

**AGROCAMPUS
OUEST**

CFR Angers

CFR Rennes



UBO
Université de Bretagne Occidentale



Année universitaire : 2019 – 2020

Spécialité : Sciences de la Mer et du Littoral, Biologie

Parcours : Sciences Halieutiques et Aquacoles

Option : Aquaculture

Mémoire de Fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (étudiant arrivé en M2)



Alimentation végétale supplémentée en DHA d'origine micro-algale au cours du cycle de reproduction de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : conséquences métaboliques chez les descendants.



Par Laura Frohn

Soutenu à Agrocampus Rennes

le 10 septembre 2019

Devant le jury composé de :

Président : Hervé LE BRIS, enseignant-chercheur, Agrocampus-Ouest

Maitre de stage : Sandrine SKIBA, directrice de recherche, NuMeA, INRA

Autres membres du jury :

Elodie REVEILLAC, enseignante-chercheuse, Agrocampus-Ouest

Yann MARCHAND, formulation et R&D, Le Gouessant

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST.

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements se tournent bien évidemment vers Sandrine et Stéphane qui ont su m'accompagner avec beaucoup de bienveillance et de patience durant mes six mois de stage. Merci de m'avoir offert ma première conférence et surtout, merci pour votre confiance, vos conseils scientifiques et vos qualités humaines.

Je remercie sincèrement toute l'équipe de l'INRA pour sa bonne humeur permanente, son accueil et son ouverture d'esprit.

Je remercie tous les techniciens et chercheurs pour leur précieux savoir. Sans vous, la vie serait tellement plus compliquée. Merci Laurence, Anne, Alex, Thomas, Vincent, Elisabeth, Geneviève, Cécile, Fred et Lucas de m'avoir épaulé lors des manip'.

Merci à Maryse, Marie-Jo, Aurélie, Olivier, Lucie, Pascale et Agnès d'avoir ensoleillé mes pauses repas.

Un grand merci à Hélène et Thérèse pour vos conseils en statistiques.

Je remercie Yhou, mon compagnon de bureau, qui aura mis mon anglais à rude épreuve tout en me transmettant sa bonne humeur et son expérience au quotidien.

Je remercie le destin de m'avoir fait rencontrer des amis merveilleux. Spéciale dédicace à tous les copains encore présents ou partis vers d'autres horizons. Dorinda, Lucas, Louise, Romain, Marius, Clément, Hervé, Lenny, Sara, Marin, Gaïa et Hélène : JE VOUS AIME !!

Je remercie de tout mon cœur la susceptible personne (qui se reconnaîtra) qui m'a fait une crise de nerfs en s'apercevant qu'elle ne figurait pas dans mes remerciements. Merci d'avoir supporté mes humeurs et angoisses pendant 6 mois. Merci d'être ce que tu es.

Je dédierais pour finir ce mémoire à ma famille. Merci à toi papa, d'avoir pris le temps de m'accompagner là où le vent m'a porté (...pour la 1000^{ème} fois). Merci à toi maman pour ton soutien inconditionnel et tes relectures. Merci à mon frère Guillaume, ma moitié, qui est resté présent par la pensée malgré les 1400 kilomètres qui nous séparent.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. AQUACULTURE ET NUTRITION DES POISSONS D'ELEVAGE.....	1
1.1. Contexte historique : de la domestication à une économie de production.....	1
1.2. L'aliment en aquaculture : les besoins lipidiques des poissons d'élevage	2
1.2.1. Généralités.....	2
1.2.2. Les lipides dans les aliments piscicoles.....	2
1.2.3. Le métabolisme des lipides.....	3
2. LE CONCEPT DE PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE	6
3. OBJECTIFS DU STAGE	7
MATERIEL ET METHODE	7
1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	7
2. DONNEES ZOOTECHNIQUES.....	11
2.1. Performances de croissance des descendants.....	11
2.2. Paramètres de consommation des descendants	11
3. ANALYSES BIOCHIMIQUES DES METABOLITES PLASMATIQUