±0.1 a	0.0±0.0 a	1.2±0.1 a
	Dist	1.1±0.1 a	1.2±0.1 a	1.6±0.2 a	1.2±0.1 a	1.6±0.2 a
Infiltration de granumocytes eosinophiles (sous-muqueuse)*	Prox	1.0±0.0 a,b	1.3±0.2 a	0.7±0.2 b	1.0±0.0 a,b	0.9±0.2 a,b
	Dist	1.0±0.0 a	1.4±0.2 b	0.8±0.1 a	1.0±0.0 a	0.9±0.1 a

* Mesures semi-quantitatives ($n = 9$) : 1-légère, 2-modérée, 3-sévère. Le traitement statistique est réalisé avec une ANOVA suivie d'un test de Tuckey. Dans une ligne, les valeurs qui partagent la même lettre ne diffèrent pas significativement

L'augmentation du taux de farine de poisson dans l'aliment entraîne une augmentation significative du nombre de cellules caliciformes au niveau de l'intestin du bar aussi bien dans les parties distales que proximales (Fig.45A). L'inclusion de 5% de SH entraîne une augmentation de nombre de cellules caliciformes dans les deux portions examinées, cette augmentation est significative dans la partie distale.

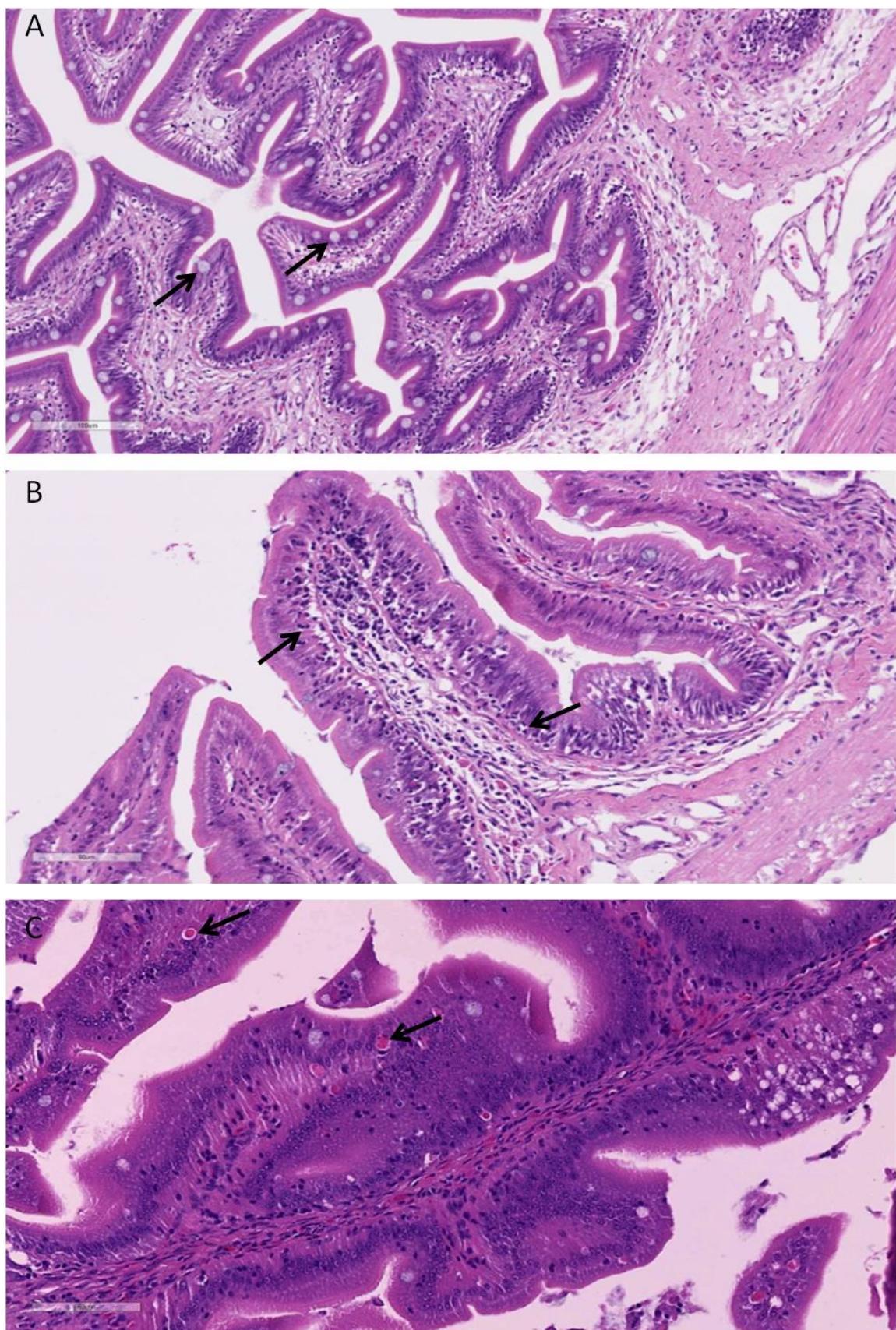


Figure 45 – Coupes histologiques de l'intestin colorées par l'Hématoxylène-Eosine au grossissement x20. A : Nombre élevé de cellules caliciformes (indiquées par les flèches) au niveau d'une coupe d'intestin proximale du groupe FM20. B : Infiltration modérée de lymphocytes (flèches) dans la muqueuse de l'intestin distal du groupe FM20. D : Infiltration de granulocytes éosinophiles (flèches) dans la sous-muqueuse de l'intestin proximal du groupe SH.

Le nombre de cellules caliciformes dans l'intestin des poissons nourris avec 5% de FH n'est pas significativement différent de celui observé dans les groupes 5FM, 10FM et 20FM. Aucun signe d'inflammation sévère n'a été observé dans aucun groupe. Aucune influence significative du régime alimentaire n'est mise en évidence sur la densité des agrégats lymphocytaires dans la muqueuse et la densité de cellules lymphocytaires dans la sous-muqueuse.

Néanmoins, la densité de cellules lymphocytaires dans la sous-muqueuse au niveau distal semble légèrement supérieure chez les groupes FM20 et FH (Fig.45B). De même, la présence de granulocytes éosinophiles est supérieure chez le groupe SH comparé au groupe FH dans la partie proximale et distale (Fig.45C). Cette tendance laisse supposer un effet bénéfique des hydrolysats sur la santé intestinale chez le bar.

4.2.2. Etude de l'expression de marqueurs de l'immunité

Choix des marqueurs et validation des amorces de qPCR

Afin de conforter les informations apportées par les observations histologiques des coupes intestinales, l'expression de deux marqueurs de l'inflammation a été mesurée dans la partie distale de l'intestin. L'un des signes majeurs de l'inflammation intestinale étant une forte infiltration de lymphocytes T dans la muqueuse intestinale, le TCR- β , un récepteur présent à la surface des lymphocytes T a donc été choisi pour évaluer la densité de lymphocytes T par qPCR. Une cytokine anti-inflammatoire, le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) a également été suivie, cette dernière étant surexprimée lors du développement d'une entérite chez la carpe (Urán *et al.*, 2008). Les séquences nucléotidiques de ces deux marqueurs sont disponibles dans la banque de données NCBI. Ces séquences ainsi que les amorces sont présentées dans les Figures 46A et 46B.

Deux effecteurs principaux du système immunitaire inné, le complément C3 et le lysozyme (Sunyer et Lambris, 1998; Rauta *et al.*, 2012), ont également fait l'objet d'un suivi d'expression par qPCR, ces marqueurs étant particulièrement intéressants pour étudier l'effet immunostimulant d'un aliment dans un contexte de conditionnement alimentaire (Liu *et al.*, 2012; Reyes-Becerril *et al.*, 2008). Ces deux protéines sont majoritairement exprimées dans le foie chez des animaux sains ou lors d'une infection bactérienne (Bayne et Gerwick, 2001; Pushpa *et al.*, 2014). Leur séquence, disponible sur NCBI, ainsi que les amorces designées pour la qPCR sont présentées dans les figures Figures 46C et 46D. Toutes les amorces utilisées dans cette étude ont été validées et l'efficacité de chaque couple a été déterminée (Figure 47).

A >gi|120865334|emb|AM421619.1| *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for transforming growth factor-beta (tgf-beta gene)

```
GACCTGGGATGGAAGTGGATACATAAGCCAACGGGCTACCATGCCAACTACTGCATGGGTCTGCACCT
          ↑
ACATCTGGAACGCTGAAAACAAATTCTCAGATTCTGCCTGTATAAGCATCACAAACCCAGGAGCCTC
TGCCCAGCCCTGCTGTGTTCCCCAGACACTGGAGCCACTGCCAATCCTCTACTATGTGGGAGGCAACAC
          ←
AAGGTGGAGCAGCTG
```

B >gi|21748154|emb|AJ493441.1| *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for T-cell antigen receptor beta chain

```
GAAAAAGACAAAGAGATTACCGGACCATCAGTGAAAGTGCTTCAACCTCGCCAAAGGAGTGCAAAATG
AAAAAGACAAACAAAGGAAGAAGACCTGGTTGTGTGCCAAAGACTTCTACCCAGACCATGTCAGTGT
ATCCTGGAGATCAATGGCAAAATGTCACTAATGGTGTGGC GACGGACGAAGCTGCCA GCTGATGCCG
          ↑
GAAAAGAAGTTTACCAAATCACCAGCAGGTTGAGGGTACCTGCCAAAGACTGGAAAACCTCAGATAATG
AATTCAAGTGCATTGCAATTCTCAATAAAACCCATACTGTCCTTACACAGATTCAATCTATGGTGA
AGCTGTGACAACAGCAAATGTCATGACAAGAGAGAAATATG TGAAGATCACACAGGCTGCC AACTCACA
          ←
TACAGTGTGTTCATGCCAAGAGCTGCATTACGGGCCTTGTGGTGTGTTCTGGTGTGAAAGCTTCAGG
GTTCAAAGGGAAAGCAGAACTACTGAGAGCTGAGGCCAACTCTATTCTAGGAGATCTAGAAGAAGATGTT
GGTTCTGTAATAAAGGCTGAAACTTTCACAACTTGTATATTGAAGTGCAATTGCAATTACTC
AATTACATAATCTAATTCTGCTAAAATAGATGAACAGTTCTAAACATATTATTTTTAATCTCAAAGCT
GCTTGGCATTACATTGATAAAACTTAGAATAATAATCCTGTGTTGTAGAGCGCTTGTGTTGCTTAAT
ATTCATCTAAATAAAAACCTTCAGAGGAAAAAAA
```

C >gi|375340654|emb|FN667957.1| *Dicentrarchus labrax* mRNA for lysozyme g protein

```
AGAGAGAGAGAGAAGACTGTGTTGCAGCTCATCCAGTTGAAATACAGCAGCAGAAGAGGAACAGGAAG
ATGGCTTATGGAAATATCATGAGAGTTGAAACTACCGGTGCTTCATGCCAAACATCTCAGCAGGACAGTC
TGGGATACTCAGGTGTGAAGGCATCACACACCAGGCACAGACTGATGCAGGCAGAATGGAAAAGTACAG
GTCTAAAATCAACAAAGTAGGAGGAAGTTGGAATTGATCCGCTCTCATTGCTGCCATCATTCCAGA
GAATCCAGGGCTGAAATGCACTCACTAATGGCTGGGAGATGGGTAATGCCT GGGGACTGATGCAGG
          ↑
TTGAT GTTAATCCAATGGAGGTGGACACACTGCACAGGGTGCAGGGACAGTGAGGAACACCTCAGGCA
          ←
AGCGACCGGGATCTGGTTAATTATCAAACGGAT CCGCAACAAATTCCCTGGCT GGAACACAGAACAG
CAGCTTAAAGGAGGGATCGCAGCCTACAATATGGGGATGAAATGTCATTCTATGAACGTGTGGATG
GCTGCACAACAGGTGGAGACTACTCCAATGATGTTGCCAGAGCTCAGTGGTACAAAACATAAAGAAA
CTTTAACAGCTGAAGGTGTGCCACAACACATTATCAGGAAATCCTACAAATCATAAAGAAAACACT
CTGTAATGTGTGCTGTGCGCCAATAAACAGAACAGCA
```

D >gi|339269294|gb|HM563078.1| Dicentrarchus labrax complement component c3-1 (C3) mRNA, complete cds

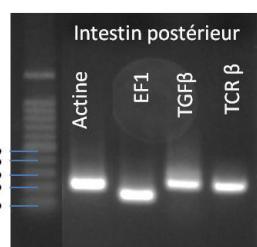
```

ATGAGTAGGACTCTGTTGGCTTGTGGCCTCTGGCCCTTGCCCTCGCTCACTTCTGGCTGATGGAGCTCCATTGCAGGTGATG
TCTGCCCTTAACTGTGCGGGTAGGAACACCAGAAAACATCTTGTGGAGTGTCAAGACTGCACAGGGAGACATCAGGGTCGAT
ATCAAAGTGTGAAATCATCCAACCAAAACAAAGAATGCCAACACATCTGTGACCCCTACTACAGCAAACAACTTCCAGGAATTG
GACAATTAAAGATCCCTGCTGACTTCAGCAAAGATCCCAGCATTAAACAGTATGTGACCTGCAAGCTCGGTTCCGTACCGAC
TGCTAGAGAAAAGTCGTCTTAGTGTCCCTCCAGTGTGGGATCATCTCAGACTGACAAGACCCCTCTATACCCCAACAGCAAAG
TTTATTACAGGATGTTGACTGTCCCCGATGGAGCTGTAGAGAGGACCTGAGAGGAACTGACACTTATATTGCCATTG
TATTGTGACCCCTGAAGACATAATTTCACCATTCATCCGGTCTCTGTGAAATCAGGGATCCACTCTGGACGTTACCAACTTGGTGC
AATTGTCACTGCCCCAGTTGAGGTGAAACTGATACTGGCAGGCTCATCTCTATGTGGACAGTGAAGAGGCTCAAAGTCAACATCAA
ATATGTGCTGCCAGTTGAGGTGAAACTGATACTGGCAGGCTCATCTCTATGTGGACAGTGAAGAGGCTCAAAGTCAACATCAA
AGCTACGTATCTGTTGGTGAAGAGGTGAATGGTATGGCCTACGTGTTATTGGG
GTTATACAAGAGGGCAAAAGCAGAGCTTCAAGAACACTCTCAGAGAGTGCAGATTGAGAGTGGTAATGGAGAGGTACACTGAGG
AGACAGCACATCAGGACACTTCAGAAACATCCAAGAACACTGGTGGGGAGTTCATTTGTAGCTGTGAGTGTGACGGAGAGC
GGTGGTGAATGGTGGAGGAGGTTGAGAGGTATCCAGATTGTGACGTACCCGTACACCATCCACTTCAGAAGAAAACCTCCAAATAC
TTCAAACCCAGGGATGGCTTCATCTTAAGGTTGAAGTCTGTAATCTGTGACACTCTGCAACAAGGTGTTACAGTGGTGGTCAAC
CTTGGCCAGGTGACGGTCTTCACTGCAGCAATGGCATGGCAAGACTTCCCATCAATACAGAGGCAAGGACTGACAGACTGACAATT
ACCGCAAAGACCAGTGTGCTTACGGCTGAAAGACAAGCATCAGGCCACCATGGTAGCTCTCCCATATAACCCAAAAGCAAC
AATTACATCCACATAGCTGTGGAGGAGCAGCTGAAGTAACATTGGGGAAAACCTGAGGTTAACCTCATCTCAACAGGCCATACAA
AAGGACGTCAACATACCTGATCTGAACAGAGGTGAGCTGCTGAAATATGGCGTTATAAGACGAGGAGGCAAGTACTGATTTCCGT
GTAGCTCTGTCAACAAAGAAATGCTGCCATCGTCCGATCTAGCCTACTACCATACAAATAACATGAAGTGGTATCAGACTCT
GTGTGGGTGGATGTCAAGGACTCCTGCATGGCTCGTTGAAGCTGGAACCATCGAGACCCGCTCCATCGTATGAACCTCGCAGGATG
TTTGGTCTGAAGGTCACTGGAGACTCAGAACCCAGTGGGTCTGGTAGTTGACAAAGGGGCTACGTCTAAACGTGAACAAG
CACCGCTCACACAGAAAAGGTGTGGGACATTGTACGAAGTACGACACAGGCTGCACACCAAGGTGGAGGGAGGACAGCATGAAT
TCGATCTATGATGCTGGCTGTTGAGTCCAGTACGGCTTCTGGACTCCCATCAGACAAGAATTGAAGTGTCCATCCCCGAGC
AGGAGAAGAAGAAACACTATAATGGAGGTACCCAGTTAGTGGAGGACTATAAACGCAACTGCAACGTGACTGTTGTTGAAT
GGCATAAAGGACATTCCGTTTACACCTGTCAGAGGGCAGTGGAGTACATCACAGACGGTGCAGCTGTGAGGGCCTCTCG
CATTTGGTGAAGGAGATGGAAAGGCCAGCAGTGGAGGAGGACAACCTCCAACTGGCTGAGTACAGTGGCTGAGTACATGGAC
AGCAATGAAATAGTTCTCGCACCACACTCCCTGAAAGTGGCTGTGGAGAGATATCAAACACTGCTGCTTGCCTGACAAACACCG
AACTGTGACACCAACATCATTGTGAAAATTTCTTGTGAAAGACTCAGTACACCTGGCTGAGTACATGGCAGATCTGGCTTGTGAGA
ACTCACGGTATCTGTGTCGGCAGTCCATTAGAGCTATTGTGGAGGATTCTTCATTTGATCTCAAACACTGCTGAGTCTGTTG
CGTGGAGAGCAGCTGGAAATTAGGCTATCTTCCACAACACTACAGCCAGATCCTATACTGTGCGCGTGGATCTGAGGAGGAA
CATTTGGTGCAGCTCAGCATGGAAAGTATGCCAGGGAGTTAAAGTGGCTTAAAGCAGCTGTTAAGGACTCATCGCTCAATTATGGAATCCTGAAGGTG
ATTATTCCCATAAAAGGAAGGACAATATCATATTGAGGTTAAAGCAGCTGTTAAGGACTCATCGCTCAATTATGGAATCCTGAAGGTG
CTGCGGGTGGTGCCTGAAGGCATACTGACAAGATCCTCAAGGATTATAACACTAAACAGCTCAGAATGGTGTAGATGGTATACAA
GAGGAAATTATCAACAATGAAAATTCTCTGAAAGATTGTTCCAAACACACCTGCAAGCACACTGATCTGTGACAGGAAGAGAG
CAGTTAAGTGGACCAAGTGGAGAACGCCATTAGTGGGAACTCCATGGGTTCTGTGATCTACAGCCCTCAGGCGATGGAGAGGCTAAC
ATGATCCACATGACCCCTGCTGTCAATTGCAACCATATATTGGACAAAACCAACCAGTGGGATCTGTGGGTTGGAGAACAGTAC
GAAGCCCTCCAATACATCAGAACACTGGCTATAGAACGAGCTTGCCTCGTAAAGTGTGGGTTTTGCTGTTTACAGTCG
CCAAGCAGCACCTGGTGCAGCTTATGTCAGGCTGTTGCAAGGAGGATCTGTCAGGCTGAAATGCAACAGTCATCTGT
GATGCTGTCAAGTTCTGATTCTCAATGCAAGCAACTGACGGCATGTTAGAGAAGTGGAAATGTGTTACATGGAGAGATGTG
GGAGATGTGCGCCTGATAGTCACTGCTCCCTGACGGCTTCTGTGCTTGCCTCATGGCTCATGCGAGGCTCACGACGATTTGTGCGC
ACTATTAAATAGTCTGCCAGGAGTATAGACAAAGCAGTGGCTTACCTGGAGAAGCGTCTGCCAGGCTCACCAACCCATATGCTGTT
GCCATGACATCCTACGCCCTGGGAAATGAAAACAAACTGAAACCTGGTATCTCTACAAGTTGCTTCCCAGAGTTGTCCTTAC
CAGGTACCTATGGGACGTGTTCAACTGGAGGCCACAGCTTACGCTCTCTGGCTCTGGTCAAGGCCAGGCTTGAAGAAGCC
AGACCTGTTGTCAGATGGTCAACAAACAAGGGAGAGTGAATGGAGGCTATGAATCAACTCAGGCCACCATTAAGGTGTACGAGGCT
ATTGCTGAGTACTGGCCAGTCTAAAGAAAAGAGTATGATCTGAATGTGGACATCTGTTGCTGCCAGGCAGGTCAAAGTCTGACAAG
TACAACTTAACATTGAAAATCACTTACACACAAGACATCTAAACAGGATATAACAGGATGTGAAAGTGTACGCCACGGC
ACAGGAGAAGCAACAGTGCACATGGTGCCTATATTACGCTCTGCCTAAAGAAAAGGACTGTCAGAGGTTAATATGTCAGTGCAG
CTCATTCCAGAGAAAATGGATGAGGATGAGAAGATATATAAACTGAGAATAGAGGTTTGTTGATAAGGACAAGGACATGACGCAACC
ATGACAGTGTGGATATTGGCTGTTAACGGCTTACCGTTAACACAAATGACCTGAGCTTATTGTCACAGGACGTGCCCCGTACT
ATTTCAAAATATAACATGAAGACTGTCCAGTCAGAAAGAGGCTCACTCATCTACCTGGACAAAGGTGTCACACACGACAGAG
GAGATCATGTTAGGATGCTACAGAACAGTGGGTTCTACACCAAGCTGCTGCTGCTGCTATGAACCCAAACCATCAACATAC
ACAACACCTTGTGAAAGTTCTACCATCCAGAGGAGAGGCCAGCAGCTCTGCGCTCTGTGAGAATGATGTATGCAACATGTGCT
GAAGAGAAGTGCAGTATGCAAAAGAAGAACACATCAGTAATGATGAGGCGACTGCTAAGACCTGTGAGAGCTCAAGTGAACAGCAA
ATAGAGTTTGTGTCAGGAGTACAGAGTTACAGAGTGGTTCTGAGTACAGTGGCTTACCTGACATACAGTGCAGGGTAATGGAGCATC
AAAGAAGGAAATGATGATGTCGGGCTGTGGGTAAGGTGCGCATATTCTCAGTTACACACTGCAAGAGCTTGTAGATCTAAGA
AGAGGCAAAACGTACCTTATCATGGGACATCCAGAGATATTTCATGGAGAACAGAGTCAAAACACTGCTATCTGTTGGGATTAAGGACATGGCC
CAGCAATACAAACTCAAAGGATGTCAGCAATAGAGAAAGGGATGGAATGAAATGTCCTTATTGTCATTATTCTGTAACACTA
ATTACAGTGTAAATTAGCACATATGGGATCAATAAAATAATCATGGCCA
```

Figure 46 – Séquences et positionnement des amorces (flèches bleues) utilisées pour le suivi de l'expression en qPCR dans le foie ou l'intestin des marqueurs : (A) TFG- β (AM421619), (B) TCR- β (AJ493441), (C) lysozyme (FN667957), (D) Complément C3 (HM563078)

A

Gene et N° d'accession	Amorces	Séquences 3'-----5'	Taille de l'amplicon (pb)	Efficacité du couple d'amorces
Actine (AJ537421)	Actine sens	ACGTTGACATCCGTAAAGAC	214 pb	101 %
	Actine antisens	ATCCACATCTGCTGGAAGGT		
EF-1 (AJ866727)	EF-1 sens	GCTTCGAGGAAATCACCAG	153 pb	100.9%
	EF-1 antisens	CAACCTCCATCCCTTGAAC		
TGF-β (AM421619)	TGF-β sens	GACCTGGGATGGAAGTGG	225 pb	93.4%
	TGF-β antisens	CAGCTGCTCACCTTG		
TCR-β (AJ493441)	TCR-β sens	GACGGACGAAGCTGCCA	230 pb	93.1%
	TCR-β antisens	TGGCAGCCTGTGATCTCA		

C

B

Gene et N° d'accession	Amorces	Séquences 3'-----5'	Taille de l'amplicon (pb)	Efficacité du couple d'amorces
Actine (AJ537421)	Actine sens	ACGTTGACATCCGTAAAGAC	214 pb	104.9 %
	Actine antisens	ATCCACATCTGCTGGAAGGT		
EF-1 (AJ866727)	EF-1 sens	GCTTCGAGGAAATCACCAG	153 pb	104.9%
	EF-1 antisens	CAACCTCCATCCCTTGAAC		
Complement C3 (HM563078)	C3 sens	CCTCGCAGGATGTTGGTCT	156 pb	100.4%
	C3 antisens	GCAGCCTGTGCGTACTTCT		
Lysozyme (FN667957)	Lysozyme sens	GGGGACTGATGCAGGTGAT	141 pb	105.6%
	Lysozyme antisens	AGCCAGGAAATTGTTGCGG		

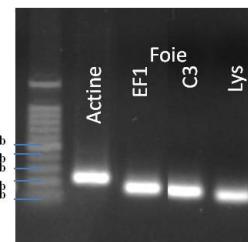
D


Figure 47 – Validation des amorces utilisées en qPCR dans l'intestin et dans le foie. La séquence des amorces, la taille de l'amplicon ainsi que l'efficacité de chaque couple sont présentées dans le tableau B pour les marqueurs de l'inflammation intestinale et dans le tableau D pour les marqueurs du système immunitaire dans le foie. Les fragments obtenus après amplification ont été déposés sur gel d'agarose pour vérifier l'absence de dimère d'amorces ainsi que la taille de l'amplicon obtenu (A et D).

Profil d'expression de deux marqueurs de l'inflammation dans l'intestin

L'étude de l'expression de la cytokine TGF- β dans la partie distale de l'intestin ne révèle aucune influence significative du régime alimentaire (Figure 48). L'expression du TCR, marqueur de lymphocyte T, augmente significativement quand le pourcentage de farine de poisson contenu dans l'aliment augmente. Une légère augmentation de l'expression du TCR est également observée chez le groupe FH, néanmoins cette différence n'est pas significative par rapport aux groupes FM5, FM10 et FM20.

Le profil d'expression du TCR confirme les observations histologiques suggérant une infiltration de lymphocytes T dans la muqueuse plus importante dans le groupe FM20.

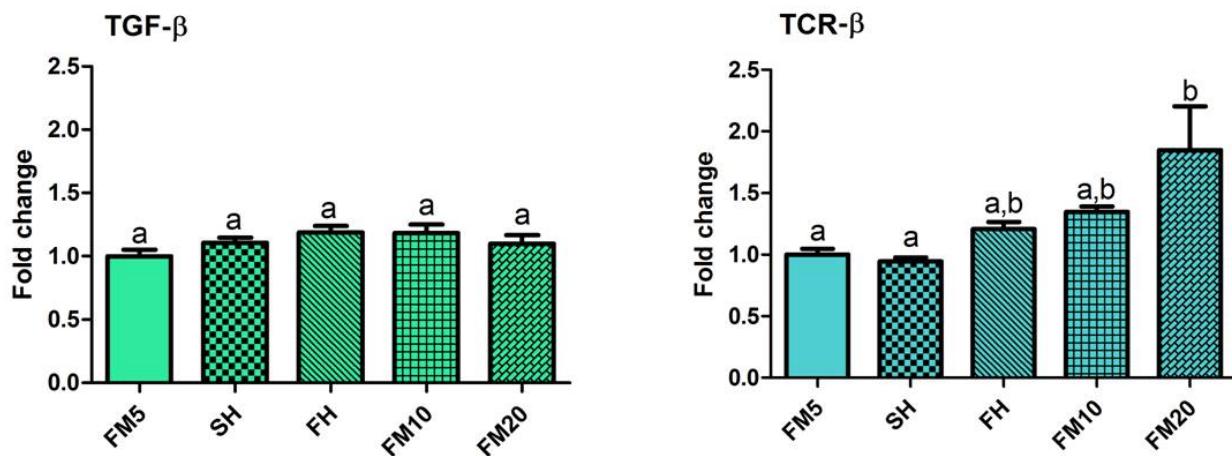


Figure 48 – Niveau d’expression de TGF- β et TCR- β dans la partie distale de l’intestin chez le bar commun nourri avec les régimes expérimentaux FM5, FM10, FM20, SH et FH pendant 65 jours. L’analyse statistique est réalisée par un test de Kruskal-Wallis suivi d’un test de Student. Les colonnes partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

Profil d’expression de deux marqueurs du système immunitaire inné dans le foie

La teneur alimentaire en farine de poisson a une influence significative sur l’expression du complément C3 (Figure 49), une diminution de la teneur en farine de poisson à 5% entraînant une diminution significative de son expression. Une diminution similaire est observée dans le groupe nourri avec l’hydrolysat de crevette. Le niveau d’expression du complément C3 dans le groupe nourri avec l’hydrolysat de tilapia est identique à celui observé dans le groupe FM10 et FM20. Aucune influence significative du régime alimentaire n’est observée sur l’expression de lyzozyme dans le foie.

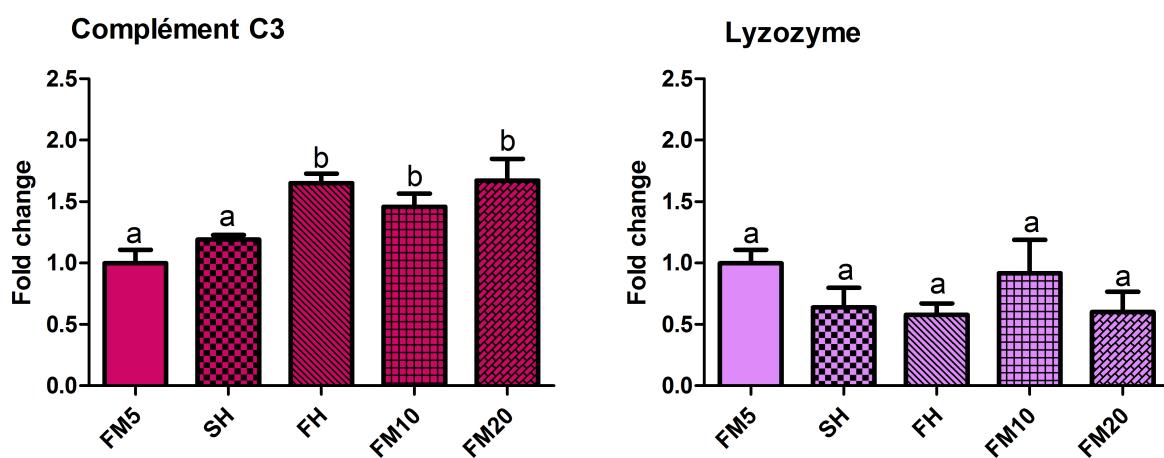


Figure 49 – Niveau d’expression du complément C3 et du lyzozyme dans le foie chez le bar commun nourri avec les régimes expérimentaux FM5, FM10, FM20, SH et FH pendant 65 jours. L’analyse statistique est réalisée par un test de Kruskal-Wallis suivi d’un test de Student. Les colonnes partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

4.3. Discussion

4.3.1. Impact de l'alimentation sur le développement et la qualité de la muqueuse intestinale du bar commun

Dans cette étude, les résultats obtenus par le suivi histologique de l'intestin ainsi que par le suivi de l'expression des marqueurs TCR- β et TGF- β démontrent que le bar commun peut relativement bien s'adapter à des aliments à faible teneur en farine de poisson (5%). En effet, si plusieurs signes de l'inflammation intestinale induite par les farines d'origine végétale ont été examinés dans cette étude, les résultats montrent que les fortes teneurs en farines d'origine végétale dans l'aliment n'ont pas eu d'effets négatifs sur le développement des villosités, l'infiltration de cellules immunitaires (lymphocytes et granulocytes éosinophiles) dans la paroi intestinale et sur l'expression de la cytokine TGF- β . L'induction d'une entérite par les farines d'origine végétale et en particulier par la farine de soja ainsi que son degré de sévérité semblent être spécifique. En effet, des études montrent que les salmonidés sont particulièrement sensibles à ces infections, la truite arc-en-ciel étant l'espèce la plus sensible, comparée au saumon de l'Atlantique (Nordrum *et al.*, 2000). Chez les non-salmonidés, différents auteurs attestent de l'absence d'entérites, notamment chez la morue (*G. morhua*), le flétan de l'Atlantique (*H. hypoglossus*), le poisson chat (*I. punctatus*) et la sole Egyptienne (*S. aegyptiaca*) (Refstie *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2005; Bonaldo *et al.*, 2006). Le bar commun, comme ces espèces, semble donc être plus tolérant aux aliments à haute teneur en farines d'origine végétale comme en témoigne l'absence de signes inflammatoires 65 jours après le début de l'alimentation. Toutefois, ces résultats mériteraient d'être approfondis par des expériences complémentaires sur d'autres lots de poissons et d'aliments car des essais précédents réalisés par Aquativ ont mis en évidence à plusieurs reprises un impact négatif des aliments riches en matières premières végétales sur la qualité de la muqueuse intestinale (Fournier V., communication personnelle). Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude semblent démontrer que les performances de croissance plus faibles induites par le régime FM5 (Nutritional and functional performances of two protein hydrolysates in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed a low fish meal diet. *In prep*) ne proviennent pas d'un phénomène de malabsorption des nutriments en conséquence d'une diminution de la surface d'absorption ou d'une inflammation du tube digestif.

Par ailleurs, l'étude histologique ainsi que le profil d'expression des marqueurs immunitaires (TCR- β et TGF- β) mettent en évidence une densité de lymphocytes dans la paroi intestinale plus importante chez les groupes FM20 et FH. Bien qu'une forte augmentation de la densité de cellules immunitaires puisse être associée au développement d'une entérite, en l'absence d'autres symptômes, la légère augmentation du nombre de lymphocytes détectés dans cette étude suggère plutôt une stimulation du système immunitaire. En effet, la présence de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale est un phénomène normal. Les agrégats lymphoïdes forment le

GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), l'une des composantes du système immunitaire (Rombout *et al.*, 2011). La densité de ces cellules peut être modulée par l'alimentation. Pichietti *et al.* (2009) montrent que l'administration de probiotiques entraîne une augmentation de la densité de lymphocytes T dans la muqueuse intestinale ainsi qu'une augmentation de l'expression du TCR- β au niveau de l'organisme entier. Cette stimulation du GALT par les probiotiques serait l'un des effets protecteurs de ce type d'additifs (Lazado et Caipang, 2014). Une augmentation de l'expression du TCR- β est également rapportée dans l'intestin de la daurade royale, *S. aurata*, nourrie par un aliment supplémenté en levure *D. hanseii* (Reyes-Becerril *et al.*, 2008).

Cette étude montre pour la première fois, un effet des hydrolysats protéiques semblable à celui des probiotiques, l'hydrolysat de tilapia stimulant l'infiltration des lymphocytes T dans la paroi intestinale suggérant une action immunostimulatrice de l'hydrolysat de tilapia.

4.3.2. Impact de l'alimentation sur le système immunitaire inné du bar commun

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les régimes expérimentaux semblent moduler l'expression du complément C3 mais pas l'expression du lysozyme. La diminution du taux de farine de poisson dans l'aliment à 5% entraîne une diminution significative de l'expression du complément C3 par rapport aux régimes FM10 et FM20. L'ajout de 5% d'hydrolysat de tilapia dans le régime FM5 permet de rétablir l'expression de ce marqueur au niveau de celle observée dans le groupe FM20. Ces résultats suggèrent qu'une trop forte teneur en farine d'origine végétale dans l'aliment inhiberait le système immunitaire et que l'ajout de 5% de l'hydrolysat de tilapia permettrait de restaurer les fonctions immunitaires.

D'autres ingrédients ont également montré des effets immunomodulateurs chez les poissons. Des études menées sur l'ajout de probiotiques dans l'alimentation démontrent qu'ils induisent une augmentation de l'activité du complément C3 associée à l'amélioration de la survie. La supplémentation en extrait du champignon *I. obliquus* entraîne une augmentation de l'activité du complément C3 dans le sérum associée à une augmentation de la survie chez des animaux infectés par *U. marinum*, (Harikrishnan *et al.*, 2012). L'ajout de levure *D. hanseii* dans l'alimentation de la daurade royale *S. aurata*, entraîne une surexpression du complément C3 dans le foie (fold change 5), le rein et l'intestin (Reyes-Becerril *et al.*, 2008). L'impact de l'hydrolysat de tilapia sur le système immunitaire apparaît néanmoins plus faible que celui obtenu avec la levure *D. hanseii* comme en témoigne la surexpression limitée du complément C3 (fold change 1.5) et l'absence de régulation de l'expression du lysozyme. Cependant, une étude précédente incluant un hydrolysat de crevette et un hydrolysat de tilapia provenant du même fabricant, ne montre aucune modification de l'activité du lysozyme dans le plasma chez la daurade japonaise mais met en évidence un effet protecteur significatif de l'hydrolysat de tilapia face à une infection provoquée par *E. tarda* (Bui *et al.*, 2014).

4.4. Conclusion

Cette étude démontre qu'une alimentation riche en protéines d'origine végétale n'a pas d'effets délétères sur la qualité de l'épithélium intestinal chez le bar commun, *D. labrax*. En effet, l'alimentation durant 65 jours avec un aliment riche en farine végétale et ne contenant que 5% de farines de poisson n'entraîne pas d'altérations de la muqueuse intestinale ou d'inflammation dans la partie distale de l'intestin. Toutefois, certains marqueurs de l'immunité semblent être impactés négativement par l'incorporation croissante de farine végétale dans les aliments. Cette réponse peut être reliée au plus faible taux de survie observé dans le chapitre précédent chez les animaux nourris avec le régime FM5. Les conséquences sur le long terme d'une alimentation riche en matières premières d'origine végétale pourraient donc être une plus faible résistance aux pathogènes et aux facteurs environnementaux soumis à de fortes variations en conditions d'élevage. Par ailleurs, bien que dans cette étude, le développement des villosités ne semble pas être sensible à l'introduction d'hydrolysats dans l'aliment, une augmentation du nombre de lymphocytes T dans la muqueuse intestinale et une stimulation du système immunitaire hépatique sont observées en présence d'hydrolysats. En effet une augmentation de l'expression du complément C3 au niveau hépatique est observée chez les poissons nourris avec l'hydrolysat de tilapia, équivalente à celle observée chez le groupe FM20 suggérant une action immunomodulatrice de l'hydrolysat de tilapia. Ces résultats préliminaires seront approfondis dans le cadre d'un nouveau conditionnement alimentaire avec les aliments testés précédemment, associé à un challenge bactérien. L'impact de ces différents régimes expérimentaux sur la survie ainsi que sur le système immunitaire du bar après injection d'un pathogène (*V. anguillarum*) sera étudié dans sa globalité en associant des études histologiques, sérologiques et moléculaires incluant une analyse différentielle des transcriptomes hépatique et rénal au cours de l'infection.

5 Conclusions

Grâce aux expériences de conditionnement alimentaire, l'intérêt de l'hydrolysat de crevette et de l'hydrolysat de tilapia comme ingrédient pour l'alimentation des poissons d'élevage a pu être démontré. En effet, les deux études montrent que les matières premières d'origine végétale ont un effet négatif sur l'appétence des aliments et l'état général de santé chez le bar mais que ces paramètres peuvent être restaurés en partie ou en totalité par l'incorporation d'hydrolysat.

La première expérience ciblée sur les performances zootechniques et l'influence des régimes expérimentaux sur les capacités d'absorption intestinale du bar commun, montre que la substitution de 15% de farine de poisson par 5% d'hydrolysat permet de maintenir un taux de survie, un taux de croissance spécifique et une prise alimentaire comparables à ceux obtenus avec les aliments contenant 20% de farine de poisson. De plus, les performances de croissance obtenues avec l'hydrolysat de crevette semblent légèrement supérieures à celles de l'hydrolysat de tilapia bien que cette différence ne soit pas significative.

Une augmentation de la prise alimentaire est observée pour les deux régimes contenant 5% d'hydrolysats par rapport aux régimes FM5 et FM10. Les hydrolysats étudiés permettent donc d'augmenter l'appétence des aliments et ainsi les performances de croissance observées.

De plus, le rôle de l'alimentation dans la modulation des capacités d'absorption des acides aminés libres et des di/tri-peptides est également mis en évidence. En effet, une augmentation de la teneur en farines d'origine végétale, moins bien adaptée à l'alimentation des poissons carnivores, induit une surexpression du transporteur PepT1 et du transporteur de la taurine (TauT) dans les caeca pyloriques. L'interprétation de ces résultats est délicate mais l'hypothèse de la mise en place d'un mécanisme de compensation pour faire face à la baisse de qualité de l'aliment est à prendre en compte. L'inclusion de 5% d'hydrolysat de crevette dans l'aliment FM5 ne modifie pas l'expression des transporteurs PepT1, CaaT et TauT par rapport aux niveaux d'expression observés dans le groupe FM10. Ces deux régimes, contenant 10% de protéines d'origine « marine » (organismes aquatiques) entraînent des profils d'expression similaires suggérant que c'est l'origine des protéines (marine vs végétale) et non pas leur statut d'hydrolyse, qui est le facteur qui influe sur les capacités d'absorption intestinale.

Cependant, l'inclusion de 5% d'hydrolysat de tilapia dans le régime FM5 ne conduit pas à de telles observations. Une diminution significative de l'expression de PepT1 ainsi qu'une augmentation significative de l'expression de CaaT par rapport à l'ensemble des autres groupes expérimentaux sont en effet observées, suggérant que l'absorption des acides aminés libres est privilégiée par rapport à celle des di/tri-peptides. Or, l'absorption des acides aminés libres est moins rapide et plus coûteuse en énergie que celle des di/tri-peptides (Daniel, 2004), ce qui

pourrait expliquer les performances de croissance légèrement en retrait obtenues avec l'hydrolysat de tilapia. Ces résultats témoignent de l'importance du profil peptidique de l'hydrolysat dans les performances de croissance.

Des travaux complémentaires devront être entrepris pour expliquer le profil d'expression des transporteurs intestinaux observé avec l'hydrolysat de tilapia et confirmer ces performances *in vivo* chez le bar. Cet hydrolysat est toutefois le seul à augmenter significativement l'expression de la phosphatase alcaline, qui est un marqueur de l'intégrité intestinale.

Des résultats obtenus dans le second chapitre permettent de plus de montrer qu'il n'y a aucun effet de l'alimentation riche en farine d'origine végétale sur le développement des villosités intestinales, et donc sur la surface d'absorption, ainsi que sur l'apparition d'une inflammation dans le tube digestif. Le statut immunitaire du poisson semble également avoir été impacté négativement par les formules alimentaires riches en protéines d'origine végétale que l'utilisation d'hydrolysat peut permettre de compenser. En effet, une étude histologique de la paroi intestinale et le suivi de l'expression de deux effecteurs du système immunitaire inné montrent que l'inclusion de 5% de l'hydrolysat de tilapia dans le régime FM5 a le même effet que le régime FM20 sur la densité de lymphocytes T dans la muqueuse intestinale et l'expression du complément C3 dans le foie. L'utilisation de l'hydrolysat de tilapia, dont les performances de croissance sont légèrement en retrait par rapport à celle de l'hydrolysat de crevette, pourrait avoir un réel intérêt en aquaculture pour stimuler le système immunitaire des poissons d'élevage et améliorer leur résistance aux infections mais ces résultats devront être approfondis par des analyses complémentaires.

Cinquième partie

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Les hydrolysats protéiques issus des co-produits de la pêche et de l'aquaculture sont des ingrédients à fort potentiel nutritionnel pour l'alimentation des poissons et des crustacés d'élevage ainsi que des sources prometteuses de peptides bioactifs, attractives pour les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Ils ont de plus 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-à-vis des farines de poisson. 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 mal connue et dont les performances *in vivo* restent mal élucidées.

Ce travail de thèse, ciblé sur l'étude de deux hydrolysats particuliers, a permis de développer des approches méthodologiques afin de déterminer leur composition en peptides hydrolytiques et d'évaluer leur impact physiologique sur un poisson d'élevage carnivore, le bar commun.

Les résultats obtenus apportent pour la première fois des informations précises sur la composition peptidique d'hydrolysats de co-produits. Une stratégie expérimentale a été développée pour l'étude de mélanges peptidiques complexes. Elle repose sur l'association d'une approche transcriptomique fournissant des banques de données ciblées et d'une approche peptidomique combinant l'optimisation des étapes de fractionnement et la complémentarité de deux techniques de spectrométrie de masse : le MALDI-TOF/TOF et l'ESI-MS/MS. Cette stratégie expérimentale a permis l'identification de plus de 1000 peptides dans chaque hydrolysat. D'un point de vue expérimental, nos résultats démontrent l'importance de la disponibilité de données transcriptomiques adaptées qui sont de plus en plus aisées à produire grâce au développement des techniques de séquençage à haut débit. Ils démontrent également la nécessité d'optimiser les étapes de préparation et de séparation de ces mélanges complexes afin d'améliorer la qualité des spectres MS/MS, et de faciliter l'identification des peptides hydrolytiques.

Les travaux menés procurent des informations importantes quant à la diversité des peptides hydrolytiques de masse moléculaire supérieure à 500 Da ainsi que sur les catégories de protéines dont ils sont issus. Les deux hydrolysats étudiés ont une origine très différente puisque l'un est produit à partir du céphalothorax d'un crustacé marin, la crevette *L. vannamei* et l'autre à partir des co-produits incluant la tête, les viscères et la carcasse d'un poisson d'eau douce, le tilapia *O. niloticus*. Les protéines à l'origine des peptides hydrolytiques sont donc différentes dans les deux cas. Dans l'hydrolysat de crevette, les hémocyanines, les protéines cuticulaires et les enzymes digestives sont les familles qui génèrent la plus grande diversité de peptides (49% des peptides hydrolytiques sont issus de ces trois familles). Dans l'hydrolysat de tilapia, les collagènes, les protéines du cytosquelette et les enzymes (toutes enzymes confondues) sont les précurseurs protéiques principaux. Les informations acquises par la caractérisation des hydrolysats sont précieuses pour expliquer/prédire leurs propriétés et ajuster leur process de fabrication

en fonction des objectifs de performances ciblés. Ainsi, la part importante d'enzymes digestives dans le co-produit de crevette est probablement à l'origine de son DH élevé, les enzymes endogènes jouant ici un rôle important dans l'hydrolyse du coproduit. Ce résultat tendrait à démontrer qu'une masse viscérale importante (cas de la crevette par rapport au tilapia) dans le co-produit est un paramètre à prendre en compte pour la prédiction du futur DH et donc le profil de masses moléculaires d'un hydrolysat. La connaissance de la séquence des peptides hydrolytiques ainsi que des précurseurs dont ils sont issus ouvrent également des perspectives intéressantes pour la découverte de peptides possédant une activité biologique. Une activité antibactérienne des extraits peptidiques bruts et de certaines fractions issues d'une étape de séparation en rp-HPLC a pu être mise en évidence pour les deux hydrolysats ciblés. Cependant, l'identification du ou des peptide(s) responsable(s) de cette activité n'a pas pu aboutir alors que le matériel biologique était très abondant. En effet, une perte de l'activité lors des étapes de purification ultérieures a été systématiquement observée, suggérant que l'activité antibactérienne résulte de plusieurs peptides agissant en synergie. De plus, les difficultés rencontrées pour la séparation de mélanges complexes contenant des peptides présents sous plusieurs formes plus ou moins tronquées et présentant par conséquent des caractéristiques physico-chimiques proches ne permettent pas d'aboutir à l'identification de l'ensemble des peptides d'une fraction active.

La connaissance des peptides hydrolytiques permet de réaliser un screening *in silico* des activités biologiques potentielles grâce aux nombreuses banques de données disponibles. Cette approche peut constituer un complément intéressant des approches classiques en permettant de s'affranchir des difficultés de purification. La recherche *in silico* de peptides bioactifs peut également être orientée par la connaissance des protéines à l'origine des peptides hydrolytiques car certaines protéines (par exemple les collagènes) sont connues pour libérer des peptides bioactifs après leur hydrolyse (Kim et Mendis, 2006).

Les travaux réalisés mettent également en évidence qu'une approche peptidomique est la seule à pouvoir fournir des informations sur la composition d'un hydrolysat. En effet, la mise en place d'approches *in silico* ou d'approches protéomiques et *in silico* aurait pu être envisagée. La connaissance du transcriptome d'un tissu permet de déterminer sa composition théorique en protéines avec toutefois une marge d'erreur liée aux modifications post-traductionnelles. La réalisation d'une digestion théorique *in silico* à partir de ce protéome (théorique ou à partir du protéome déterminé par une approche classique de protéomique) constituerait une stratégie concevable. Or, nos résultats démontrent qu'il y a très peu de recouvrement entre le protéome d'un co-produit et les précurseurs protéiques des peptides hydrolytiques composant un hydrolysat, rendant les approches *in silico* peu performantes.

L'ensemble du travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'aboutir à un niveau de caractérisation de la fraction peptidique d'un hydrolysat complexe non égalé et permet d'envisager de nouvelles approches méthologiques pour approfondir la connaissance des hydrolysats. En effet, il serait intéressant de développer une stratégie expérimentale permettant l'identi-

fication des peptides de faible masse moléculaire. Car si le MALDI-TOF/TOF est adapté à l'étude des peptides de masse moléculaire supérieure à 700/800 Da , l'ESI-MS/MS est une technique qui permet d'identifier des peptides de masse moléculaire inférieure. Mais nos résultats montrent qu'en dessous de 500 Da, le nombre de peptides identifiés chute considérablement. Cela provient du faible nombre d'ions générés lors de la fragmentation des petits peptides engendrant des propositions de séquences ambiguës souvent plus proches d'une composition en acides aminés que d'une réelle séquence primaire. D'autres approches doivent donc être envisagées, par exemple en utilisant des modèles informatiques de prédiction. Ces modèles utilisent plusieurs caractéristiques d'un peptide, par exemple sa masse, son temps de rétention en rp-HPLC, son indice d'hydrophobilité pour prédire sa séquence (Schmelzer *et al.*, 2004). La réalisation d'une banque de spectres MS/MS regroupant tous les di, tri et tetrapeptides pourrait également être envisagée sur le modèle des banques de données métabolomiques.

Il serait également intéressant, pour approfondir la connaissance de la composition des hydrolysats, de développer une stratégie permettant d'aborder la quantification des peptides hydrolytiques. La spectrométrie de masse permet de quantifier des molécules en mélange notamment par l'utilisation de standards synthétiques (SRM : Selected Reaction Monitoring) sur des matériels de type triple quadrupôle et quadrupôle trap, marqués ou non selon la méthodologie développée. Si la quantification de la totalité des peptides hydrolytiques n'est pas envisageable par cette approche, on peut toutefois entreprendre la quantification absolue de peptides ciblés en raison de leur appartenance aux protéines majoritaires ou de leurs activités biologiques. Par ailleurs, la quantification met en perspective des applications intéressantes au niveau industriel dans le cadre par exemple de l'enrichissement en peptides bioactifs d'intérêt majeur par l'optimisation du process d'hydrolyse. Des approches quantitatives relatives permettant de comparer la composition de plusieurs hydrolysats sont désormais possibles grâce à une méthodologie développée par le fabricant ABSciex sur les ESI-MS/MS de type Triple TOF. Cette méthodologie est d'autant plus performante que les données génomiques et/ou transcriptomiques sont exhaustives, elle constituera donc prochainement un outil puissant pour l'étude et la modélisation des process hydrolytiques.

L'analyse qualitative et quantitative fine des hydrolysats permettra peut être à terme d'établir des prédictions sur le potentiel nutritionnel et fonctionnel d'un hydrolysat (modélisation). Mais les études *in vivo* restent pour l'instant, et resteront sans doute à l'avenir incontournables pour vérifier les prédictions de performances des hydrolysats après inclusion dans une formule alimentaire.

En ce qui concerne l'étude des performances *in vivo* des hydrolysats de crevette et de tilapia chez le bar commun, les résultats obtenus démontrent l'intérêt des deux hydrolysats comme ingrédients de substitution aux farines de poisson pour l'alimentation des poissons d'élevage. L'introduction de 5% de ces hydrolysats dans un aliment à très forte teneur en farine d'origine végétale permet d'obtenir des performances de croissance comparables à celles obtenues avec

un aliment contenant 20% de farine de poisson. La démarche expérimentale développée pour évaluer l'impact physiologique de taux élevés de farine d'origine végétale et des hydrolysats dans les aliments formulés pour le bar commun a permis de mettre en évidence une régulation de la fonction d'absorption intestinale par la formule alimentaire suggérant la mise en place de mécanismes de compensation pour maintenir la croissance. L'un des objectifs de ce travail était de sélectionner des biomarqueurs intestinaux permettant de mesurer l'impact d'un aliment sur la physiologie intestinale pour prédire le potentiel nutritionnel d'un aliment. De très nombreuses études ont été menées chez diverses espèces de poissons pour comprendre l'impact d'un régime alimentaire sur la croissance et l'état physiologique des animaux. Néanmoins, les résultats sont très variables d'une étude à l'autre et semblent dépendre de nombreux facteurs : espèces, stade de développement, aliments utilisés en contrôle, design du conditionnement alimentaire, conditions des prélèvements de tissus, marqueurs étudiés, organes étudiés... .

Ainsi, si ce type d'étude fonctionnelle *in vivo* permet d'améliorer les connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'impact physiologique d'un aliment, l'utilisation de biomarqueurs pour établir les performances d'un régime alimentaire reste quant à elle à démontrer.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a finalement abouti à la mise en place d'une expérimentation associant un conditionnement alimentaire à un challenge bactérien de manière à confirmer le potentiel nutritionnel et de mettre en évidence un éventuel effet protecteur de ces ingrédients fonctionnels vis-à-vis des pathogènes. Une approche basée sur le suivi des niveaux d'expression par RNAseq a été mise en place. L'étude de l'ensemble des fonctions physiologiques qui sont régulées par l'alimentation sera développée dans le cadre de la poursuite des efforts engagés pour établir un lien de cause à effet entre la nature des hydrolysats et la physiologie intestinale. Le séquençage en RNAseq de l'intestin, du rein et du foie des bars soumis au challenge permettra d'avoir une vue globale de l'impact des hydrolysats sur le transcriptome de ces trois organes, sans avoir à réaliser un choix initial de gènes candidats (qPCR). Les prélèvements de rein et de foie réalisés 24h après l'injection du pathogène permettront de d'évaluer l'influence des aliments sur la réponse précoce du système immunitaire. Cette expérimentation (en cours de réalisation) devrait apporter des informations précieuses sur l'impact physiologique des farines d'origine végétale et des hydrolysats inclus dans l'alimentation chez le bar commun.

La caractérisation *in vitro* des hydrolysats ainsi que l'étude de leurs performances *in vivo* sont deux approches complémentaires pour évaluer le potentiel d'un hydrolysat. Les travaux réalisés dans cette thèse, ciblés sur deux hydrolysats, ont permis d'aborder ces deux aspects. D'une part, une stratégie expérimentale innovante et solide est désormais disponible pour l'étude structurale des hydrolysats, quelle que soit leur complexité. Toutefois, des efforts restent à fournir sur l'approfondissement de l'analyse des petits peptides. Des pistes analytiques existent et elles devront être explorées. D'autre part, l'intérêt des hydrolysats dans l'optique d'une substitution aux farines de poisson, présente un réel intérêt en aquaculture, aussi bien au niveau des performances de croissance que pour le statut sanitaire et le bien-être des espèces élevées. Ce

dernier point est directement lié à la qualité du produit final destiné à l'alimentation humaine. Le lien entre le profil peptidique de l'hydrolysat et l'impact au niveau physiologique mériterait d'être approfondi, toujours dans le souci d'améliorer les conditions d'élevage et la qualité du produit final. Ce travail ouvre également de nouvelles perspectives grâce à une meilleure connaissance structurale mais aussi fonctionnelle des hydrolysats de crevette et de tilapia, permettant d'envisager des stratégies alimentaires reposant sur le mélange des hydrolysats dans le but de combiner les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de chacun. De la même façon, la modulation des DH et des profils peptidiques des hydrolysats devrait permettre dans un avenir proche d'élargir les palettes fonctionnelles des aliments aquacoles de manière à répondre aux besoins spécifiques et sans cesse croissants de l'aquaculture.

Sixième partie

Bibliographie

Bibliographie

- AARESTRUP, F. M. (2006). *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Zondervan.
- ABEL, H. J., BECKER, K., MESKE, C. H. R. et FRIEDRICH, W. (1984). Possibilities of using heat-treated full-fat soybeans in carp feeding. *Aquaculture*, 42(2):97–108.
- ACHIONYE-NZEH, C. et NGWUDO, O. (2003). Growth response of *Clarias anguillaris* fingerlings fed larvae of *Musca domesrica* and soyabean diet in the laboratory.
- ADLER-NISSEN, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers.
- AKRAMI, R., GHELICHI, A. et ZAREI, E. (2012). Effect of dietary supplementation of prebiotics inulin on growth, survival, lactic acid bacteria loading and body composition of carp (*Cyprinus carpio*) juvenil. *Journal of fisheries*.
- AKSNES, A. (2005). Feed ingredients. the impacts of nitrogen extractives in aqua feed ingredients. *Int. Aqua Feed*, 8:28–30.
- AKSNES, A., HOPE, B., JONSSON, E., BJORNSSON, B. 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.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., WALTER, P., RAFF, M. et ROBERTS, K. (2002). *Molecular Biology of the Cell in Cell 4th*. International Student Edition,
- ALBREKTSEN, S., MUNDHEIM, H. et AKSNES, A. (2006). Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources. *Aquaculture*, 261(2):626–640.
- ALEMAN, A., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et MONTERO, P. (2013). Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 54(1):790–795.
- APRAHAMIAN, M. W. et BARR, C. D. (1985). The growth, abundance and diet of 0-group sea bass, *Dicentrarchus Labrax* from the severn estuary. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Plymouth*, 65(1):169–180.
- ARIAS, A. (1980). Growth, food and reproductive habits of sea bream (*Sparus aurata* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in the. *Investigacion Pesquera*, 44.
- ARMSTRONG, S. M., HARGRAVE, B. T. et HAYA, K. (2005). Antibiotic use in finfish aquaculture : modes of action, environmental fate, and microbial resistance. In *Environmental effects of marine finfish aquaculture*, pages 341–357. Springer.
- ARZEL, J., MARTINEZ LOPEZ, F. X., MÉTAILLER, R., STÉPHAN, G., VIAU, M., GANDEMÉR, G. et GUILLAUME, J. (1994). Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. *Aquaculture*, 123(3):361–375.

Bibliographie

- BABU, C. M., CHAKRABARTI, R. et SURYA SAMBASIVARAO, K. R. (2008). Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT-Food Science and Technology*, 41(2):227–235.
- BADO-NILLES, A., QUENTEL, C., MAZURAIS, D., ZAMBONINO-INFANTE, J. L., AUFRRET, M., THOMAS-GUYON, H. et LE FLOC'H, S. (2011). *In vivo* effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7):1896–1904.
- BAEVERFJORD, G. et KROGDAHL, A. (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.
- BAIN, N., GREGORY, A. et RAYNARD, R. S. (2008). Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from scotland. *Journal of fish diseases*, 31(1):37–47.
- BAKKE, S., JORDAL, A.-E. O., GÓMEZ-REQUENI, P., VERRI, T., KOUSOULAKI, K., AKSNES, A. et RØNNESTAD, I. (2010). Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 156(1):48–55.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M., FRØYSTAD, M. K., LILLEENG, E., DAPRA, F., REFSTIE, S., KROGDAHL, A. et LANDSVERK, T. (2007a). Response to soy : T-cell-like reactivity in the intestine of atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 30(1):13–25.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M., NORDRUM, S., KROGDAHL, A. et BUDDINGTON, R. K. (2000a). Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(1):33–44.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M., PENN, M. H., SALAS, P. M., REFSTIE, S., SPERSTAD, S., LANDSVERK, T., RINGØ, E. et KROGDAHL, A. (2007b). 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.). *British Journal of Nutrition*, 97(04):699–713.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M., PRESS, C. M., BAEVERFJORD, G., KROGDAHL, A. et LANDSVERK, T. (2000b). 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.
- BARNABÉ, G. (1976). Elevage larvaire du loup (*Dicentrarchus labrax* L.; pisces, serranidae) à l'aide d'aliment sec compose. *Aquaculture*, 9:237–252.
- 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.
- BATES, J. M., AKERLUND, J., MITTGE, E. et GUILLEMIN, K. (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell host & microbe*, 2(6):371–382.
- BAYNE, C. J. et GERWICK, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9):725–743.

- BEAULIEU, L., THIBODEAU, J., BONNET, C., BRYL, P. et CARBONNEAU, M.-l. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, 1(4):149–157.
- BECKER, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2):207–210.
- BECKER, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology*, page 312.
- BENJAKUL, S., BINSAN, W., VISESSANGUAN, W., OSAKO, K. et TANAKA, M. (2009). Effects of flavourzyme on yield and some biological activities of mungoong, an extract paste from the cephalothorax of white shrimp. *Journal of food science*, 74(2):S73–80.
- BENJAKUL, S. et MORRISSEY, M. T. (1997). Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9):3423–3430.
- 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.
- BEVERIDGE, M. C. et LITTLE, D. C. (2002). The history of aquaculture in traditional societies. *Ecological aquaculture. The evolution of the Blue Revolution*, pages 3–29.
- BHASKAR, N. et MAHENDRAKAR, N. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) : Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource technology*, 99(10):4105–4111.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. et USADEL, B. (2014). Trimmomatic : a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, page btu170.
- BONALDO, A., ROEM, A. J., PECCHINI, A., GRILLI, E. et GATTA, P. P. (2006). Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. *Aquaculture*, 261(2):580–586.
- BOONYARATPALIN, M. (1991). Nutritional studies on seabass (*Lates calcarifer*). *Finfish nutrition research in Asia*, pages 33–41.
- BOSTOCK, J., MCANDREW, B., RICHARDS, R., JAUNCEY, K., TELFER, T., LORENZEN, K., LITTLE, D., ROSS, L., HANDISYDE, N., GATWARD, I. et al. (2010). Aquaculture : global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 365(1554):2897–2912.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1):248–254.
- BRANSDEN, M., CARTER, C. et NOWAK, B. (2001). *Effects of dietary protein source on growth, immune function, blood chemistry and disease resistance of Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr*. Thèse de doctorat.
- BRÖER, S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews*, 88(1):249–286.
- BUDDINGTON, R. K., KROGDAHL, A. et BAKKE-MCKELLEP, A. M. (1996). The intestines of carnivorous fish : structure and functions and the relations with diet. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 638:67–80.

Bibliographie

- 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.
- BULET, P., STÖCKLIN, R. et MENIN, L. (2004). Anti-microbial peptides : from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198(1):169–184.
- 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.
- BURRELLS, C., WILLIAMS, P. D., SOUTHGATE, P. J. et CRAMPTON, V. O. (1999). Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(3):277–288.
- BURRIDGE, L., WEIS, J. S., CABELO, F., PIZARRO, J. et BOSTICK, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture : A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1–4):7–23.
- BYUN, H.-G. et KIM, S.-K. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36(12):1155–1162.
- 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.
- CALVERT, C. C., MARTIN, R. D. et MORGAN, N. O. (1969). House fly pupae as food for poultry. *Journal of Economic Entomology*.
- CANON, F. (2010). *Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riche en proline et les tanins*. Thèse de doctorat, Montpellier, SupAgro.
- CARRASCO-CASTILLA, J., HERNANDEZ-ALVAREZ, A. J., JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C., GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. et DÁVILA-ORTIZ, G. (2012). Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4):224–243.
- CARRERA, M., CAÑAS, B. et GALLARDO, J. M. (2013). The sarcoplasmic fish proteome : Pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences. *Journal of proteomics*, 78:211–220.
- 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.
- 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, 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.
- CHALAMAIAH, M., RAO, G. N., RAO, D. G. et JYOTHIRMAYI, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food chemistry*, 120(3):652–657.

- CHEN, H., PAN, Y., WONG, E. A. et WEBB, K. E. (2005). Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. *The Journal of nutrition*, 135(2):193–198.
- CHEN, J., WANG, Y., ZHONG, Q., WU, Y. et XIA, W. (2012). Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*, 33(1):52–58.
- CHO, C. Y. et SLINGER, S. J. (1979). Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. *Finfish nutrition and fishfeed technology*, 2:239–247.
- 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):C17–C24.
- CHOWDHURY, R., STEVENS, S., GORMAN, D., PAN, A., WARNAKULA, S., CHOWDHURY, S., WARD, H., JOHNSON, L., CROWE, F. et HU, F. B. (2012). Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease : systematic review and meta-analysis. *BMJ : British Medical Journal*, 345.
- CHURCH, F. C., SWAISGOOD, H. E., PORTER, D. H. et CATIGNANI, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthalodialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6):1219–1227.
- CITARASU, T. (2010). Herbal biomedicines : a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3):403–414.
- CLEMENT, S. et LOVELL, R. T. (1994). Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 119(2):299–310.
- CLEMENTE, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7):254–262.
- COLLINS, S. A., ØVERLAND, M., SKREDE, A. et DREW, M. D. (2013). Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids : Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*, 400-401:85–100.
- CORRAZE, G. (1999). Nutrition lipidique. *Nutrition des poissons et des crustacés*. Paris : Inra éditions.
- CORRAZE, G. et KAUSHIK, S. (1999). Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 6(1):111–5.
- COSTELLO, M. J. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of fish diseases*, 32(1):115–118.
- CUDENNEC, B., RAVALLEC-PLÉ, R., COURROIS, E. et FOUCHEREAU-PERON, M. (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111(4):970–975.
- CUNNINGHAM, D. F. et O'CONNOR, B. (1997). Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343(2):160–186.

Bibliographie

- DABROWSKI, K. et KOZAK, B. (1979). The use of fish meal and soyabean meal as a protein source in the diet of grass carp fry. *Aquaculture*, 18(2):107–114.
- DAHLBÄCK, B. et GUNNARSSON, L. (1981). Sedimentation and sulfate reduction under a mussel culture. *Marine Biology*, 63(3):269–275.
- DANIEL, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66(1):361–384.
- DAVIES, S. et WAREHAM, H. (1988). A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). *Aquaculture*, 73(1-4):189–199.
- de HAAS, C. J., van LEEUWEN, E. M., van BOMMEL, T., VERHOEF, J., van KESSEL, K. P. et van STRIJP, J. A. (2000). Serum amyloid p component bound to gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infection and immunity*, 68(4):1753–1759.
- DE SILVA, S. S. et ANDERSON, T. A. (1995). *Fish nutrition in aquaculture*, volume 1. Springer.
- DEKKERS, E., RAGHAVAN, S., KRISTINSSON, H. G. et MARSHALL, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food chemistry*, 124(2):640–645.
- DELCROIX, J., GATESOUPE, F. J., DESBRUYÈRES, E., HUELVAN, C., LE DELLIOU, H., LE GALL, M.-M., QUAZUEL, P., MAZURAIS, D. et ZAMBONINO-INFANTE, J.-L. (2014). The effects of dietary marine protein hydrolysates on the development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and associated microbiota. *Aquaculture Nutrition*, in press.
- DEPAOLA, A., PELLER, 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(9):3513.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D., SAULNIER, D., GARNIER, J., JOUFFREY, C., BULET, P. et BACHÈRE, E. (2001). Crustacean immunity : antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50):47070–47077.
- DI BERNARDINI, R., HARNEY, P., BOLTON, D., KERRY, J., O’NEILL, E., MULLEN, A. M. et HAYES, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4):1296–1307.
- DIAMANT, A., COLORNI, A. et UCKO, M. (2007). Parasite and disease transfer between cultured and wild coastal marine fish. In *CIESM Workshop Monograph*, volume 32, pages 49–54.
- DIMITROGLOU, A., MERRIFIELD, D. L., MOATE, R., DAVIES, S. J., SPRING, P., SWEETMAN, J. et BRADLEY, G. (2009). Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of animal science*, 87(10):3226–3234.
- DONG, S., ZENG, M., WANG, D., LIU, Z., ZHAO, Y. et YANG, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4):1485–1493.
- DOYEN, A., SAUCIER, L., BEAULIEU, L., POULIOT, Y. et BAZINET, L. (2012). Electroseparation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 132(3):1177–1184.

- 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.
- DUNCAN, M. W., RODER, H. et HUNSUCKER, S. W. (2008). Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 7(5):355–370.
- DZIUBA, J., MINKIEWICZ, P., NALECZ, D. et IWANIAK, A. (1999). Database of biologically active peptide sequences. *Food/Nahrung*, 43(3):190–195.
- ERDÖS, E. G. et SKIDGEL, R. A. (1987). The angiotensin I-converting enzyme. *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology*, 56(4):345.
- ERICKSON, R. H., GUM, J. R., LINDSTROM, M. M., MCKEAN, D. et KIM, Y. S. (1995). Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, 216(1):249–257.
- ESPE, M., SVEIER, H., HØGGØY, 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.
- EVANS, J. J., PASNIK, D. J., PERES, H., LIM, C. et KLESIUS, P. H. (2005). No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat-treated raw soybean meal. *Aquaculture Nutrition*, 11(2):123–129.
- FAHMI, A., MORIMURA, S., GUO, H.-C., SHIGEMATSU, T., KIDA, K. et UEMURA, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10):1195–1200.
- FAO (2012). State of world fisheries and aquaculture - 2012. Rapport technique.
- FEI, Y.-J., KANAI, Y., NUSSBERGER, S., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., ROMERO, M. F., SINGH, S. K., BORON, W. F. et HEDIGER, M. A. (1994). Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*.
- FERRARI, I. et CHIENERGATO, A. R. (1981). Feeding habits of juvenile stages of *Sparus auratus* L., *Dicentrarchus labrax* L. and mugilidae in a brackish embayment of the po river delta. *Aquaculture*, 25(2):243–257.
- FERREIRA, C. S. G., NUNES, B. A., HENRIQUES-ALMEIDA, J. M. d. M. et GUILHERMINO, L. (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3):452–458.
- FIEDLER, K. (1991). *Lehrbuch der Speziellen Zoologie : Fische*, volume 2. Fischer.
- FITZSIMMONS, K. (2008). Tilapia product quality and new product forms for international markets. In *From the pharaohs to the future. Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Proceedings. Cairo, Egypt, 12-14 October, 2008.*, pages 1–10. AQUAFISH Collaborative Research Support Program.
- FOH, M. B. K., KAMARA, M. T., AMADOU, I., FOH, B. M. et WENSHUI, W. (2011). Chemical and physico-chemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *Int. J. Biol. Chem.*
- FOWLER, L. G. (1980). Substitution of soybean and cottonseed products for fish meal in diets fed to chinook and coho salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 42(2):87–91.

Bibliographie

- 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, G., MAKKAR, H. 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.
- GANAPATHY, M. E., BRANDSCH, M., PRASAD, P. D., GANAPATHY, V. et LEIBACH, F. H. (1995). Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43):25672–25677.
- GANAPATHY, V., GANAPATHY, M. E. et LEIBACH, F. H. (2009). Protein digestion and assimilation. *Textbook of gastroenterology*, page 464.
- GARLING JR, D. L., WILSON, R. P. et OTHERS (1976). Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of nutrition*, 106(9):1368.
- GATESOUPE, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1):147–165.
- GATLIN, D. M., BARROWS, F. T., BROWN, P., DABROWSKI, K., GAYLORD, T. G., HARDY, R. W., HERMAN, E., HU, G., KROGDAHL, A., NELSON, R. et OTHERS (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds : a review. *Aquaculture Research*, 38(6):551–579.
- GBOGOURI, G. A., LINDER, M., FANNI, J. et PARMENTIER, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of food science*, 69(8):C615–C622.
- GEDDES, K. et PHILPOTT, D. J. (2008). A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135(1):8–12.
- GELSE, K., PÖSCHL, E. et AIGNER, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12):1531–1546.
- GHASSEM, M., ARIHARA, K., BABJI, A. S., SAID, M. et IBRAHIM, S. (2011). Purification and identification of ACE inhibitory peptides from haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC–ESI–TOF MS/MS. *Food chemistry*, 129(4):1770–1777.
- GIBSON, G. R., MCCARTNEY, A. L. et RASTALL, R. A. (2005). Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition*, 93(S1):S31–S34.
- GIBSON, G. R. et ROBERFROID, M. (1995). Dietary modulation of the human colonie microbiota : introducing the concept of prebiotics. *Journal of nutrition*, 125:1401–1412.
- GILBERT, E. R., WONG, E. A. et WEBB, K. E. (2008). Board-invited review : Peptide absorption and utilization : Implications for animal nutrition and health. *Journal of animal science*, 86(9):2135–2155.
- GIRIN, M. (1991). *L'aquaculture adulte*. Editions Aqua Presse.
- GLENROSS, B., EVANS, D., HAWKINS, W. et JONES, B. (2004). Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 235(1–4):411–422.

- GÜLTEPE, N., SALNUR, S., HOŞSU, B. et HISAR, O. (2011). Dietary supplementation with mannanoligosaccharides (MOS) from bio-mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture nutrition*, 17(5):482–487.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M., LÓPEZ-CABALLERO, M., ALEMÀN, A., López de LACEY, A., GIMÉNEZ, B. et MONTERO, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea by-products as real material : New ways of application*, pages 89–115.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M. a. et MONTERO, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources : A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8):1813–1827.
- GÓMEZ-REQUENI, P., MINGARRO, M., CALDUCH-GINER, J., MÉDALE, F., MARTIN, S., HOULIHAN, D., KAUSHIK, 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(1–4):493–510.
- 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.
- GONCALVES, A. F., CASTRO, L. F. C., PEREIRA-WILSON, C., COIMBRA, J. et WILSON, J. M. (2007). Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish ? *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 2(4):345–355.
- GOUDSWAARD, K. P., WITTE, F. et KATUNZI, E. (2008). The invasion of an introduced predator, nile perch (*Lates niloticus* L.) in lake victoria (east africa) : chronology and causes. *Environmental Biology of Fishes*, 81(2):127–139.
- GRABHERR, M. G., HAAS, B. J., YASSOUR, M., LEVIN, J. Z., THOMPSON, D. A., AMIT, I., ADICONIS, X., FAN, L., RAYCHOWDHURY, R. et ZENG, Q. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7):644–652.
- GREENE, D. H. et SELIVONCHICK, D. P. (1987). Lipid metabolism in fish. *Progress in lipid research*, 26(1):53–85.
- GU, Y., MAJUMDER, K. et WU, J. (2011). QSAR-aided *in silico* approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides. *Food Research International*, 44(8):2465–2474.
- GUILLAUME, J., KAUSHIK, S., BERGO, t. P. et MÉTAILLER, R. (1999). *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. Editions Quae.
- GUO, X. et ALLEN JR, S. K. (1994). Viable tetraploids in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, 3(1):42–50.
- GUPTA, R., BEG, Q. et LORENZ, P. (2002). Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1):15–32.
- GUÉRARD, F., DECOURCELLE, N., SABOURIN, C., FLOCH-LAIZET, C., LE GREL, L., LE FLOC'H, P., GOURLAY, F., LE DELEZIR, R., JAOUEN, P., BOURSEAU, P. et OTHERS (2010). Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications : a review. *Journal des sciences Halieutique et Aquatique*, 2:21–27.

Bibliographie

- HAI-LUN, H. E., XIU-LAN, C., CAI-YUN, S., YU-ZHONG, Z. et BAI-CHENG, Z. (2006). Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12(11):726–733.
- HAKIM, Y., HARPAZ, S. et UNI, Z. (2009). Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. *Aquaculture*, 290(1–2):110–115.
- HALVER, J. E. et HARDY, R. W. (2002). *Fish nutrition*. Academic Press.
- HAN, J.-Z. et WANG, Y.-B. (2008). Proteomics : present and future in food science and technology. *Trends in food science & technology*, 19(1):26–30.
- HANCOCK, R. E. et SAHL, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12):1551–1557.
- HANSEN, A.-C., ROSENLUKD, G., KARLSEN, r., OLSVIK, P. a. 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, 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, R. (1996). Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal Feed Science and Technology*, 59(1):71–80.
- HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C. et HEO, M.-S. (2012). *Inonotus obliquus* containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6):1148–1154.
- HARNEDY, P. A. et FITZGERALD, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish : A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1):6–24.
- HARPER, C. (2002). Chemical resistance of pathogens in aquaculture. *Aquaculture Magazine*, 28(1):51–55.
- HASAN, M. R. et HALWART, M. (2009). Fish and feed inputs for aquaculture. *Practices, sustainability and implications*.
- HE, S., FRANCO, C. et ZHANG, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1):289–297.
- HEIKKINEN, J., VIELMA, J., KEMILÄINEN, O., TIIROLA, M., ESKELINEN, P., KIURU, T., NAVIA-PALDANIUS, D. et von WRIGHT, A. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261(1):259–268.
- HERNÁNDEZ, M. G., 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.
- HETRU, C. et BULET, P. (1997). Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 78:35–49.

- HEWITT, R. P., WATKINS, J. L., NAGANOBU, M., TSHERNYSHKOV, P., BRIERLEY, A. S., DEMER, D. A., KASATKINA, S., TAKAO, Y., GOSS, C., MALYSHKO, A. et al. (2002). Setting a precautionary catch limit for antarctic krill. *Oceanography*, 15(3):26–33.
- HIDALGO, F. et ALLIOT, E. (1988). Influence of water temperature on protein requirement and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 72(1):115–129.
- HOFFMANN, R. C. (2005). A brief history of aquatic resource use in medieval europe. *Helgoland Marine Research*, 59(1):22–30.
- HOLMGREN, S. et OLSSON, C. (2009). The neuronal and endocrine regulation of gut function. *Fish Physiology*, 28:467–512.
- HOU, H., LI, B., ZHAO, X., ZHUANG, Y., REN, G., YAN, M., CAI, Y., ZHANG, X. et CHEN, L. (2009). The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food chemistry*, 115(3):945–950.
- HOYLE, N. T. et MERRITT, J. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1):76–79.
- HÖRTH, P., MILLER, C. A., PRECKEL, T. et WENZ, C. (2006). Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(10):1968–1974.
- HSU, K.-C., LI-CHAN, E. C. Y. et JAO, C.-L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126(2):617–622.
- INTARASIRISAWAT, R., BENJAKUL, S., WU, J. et VISESSANGUAN, W. (2013). Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *Journal of Functional Foods*, 5(4):1854 – 1862.
- ISLAM, F. S., GAULT, A. G., BOOTHMAN, C., POLYA, D. A., CHARNOCK, J. M., CHATTERJEE, D. et LLOYD, J. R. (2004). Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from bengal delta sediments. *Nature*, 430(6995):68–71.
- JABIR, M. A. R., JABIR, S. A. R. et VIKINESWARY, S. (2014). 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):6592–6598.
- JACKSON, A. (2009). Fish in-fish out (FIFO) ratios explained. *International Fishmeal and Fish Oil Organisation*.
- JANG, A. et LEE, M. (2005). Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69(4):653–661.
- JE, J.-Y., PARK, P.-J., BYUN, H.-G., JUNG, W.-K. et KIM, S.-K. (2005a). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresource Technology*, 96(14):1624–1629.
- JE, J.-Y., PARK, P.-J. et KIM, S.-K. (2005b). Antioxidant activity of a peptide isolated from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38(1):45–50.

Bibliographie

- JE, J.-Y., QIAN, Z.-J., BYUN, H.-G. et KIM, S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5):840–846.
- JEMIL, I., JRIDI, M., NASRI, R., KTARI, N., BEN SLAMA-BEN SALEM, R., MEHIRI, M., HAJJI, M. et NASRI, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* a26. *Process Biochemistry*, 49(6):963–972.
- 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(01):199–212.
- JOHNS, P. W., JACOBS, W. A., PHILLIPS, R. R., MCKENNA, R. J., O’KANE, K. A. et MCEWEN, J. W. (2011). Characterisation of peptide molecular mass distribution in commercial hydrolysates and hydrolysate-based nutritional products. *Food Chemistry*, 125(3):1041–1050.
- JONGJAREONRAK, A., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., NAGAI, T. et TANAKA, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3):475–484.
- JUNG, W.-K., KARAWITA, R., HEO, S.-J., LEE, B.-J., KIM, S.-K. et JEON, Y.-J. (2006a). Recovery of a novel calcium-binding peptide from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41(9):2097–2100.
- JUNG, W.-K., MENDIS, E., JE, J.-Y., PARK, P.-J., SON, B. W., KIM, H. C., CHOI, Y. K. et KIM, S.-K. (2006b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94(1):26–32.
- JUNG, W.-K., PARK, P.-J., BYUN, H.-G., MOON, S.-H. et KIM, S.-K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2):333 – 340.
- KAPOOR, B. G., SMIT, H. et VERIGHINA, I. A. (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in marine biology*, 13:109–239.
- KARUNASAGAR, I., PAI, R., MALATHI, G. R. et KARUNASAGAR, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3):203–209.
- KASUMYAN, A. O. et DÖVING, K. B. (2003). Taste preferences in fishes. *Fish and Fisheries*, 4(4):289–347.
- KATANO, S., OKI, T., MATSUO, Y., YOSHIHIRA, K., NARA, Y., MIKI, T., MATSUI, T. et MATSUMOTO, K. (2003). Antihypertensive effect of alkaline protease hydrolysate of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* & separation and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 69(6):975–980.
- KAUSHIK, S. (2009). Nutrition et alimentation des poissons : éléments pour un nouveau développement. *Cahiers Agricultures*, 18(2):100–102.
- KAUSHIK, S., DOUDET, T., MÉDALE, F., AGUIRRE, P. et BLANC, D. (1995a). Protein and energy needs for maintenance and growth of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3-4):290–296.

- 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, S. J., CRAVEDI, J. P., LALLES, J. P., SUMPTER, J., FAUCONNEAU, B. et LAROCHE, M. (1995b). 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.
- KAUSHIK, S. J. et FAUCONNEAU, B. (1984). Effects of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, 79(3):459–462.
- KAWAMURA, Y., TAKANE, T., SATAKE, M. et SUGIMOTO, T. (1992). Physiologically active peptide motif in proteins : Peptide inhibitors of ACE from the hydrolysates of antarctic krill muscle protein. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 26:210–210.
- KENNEDY, M. et FITZMAURICE, P. (1968). The biology of the bream *Abramis brama* (L) in irish waters. In *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B : Biological, Geological, and Chemical Science*, pages 95–157. JSTOR.
- KIM, S.-K. et MENDIS, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts—a review. *Food Research International*, 39(4):383–393.
- KIM, S.-K. et WIJESEKARA, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides : A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1):1–9.
- KIM, S.-Y., JE, J.-Y. et KIM, S.-K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1):31–38.
- KLEIN, S., COHN, S. et ALPERS, D. (1998). The alimentary tract in nutrition. *Modern nutrition in health and disease*, 9:605–629.
- KÖNIG, A., BOUZAN, C., COHEN, J. T., CONNOR, W. E., KRIS-ETHERTON, P. M., GRAY, G. M., LAWRENCE, R. S., SAVITZ, D. A. et TEUTSCH, S. M. (2005). A quantitative analysis of fish consumption and coronary heart disease mortality. *American journal of preventive medicine*, 29(4):335–346.
- KO, S.-C. et JEON, Y.-J. (2013). Marine peptides for preventing metabolic syndrome. *Current Protein and Peptide Science*, 14(3):183–188.
- KODAMA, H., YAMADA, F., MURAI, T., NAKANISHI, Y., MIKAMI, T. et IZAWA, H. (1989). Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio angillarum*. *Developmental & Comparative Immunology*, 13(2):123–132.
- KODERA, T., HARA, H., NISHIMORI, Y. et NIO, N. (2006). Amino acid absorption in portal blood after duodenal infusions of a soy protein hydrolysate prepared by a novel soybean protease d3. *Journal of food science*, 71(7):S517–S525.
- KOLKOVSKI, S. et TANDLER, A. (2000). The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6(1):11–16.

Bibliographie

- KOOPMAN, R., CROMBACH, N., GIJSSEN, A. P., WALRAND, S., FAUQUANT, J., KIES, A. K., LEMOSQUET, S., SARIS, W. H., BOIRIE, Y. et van LOON, L. J. (2009). Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated *in vivo* digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *The American journal of clinical nutrition*, 90(1):106–115.
- KORHONEN, H. et PIHLANTO, A. (2006). Bioactive peptides : production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9):945–960.
- KOTTELAT, M. et FREYHOF, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*, volume 13. Publications Kottelat Cornol.
- KOTZAMANIS, Y., GISBERT, E., GATESOUPE, F., 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, K., ALBREKTSEN, S., LANGMYHR, E., OLSEN, H., CAMPBELL, P. et AKSNES, A. (2009). The water soluble fraction in fish meal (stickwater) stimulates growth in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given high plant protein diets. *Aquaculture*, 289(1-2):74–83.
- KRISTINSSON, H. G. et RASCO, B. A. (2000a). Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3):657–666.
- KRISTINSSON, H. G. et RASCO, B. A. (2000b). Fish protein hydrolysates : production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1):43–81.
- KROECKEL, S., HARJES, A. G. E., 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, A., BAKKE-MCKELLEP, A. M. et BAEVERFJORD, G. (2003). Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 9(6):361–371.
- KROGDAHL, A., BAKKE-MCKELLEP, A. M., ROED, 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.
- KUHLMAN, M., JOINER, K. et EZEKOWITZ, R. (1989). The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *The Journal of experimental medicine*, 169(5):1733–1745.
- KURATH, G. et WINTON, J. (2011). Complex dynamics at the interface between wild and domestic viruses of finfish. *Current Opinion in Virology*, 1(1):73–80.
- KUSSMANN, M. et VAN BLADEREN, P. J. (2011). The extended nutrigenomics—understanding the interplay between the genomes of food, gut microbes, and human host. *Frontiers in genetics*, 2.
- KUZ'MINA, V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148(1):25–37.

- KVALE, A., HARBOE, T., MANGOR-JENSEN, A. et HAMRE, K. (2009). Effects of protein hydrolysate in weaning diets for atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15(2):218–227.
- LACROIX, I. M. et LI-CHAN, E. C. (2012). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an *in silico* approach. *Journal of Functional Foods*, 4(2):403–422.
- LALL, S. et BISHOP, F. (1977). *Studies on mineral and protein utilization by Atlantic salmon (Salmo salar) grown in sea water*. Disease and Nutrition Section, Department of Fisheries and Environment.
- LALLES, J.-P. (2014). Intestinal alkaline phosphatase : novel functions and protective effects. *Nutrition reviews*, 72(2):82–94.
- LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M. et SALZBERG, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*, 10(3):R25.
- LAZADO, C. C. et CAIPANG, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(1):78–89.
- LEE, J. K., JEON, J.-K. et BYUN, H.-G. (2011). Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. *Food chemistry*, 125(2):495–499.
- LEE, J. K., JEON, J.-K. et BYUN, H.-G. (2014). Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 7:381–389.
- LEE, S.-H., QIAN, Z.-J. et KIM, S.-K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1):96–102.
- LI, B. et DEWEY, C. N. (2011). RSEM : accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12:323.
- LI, Z., WANG, B., CHI, C., GONG, Y., LUO, H. et DING, G. (2013). Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. *Food Research International*, 51(1):283–293.
- LIANG, M., WANG, J., CHANG, Q. et MAI, K. (2006). Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). *Aquaculture Research*, 37(1):102–106.
- 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, 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.
- LILLEENG, E., PENN, M. H., HAUGLAND, O., XU, C., BAKKE, A. M., KROGDAHL, A., LANDSVERK, T. et FRØYSTAD-SAUGEN, M. K. (2009). Decreased expression of TGF- β , 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.

Bibliographie

- LIM, S.-J., OH, D.-H., KHOSRAVI, S., CHA, J.-H., PARK, S.-H., KIM, K.-W. et LEE, K.-J. (2013). Taurine is an essential nutrient for juvenile parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture*, 414:274–279.
- LIN, L., LV, S. et LI, B. (2012). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*, 131(1):225–230.
- LIN, S. et LUO, L. (2011). Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, 168(1):80–87.
- LITMAN, G. W., CANNON, J. P. et DISHAW, L. J. (2005). Reconstructing immune phylogeny : new perspectives. *Nature Reviews Immunology*, 5(11):866–879.
- LIU, C.-H., CHIU, C.-H., WANG, S.-W. et CHENG, W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & shellfish immunology*, 33(4):699–706.
- LIU, Z., DONG, S., XU, J., ZENG, M., SONG, H. et ZHAO, Y. (2008). Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 19(3):231–235.
- LIU, Z., ZHOU, Y., FENG, J., LU, S., ZHAO, Q. et ZHANG, J. (2013). Characterization of oligopeptide transporter (PepT1) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 164(3):194–200.
- MA, B., ZHANG, K., HENDRIE, C., LIANG, C., LI, M., DOHERTY-KIRBY, A. et LAJOIE, G. (2003). PEAKS : powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 17(20):2337–2342.
- MAFFIA, M., RIZZELLO, A., ACIERTNO, R., VERRI, T., ROLLO, M., DANIELI, A., DÖRING, F., DANIEL, H. et STORELLI, C. (2003). Characterisation of intestinal peptide transporter of the antarctic haemoglobinless teleost *Chionodraco hamatus*. *Journal of experimental biology*, 206(4):705–714.
- MAKKAR, H. P. S. (1993). Antinutritional factors in foods for livestock. *BSAP occasional publication : an occasional publication of the British Society of Animal Production*.
- MANNINEN, A. H. (2009). Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutr & Metab*, 6:38–43.
- MARCHBANK, T., ELIA, G. et PLAYFORD, R. J. (2009). Intestinal protective effect of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Regulatory Peptides*, 155(1–3):105–109.
- MARGHERITIS, E., TEREOVA, 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 Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 166(2):285–292.
- MARTIN, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1):pp–10.
- MAZORRA-MANZANO, M. A., PACHECO-AGUILAR, R., RAMÍREZ-SUÁREZ, J. C., GARCIA-SANCHEZ, G. et LUGO-SÁNCHEZ, M. E. (2012). Endogenous proteases in pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle as a processing aid in functional fish protein hydrolysate production. *Food and bioprocess technology*, 5(1):130–137.

- MÉDALE, F., BOUJARD, T., VALLÉE, F., BLANC, D., MAMBRINI, M., ROEM, A. et KAUSHIK, S. J. (1998). Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources*, 11(4):239–246.
- MÉDALE, F. et KAUSHIK, S. (2009). Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. *Cahiers Agricultures*, 18(2):103–111.
- MEDALE, F. et KAUSHIK, S. (2009). Protein sources in feed for farmed fish. *Cahiers Agricultures*, 18(2):103–111.
- MEISTER, M. F., HUMBERT, W., KIRSCH, R. et VIVIEN-ROELS, B. (1983). Structure and ultrastructure of the oesophagus in sea-water and fresh-water teleosts (pisces). *Zoomorphology*, 102(1):33–51.
- MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., BYUN, H.-G. et KIM, S.-K. (2005a). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17):2166–2178.
- MENDIS, E., RAJAPAKSE, N. et KIM, S.-K. (2005b). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3):581–587.
- MERRIFIELD, D. L., BURNARD, D., BRADLEY, G., DAVIES, S. J. et BAKER, R. (2009). Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture research*, 40(9):1064–1072.
- MERRIFIELD, D. L., DIMITROGLOU, A., FOEY, A., DAVIES, S. J., BAKER, R. T., BØGWALD, J., CASTEX, M. et RINGØ, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2):1–18.
- MESSINA, M., TULLI, F., MESSINA, C. et TIBALDI, E. (2010). Varying plant protein sources in the diet of sea bass *Dicentrarchus labrax* differently affects lipid metabolism and deposition. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1s):806–808.
- MINKIEWICZ, P., DZIUBA, J., DAREWICZ, M., IWANIAK, A., DZIUBA, M. et NALEŻ, D. (2008). Food peptidomics. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1):1–10.
- MÊME, A. (2010). *Developpement de la spectrométrie de masse pour l'étude d'édifice non-covalents en chimie et biologie*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.
- MOMMSEN, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. *Comparative biochemistry and physiology part B : Biochemistry and molecular biology*, 129(2):207–219.
- 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.
- 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.
- MOREN, M., MALDE, M. K., OLSEN, R. E., HEMRE, G. I., DAHL, L., KARLSEN, . et JULSHAMN, K. (2007). Fluorine accumulation in atlantic salmon (*Salmo salar*), atlantic cod (*Gadus morhua*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets with krill or amphipod meals and fish meal based diets with sodium fluoride (NaF) inclusion. *Aquaculture*, 269(1):525–531.

Bibliographie

- MORRIS, P. C., GALLIMORE, P., HANDLEY, J., HIDE, G., HAUGHTON, P. et BLACK, A. (2005). Full-fat soya for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater : Effects on performance, composition and flesh fatty acid profile in absence of hind-gut enteritis. *Aquaculture*, 248(1):147–161.
- MOSKOWITZ, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. In *Seminars in arthritis and rheumatism*, volume 30, pages 87–99. Elsevier.
- MUKHIN, V. A., NOVIKOV, V. Y. et RYZHIKOVA, L. S. (2001). A protein hydrolysate enzymatically produced from the industrial waste of processing icelandic scallop *Chlamys islandica*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(3):292–296.
- 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.
- MURRAY, H. M., LALL, S. P., RAJASELVAM, R., BOUTILIER, L. A., BLANCHARD, B., FLIGHT, R. M., COLOMBO, S., MOHINDRA, V. et DOUGLAS, S. E. (2010). A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture*, 298(3–4):282–293.
- MUSTAFA, M. G., WAKAMATSU, S., TAKEDA, T.-a., UMINO, T. et NAKAGAWA, H. (1995). Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. *Fisheries science : FS*, 61(1):25–28.
- NAGAI, T. et SUZUKI, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3):277–281.
- NAGAI, T. et SUZUKI, N. (2002). Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus(*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. *Food Chemistry*, 76(2):149–153.
- NAGAI, T., YAMASHITA, E., TANIGUCHI, K., KANAMORI, N. et SUZUKI, N. (2001). Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*, 72(4):425–429.
- NAJAFIAN, L. et BABJI, A. S. (2014). Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*.
- NAKAGAWA, H. (1997). Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 51(8):345–348.
- NAKANISHI, Y., KODAMA, H., MURAI, T., MIKAMI, T. et IZAWA, H. (1991). Activation of rainbow trout complement by c-reactive protein. *American journal of veterinary research*, 52(3):397–401.
- NALINANON, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. et KISHIMURA, H. (2007). Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2):593–601.
- NAQASH, S. Y. et NAZEER, R. A. (2012). *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of bioactive peptide isolated from nemipterus japonicus backbone. *International Journal of Food Properties*, 15(6):1200–1211.
- NASRI, R., AMOR, I. B., BOUGATEF, A., NEDJAR-ARROUME, N., DHULSTER, P., GARGOURI, J., CHÂABOUNI, M. K. et NASRI, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133(3):835–841.

- NAUTA, A. J., DAHA, M. R., KOOTEN, C. v. et ROOS, A. (2003). Recognition and clearance of apoptotic cells : a role for complement and pentraxins. *Trends in Immunology*, 24(3):148–154.
- NEDJAR-ARROUME, N., DUBOIS-DELVAL, V., MILOUDI, K., DAOUD, R., KRIER, F., KOUACH, M., BRIAND, G. et GUILLOCHON, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 27(9):2082–2089.
- NEKLYUDOV, A., IVANKIN, A. et BERDUTINA, A. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5):452–459.
- NESSE, K. O., NAGALAKSHMI, A. P., MARIMUTHU, P., SINGH, M., BHETARIYA, P. J., HO, M. et SIMON, R. R. (2014). Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1):1–6.
- NEWHEY, H. et SMYTH, D. H. (1959). The intestinal absorption of some dipeptides. *The Journal of physiology*, 145(1):48–56.
- NILSANG, S., LERTSIRI, S., SUPHANTHARIKA, M. et ASSAVANIG, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*, 70(4):571–578.
- NORDRUM, S., BAKKE-MCKELLEP, A. M., KROGDAHL, A. et BUDDINGTON, R. K. (2000). Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* R). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3):317–335.
- NRC (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academies Press.
- OGINO, C., SAITO, K. et OTHERS (1970). Protein nutrition in fish. 1. the utilization of dietary protein by young carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 36(3):250–254.
- OGUNJI, J. O., KLOAS, W., WIRTH, M., SCHULZ, C. et RENNERT, B. (2006). Housefly maggot meal (magmeal) : An emerging substitute of fishmeal in tilapia diets. In *Conference on International Agricultural Research for Development, Deutscher Tropentag*, pages 11–13.
- OHTA, M., OKADA, M., YAMASHINA, I. et KAWASAKI, T. (1990). The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(4):1980–1984.
- 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, A., CERQUEIRA, A. L. et GONÇALVES, P. (1999). The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 179(1):195–201.
- OLIVA-TELES, A. et GONÇALVES, P. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202(3–4):269–278.
- OLLI, J. J., KROGDAHL, A. 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.
- OLSEN, R. L., TOPPE, J. et KARUNASAGAR, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2):144–151.

Bibliographie

- OPSTVEDT, J., AKSNES, A., HOPE, B. et PIKE, I. (2003). Efficiency of feed utilization in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 221(1-4):365–379.
- OSTASZEWSKA, T., DABROWSKI, K., KAMASZEWSKI, M., GROCHOWSKI, P., VERRI, T., RZEPKOWSKA, M. et WOLNICKI, J. (2010a). The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 157(2):158–169.
- OSTASZEWSKA, T., KAMASZEWSKI, M., GROCHOWSKI, P., DABROWSKI, K., VERRI, T., AKSAKAL, E., SZATKOWSKA, I., NOWAK, Z. et DOBOSZ, S. (2010b). The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 155(1):107–114.
- PACHECO-AGUILAR, R., MAZORRA-MANZANO, M. A. et RAMÍREZ-SUÁREZ, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109(4):782–789.
- PALACÍN, M., NUNES, V., FONT-LLITJÓS, M., JIMÉNEZ-VIDAL, M., FORT, J., GASOL, E., PINEDA, M., FELIU-BADALÓ, L., CHILLARÓN, J. et ZORZANO, A. (2005). The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology*, 20(2):112–124.
- PALTI, Y., SILVERSTEIN, J. T., WIEMAN, H., PHILLIPS, J. G., BARROWS, F. T. et PARSONS, J. E. (2006). Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 255(1):548–556.
- PANCHAUD, A., AFFOLTER, M. et KUSSMANN, M. (2012). Mass spectrometry for nutritional peptidomics : How to analyze food bioactives and their health effects. *Journal of Proteomics*, 75(12):3546–3559.
- PANSERAT, S., HORTOPAN, G. A., PLAGNES-JUAN, E., KOLDITZ, C., LANSARD, M., SKIBA-CASSY, S., ESQUERRÉ, D., GEURDEN, I., MÉDALE, F., KAUSHIK, S. et CORRAZE, G. (2009). Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*, 294(1–2):123–131.
- PICCHIETTI, S., FAUSTO, A. M., RANDELLI, E., CARNEVALI, O., TADDEI, A. R., BUONOCORE, F., SCAPIGLIATI, G. et ABELLI, L. (2009). Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* L. *Fish & shellfish immunology*, 26(3):368–376.
- PICKETT, G. D. et PAWSON, M. G. (1994). Biology and ecology. *Sea bass biology, exploitation and conservation*. Chapman and Hall, London, pages 1–147.
- PICOT, L., BORDENAVE, S., DIDELOT, S., FRUITIER-ARNAUDIN, I., SANNIER, F., THORKELSSON, G., BERGÉ, J. P., GUÉRARD, F., CHABEAUD, A. et PIOT, J. M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41(5):1217–1222.
- PIFERRER, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1):229–281.
- PIFERRER, F., BEAUMONT, A., FALGUIÈRE, J.-C., FLAJŠHANS, M., HAFFRAY, P. et COLOMBO, L. (2009). Polyploid fish and shellfish : Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3-4):125–156.

- PLAISANCIÉ, P., CLAUSTRE, J., ESTIENNE, M., HENRY, G., BOUTROU, R., PAQUET, A. et LÉONIL, J. (2013). A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and paneth cells along the small intestine. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(1):213–221.
- POHLENZ, C. et GATLIN III, D. M. (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431:111–117.
- POPMA, T. J. (1982). *Digestibility of selected feedstuffs and naturally occurring algae by tilapia*. Thèse de doctorat, Auburn University.
- Poston, H., Riis, R., Rumsey, G. et Ketola, H. (1977). The effect of supplemental dietary amino acids, minerals and vitamins on salmonids fed cataractogenic diets. *Cornell Veterinarian*.
- PRIDGEON, J. W. et KLESIUS, P. H. (2013). Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparfloxacin. *Vaccine*, 31(24):2705–2712.
- PUSHPA, K., GIREESH-BABU, P., RAJENDRAN, K. V., PURUSHOTHAMAN, C. S., DASGUPTA, S. et MAKESH, M. (2014). Molecular cloning, sequencing and tissue-level expression of complement C3 of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1):319–330.
- QIAN, Z.-J., JE, J.-Y. et KIM, S.-K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21):8398–8403.
- QIU, C., SUN, J., LIU, M., WANG, B., JIANG, K., SUN, S., MENG, X., LUO, Z. et WANG, L. (2013). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and antimicrobial analysis of two c-terminal fragments. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*.
- RAA, J., GILDBERG, A. et OLLEY, J. N. (1982). Fish silage : A review. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16(4):383–419.
- RAI, A. K., SWAPNA, H., 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.
- RAJAN, B., FERNANDES, J. M. O., CAIPANG, C. M. A., KIRON, V., ROMBOUT, J. H. W. M. et BRINCHMANN, M. F. (2011). Proteome reference map of the skin mucus of atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(2):224–231.
- RAJAPAKSE, N., JUNG, W.-K., MENDIS, E., MOON, S.-H. et KIM, S.-K. (2005a). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22):2607–2619.
- RAJAPAKSE, N., MENDIS, E., BYUN, H.-G. et KIM, S.-K. (2005b). Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9):562–569.
- RAJAPAKSE, N., MENDIS, E., JUNG, W.-K., JE, J.-Y. et KIM, S.-K. (2005c). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2):175–182.

Bibliographie

- 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.
- REDDY, K. V. R., YEDERY, R. D. et ARANHA, C. (2004). Antimicrobial peptides : premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24(6):536–547.
- 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.
- REFSTIE, S., STOREBAKKEN, T., BAEVERFJORD, G. et ROEM, A. J. (2001). Long-term protein and lipid growth of atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture*, 193(1):91–106.
- REFSTIE, S. a., LANDSVERK, T., BAKKE-MCKELLEP, A. M., RINGØ, E., SUNDBY, A., SHEARER, K. D. et KROGDAHL, A. (2006). Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261(1):269–284.
- 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 & shellfish immunology*, 19(3):253–267.
- 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(0):50 – 61.
- REYES-BECERRIL, M., SALINAS, I., CUESTA, A., MESEGUR, J., TOVAR-RAMIREZ, D., ASCENCIO-VALLE, F. et ESTEBAN, M. n. (2008). Oral delivery of live yeast debaryomyces hansenii modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6):731–739.
- RØNNESTAD, I., GAVAIA, P. J., VIEGAS, C. S., VERRI, T., ROMANO, A., NILSEN, T. O., JORDAL, A.-E. O., KAMISAKA, Y. et CANCELA, M. L. (2007). Oligopeptide transporter PepT1 in atlantic cod (*Gadus morhua* L.) : cloning, tissue expression and comparative aspects. *Journal of Experimental Biology*, 210(22):3883–3896.
- ROBERFROID, M. (2007). Prebiotics : the concept revisited. *The Journal of nutrition*, 137(3):830S–837S.
- 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.
- ROBLIN, C. et BRUSLE, J. (1980). *Gonadogenesis in the wolf, Dicentrarchus labrax of the mediterranean coast.*, volume 69. Masson éditeur.
- ROMANO, N., KOH, C.-B. et NG, W.-K. (2014). Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*.
- ROMBOURT, J. H., ABELLI, L., PICCHIETTI, S., SCAPIGLIATI, G. et KIRON, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(5):616–626.
- ROUT, W. R., LIN, D. S. T. et HUANG, K. C. (1965). Intestinal transport of amino acids and glucose in flounder fish. *Experimental Biology and Medicine*, 118(4):933–938.

- RUBIO-ALIAGA, I. et DANIEL, H. (2002). Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends in pharmacological sciences*, 23(9):434–440.
- 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.
- SAAVEDRA, L., HEBERT, E. M., MINAHK, C. et FERRANTI, P. (2013). An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Research International*, 54(1):925–934.
- SALTON, M. R. J. et GHUYSEN, J. M. (1959). The structure of di- and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and streptomyces F1 enzyme and the β (1→4) n-acetylhexosaminidase activity of these enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 36(2):552 – 554.
- SALZE, G., TOCHER, D. R., ROY, W. J. et ROBERTSON, D. A. (2005). Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.) : egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, 36(15):1488–1499.
- SANTIGOSA, E., GARCÍA-MEILÁN, I., VALENTIN, J. M., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., MÉDALE, F., KAUSHIK, S. et 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 (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317(1–4):146–154.
- 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.
- SATHIVEL, S., BECHTEL, P., BABBITT, J., SMILEY, S., CRAPO, C., REPPOND, K. et PRINYAWIWATKUL, W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(7):2196–2200.
- SATIA, B. P. (1974). Quantitative protein requirements of rainbow trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(2):80–85.
- SAURABH, S. et SAHOO, P. (2008). Lysozyme : an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3):223–239.
- SAVOIE, A., LE FRANÇOIS, N. R., CAHU, C., BLIER, P. U. et ANDREASSEN, I. (2006). Do protein hydrolysates improve survival and growth of newly-hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor*), a non-metamorphic aquaculture fish species ? *Aquaculture*, 261(2):782–788.
- SCHMELZER, C. E., SCHÖPS, R., ULRICH-HOFMANN, R., NEUBERT, R. H. et RAITH, K. (2004). Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *Journal of Chromatography A*, 1055(1):87–92.
- SCHMIEDER, R. et EDWARDS, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6):863–864.
- SCHMIEDER, R., LIM, Y. W. et EDWARDS, R. (2012). Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*, 28(3):433–435.

Bibliographie

- SCHULZE, A. D., ALABI, A. O., TATTERSALL-SHELDRAKE, A. R. et MILLER, K. M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery : balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256(1):50–73.
- SEALEY, W. M., GAYLORD, T. G., BARROWS, F. T., TOMBERLIN, J. K., MC GUIRE, 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, P. H. (2005). *Responsible use of antibiotics in aquaculture*. Numéro 469. Food & Agriculture Org.
- SHAHIDI, F., HAN, X.-Q. et SYNOWIECKI, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53(3):285–293.
- SHAHIDI, F. et JANAK KAMIL, Y. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12(12):435–464.
- SHI, L., ZHANG, Q., RUI, W., LU, M., JING, X., SHANG, T. et TANG, J. (2004). BioPD : a web-based information center for bioactive peptides. *Regulatory Peptides*, 120(1–3):1–3.
- SHIAU, S.-Y., CHUANG, J.-L. et SUN, C.-L. (1987). Inclusion of soybean meal in tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets at two protein levels. *Aquaculture*, 65(3):251–261.
- SHIRAGA, T., MIYAMOTO, K.-I., TANAKA, H., YAMAMOTO, H., TAKETANI, Y., MORITA, K., TAMAI, I., TSUJI, A. et TAKEDA, E. (1999). Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, 116(2):354–362.
- SIEMENSMA, A. D., WEIJER, W. J. et BAK, H. J. (1993). The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1):16–21.
- 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.
- 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, V. (2002). Eating meat : Evolution, patterns, and consequences. *Population and development review*, 28(4):599–639.
- SMITH, L. S. (1989). Digestive functions in teleost fishes. *Fish nutrition*, 2:331–421.
- SMITH, R. R., KINCAID, H. L., REGENSTEIN, J. M. et RUMSEY, G. L. (1988). Growth, carcass composition, and taste of rainbow trout of different strains fed diets containing primarily plant or animal protein. *Aquaculture*, 70(4):309–321.
- SRICHANUN, M., TANTIKITTI, C., KORTNER, T. M., KROGDAHL, A. 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, 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.
- SUGITA, T., YAMAMOTO, T., YASHIMATSU, T. et al. (2010). Utilization of waste porphyra products as eco-friendly feed ingredients. *Bulletin of Fisheries Research Agency (Japan)*.
- 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(2-3):549–564.
- SUNYER, J. O. et LAMBRIS, J. D. (1998). Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological reviews*, 166(1):39–57.
- TACON, A. G., HASAN, M. R. et METIAN, M. (2011). *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans : trends and prospects*. FAO.
- 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.
- TAKEDA, M., SHIMENO, S., HOSOKAWA, H., KAJIYAMA, H. et KAISYO, T. (1975). The effect of dietary calorie-to-protein ratio on the growth, feed conversion and body composition of young yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- TALBOT, C. et ROSENLUKD, G. (2002). Learning from the salmonid industry growing fish on nutrient-dense diets. *Aquafeed International*, 5(2) : 7–10.
- 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.
- TERJESEN, B. F., LEE, K.-J., ZHANG, Y., FAILLA, M. et DABROWSKI, K. (2006). Optimization of dipeptide–protein mixtures in experimental diet formulations for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. *Aquaculture*, 254(1–4):517–525.
- 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.
- TEROVA, G., ROBAINA, L., IZQUIERDO, M., CATTANEO, A., MOLINARI, S., BERNARDINI, G. et SAROGLIA, M. (2013). PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *SpringerPlus*, 2(1):1–14.
- 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.
- 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.

Bibliographie

- TORRECILLAS, S., MAKOL, A., CABALLERO, M. J., MONTERO, D., ROBAINA, L., REAL, F., SWEETMAN, J., TORT, L. et IZQUIERDO, M. S. (2007). Immune stimulation and improved infection resistance in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(5):969–981.
- TORRECILLAS, S., MONTERO, D. et IZQUIERDO, M. (2014). Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides : Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2):525–544.
- TSAI, J.-S., CHEN, J.-L. et PAN, B. S. (2008). ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry*, 43(7):743–747.
- UDDIN, S., EKRAM-UL-AZIM, M., WAHAB, A. et VERDEGEM, M. C. (2006). The potential of mixed culture of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in periphyton-based systems. *Aquaculture Research*, 37(3):241–247.
- UDENIGWE, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2):137–143.
- UDENIGWE, C. C., GONG, M. et WU, S. (2013). *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochemistry*, 48(11):1794–1799.
- URAN, P. A., SCHRAMA, J. W., ROMBOUT, J. H. W. M., TAVERNE-THIELE, J. J., OBACH, A., KOPPE, W. et VERRETH, J. A. J. (2009). Time-related changes of the intestinal morphology of atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *Journal of Fish Diseases*, 32(9):733–744.
- URÁN, P. (2008). *Etiology of soybean-induced enteritis in fish*. publisher not identified.
- URÁN, P., GONÇALVES, A., TAVERNE-THIELE, J., SCHRAMA, J., VERRETH, J. et ROMBOUT, J. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6):751–760.
- Van den INGH, T., KROGDAHL, A., OLLI, J. J., HENDRIKS, H. et KONINKX, J. (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.
- VEERURAJ, A., ARUMUGAM, M. et BALASUBRAMANIAN, T. (2013). Isolation and characterization of thermo-stable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48(10):1592–1602.
- VENOLD, F. F., PENN, M. H., KROGDAHL, A. et OVERTURF, K. (2012). Severity of soybean meal induced distal intestinal inflammation, enterocyte proliferation rate, and fatty acid binding protein (Fabp2) level differ between strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 364–365(0):281–292.
- VERRI, T., KOTTRA, G., ROMANO, A., TISO, N., PERIC, M., MAFFIA, M., BOLL, M., ARGENTON, F., DANIEL, H. et STORELLI, C. (2003). Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter. *FEBS letters*, 549(1):115–122.
- VERRI, T., TEROVA, G., DABROWSKI, K. et SAROGLIA, M. (2011). Peptide transport and animal growth : the fish paradigm. *Biology letters*, page rsbl20101164.
- 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). *Anatomia, histologia, embryologia*, 35(2):76–83.

- VILLANUEVA, J., VANACORE, R., GOICOECHEA, O. et AMTHAUER, R. (1997). Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio* : Regional distribution and membrane association. *Journal of Experimental Zoology*, 279(4):347–355.
- VINE, N. G., LEUKES, W. D. et KAISER, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS microbiology reviews*, 30(3):404–427.
- WAAGBO, R., TROBE, 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.
- WALLACE, I. S., GREGORY, A., MURRAY, A. G., MUNRO, E. S. et RAYNARD, R. S. (2008). Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in wild marine fish from scottish waters with respect to clinically infected aquaculture sites producing atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 31(3):177–186.
- WALTON, M., COWEY, C. et ADRON, J. (1984). The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British journal of nutrition*, 52(01):115–122.
- WANG, B., SUN, C., FAN, W., LIU, S.-f., LIU, Y.-b. et SUN, Y.-k. (2006). Pathogenicity and identification of pathogenic bacterium causing hemorrhagic septicemia in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Dalian Fisheries University*, 2:001.
- WANG, J., HU, J., CUI, J., BAI, X., DU, Y., MIYAGUCHI, Y. et LIN, B. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food chemistry*, 111(2):302–308.
- WANG, S.-L., LIANG, T.-W. et YEN, Y.-H. (2011). Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrate Polymers*, 84(2):732 – 742. Advances in chitin/chitosan science and their applications.
- WANG, Z. et WANG, G. (2004). APD : the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl 1):D590–D592.
- WATANABE, T. (1982). Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 73(1):3–15.
- WIJESEKARA, I., QIAN, Z.-J., RYU, B., NGO, D.-H. et KIM, S.-K. (2011). Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate. *Food Research International*, 44(3):703–707.
- WILLIOT, P. (2004). Rôle de l'aquaculture dans la conservation des espèces : exemple des esturgeons. *Aquaculture et environnement*, 26:59–66.
- WILSON, R. P. (2002). Amino acids and proteins. *Fish nutrition*, page 143.
- WILSON, T. R. (1992). *Full-fat Soybean Meal—an Acceptable, Economical Ingredient in Chinook Salmon Grower Feeds*. University of Washington.
- 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.

- YILMAZ, E., GENC, M. A. et GENC, E. (2007). Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Isr J Aquac*, 59:182–188.
- YIN, H., PU, J., WAN, Y., XIANG, B., BECHTEL, P. J. et SATHIVEL, S. (2010). Rheological and functional properties of catfish skin protein hydrolysates. *Journal of food science*, 75(1):E11–E17.
- ZAGMUTT, F. J., SEMPIER, S. H. et HANSON, T. R. (2013). Disease spread models to estimate highly uncertain emerging diseases losses for animal agriculture insurance policies : An application to the US farm-raised catfish industry. *Risk Analysis*, 33(10):1924–1937.
- 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.
- ZHANG, Y., KOUCHI, T., SHIMIZU, K., SATO, M., TAKAHATA, Y. et MORIMATSU, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6. KOR-ApoEshl mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3):208–210.
- ZHAO, Y., LI, B., DONG, S., LIU, Z., ZHAO, X., WANG, J. et ZENG, M. (2009). A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6):1028–1033.
- ZIMMERMAN, C. E., EDWARDS, G. W. et PERRY, K. (2009). Maternal origin and migratory history of steelhead and rainbow trout captured in rivers of the central valley, California. *Transactions of the American Fisheries Society*, 138(2):280–291.

Résumé

L'aquaculture est un secteur en pleine extension 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. Cependant sa croissance rapide a déjà un impact important sur l'environnement, notamment sur les stocks de poissons sauvages dont elle dépend pour la fabrication des aliments aquacoles. Dans ce contexte, l'alimentation destinée aux poissons d'élevage a considérablement évolué et a dû s'adapter aux nombreuses contraintes économiques et environnementales. L'utilisation des farines de poisson pour la formulation des aliments a particulièrement diminué au profit des farines d'origine végétale. Néanmoins, ces dernières sont moins adaptées aux besoins nutritionnels des poissons et engendrent une baisse des performances de croissance des animaux. Les hydrolysats protéiques issus des co-produits de la pêche et de l'aquaculture sont des ingrédients à fort potentiel nutritionnel et bioactif développés pour restaurer les performances de croissance obtenues avec des aliments à haute teneur en farine d'origine végétale. Ces derniers sont des mélanges complexes riches en peptides hydrolytiques et en acides aminés libres mais dont la composition est peu connue. Une approche expérimentale a été développée pour caractériser la fraction peptidique de deux hydrolysats de co-produits. Cette dernière est basée sur une approche transcriptomique permettant d'obtenir des données transcriptomiques ciblées sur les co-produits d'intérêt, associée à une approche peptidomique. En associant l'optimisation des étapes de fractionnement et la complémentarité de deux techniques de spectrométrie, il a été possible d'aboutir à l'identification de plus de 1000 peptides dans chacun de ces mélanges complexes. En parallèle, des expériences de conditionnement alimentaire menées chez le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, ont permis de mettre en évidence des propriétés nutritionnelles au moins équivalentes et souvent supérieures à celles des farines de poisson chez les bars maintenus en élevage. En effet, l'inclusion de 5% de l'un ou l'autre des deux hydrolysats étudiés dans des aliments contenant 95% de farine d'origine végétale permet de maintenir des performances de croissance équivalente à celles obtenues avec des aliments contenant 80% de farine d'origine végétale et 20% de farine de poisson. Les hydrolysats agissent par ailleurs sur la physiologie digestive du bar commun comme le montrent les profils d'expression des biomarqueurs de l'absorption intestinale suivis dans cette étude. Enfin, les deux hydrolysats possèdent une activité antibactérienne *in vitro* et l'hydrolysat de Tilapia stimule le système immunitaire du bar commun. Ces résultats démontrent l'intérêt de l'utilisation de ces deux hydrolysats en aquaculture en complément ou en remplacement des farines de poisson.

Molecular characterization and *in vivo* performances of two by-product hydrolysates.

Abstract

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 is a key sector for the maintenance and improvement of food security worldwide. However, its rapid growth has a significant impact on the environment, particularly on the stocks of wild fish used to produce aqua feed. In this context, aqua feed has dramatically evolved and has been adapted to many economic and environmental constraints. The use of fishmeal has particularly declined in favor of plant protein sources. But plant proteins are less adapted to the nutritional needs of fish and result in lower growth performances. Protein hydrolysates from fishing and aquaculture by-products are ingredients of high nutritional and bioactive potential developed to restore growth performances in high-level plant protein diets. They are rich in hydrolytic peptides and free amino acids, but they are complex mixtures whose composition is not well known. We developed an experimental approach to characterize the peptide fraction of two by-product hydrolysates based on two complementary approaches : a transcriptomics approach aimed at getting transcriptomics data about the targeted by-products, and a peptidomics approach. The peptidomics approach combined the optimization of fractionation steps and two complementary mass spectrometry techniques. Thus we identified more than 1,000 peptides in the two by-product hydrolysates. Furthermore, diet conditioning experiments conducted in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, highlighted their interesting nutritional properties to maintain growth performances of farmed fish. Indeed, dietary inclusion of 5% of these hydrolysates in a high-level plant protein diet (95%) maintained growth performances at similar levels to those obtained with diets containing 80% of plant protein. In addition, we demonstrated an influence of these by-product hydrolysates on the digestive physiology of sea bass, as shown by biomarker expression in the intestinal absorption profiles observed in the study. Finally, our work shows that (i) both hydrolysates possess *in vitro* antibacterial activity and (ii) tilapia hydrolysate stimulates the immune system of sea bass. These results demonstrate the interest of using these two hydrolysates in aquaculture in addition to or instead of fishmeal.

Mots clés : Aquaculture, Hydrolysat protéique, Transcriptomique, Peptidomique, Proteomique, *Dicentrarchus labrax*, Performances de croissance, Physiologie digestive.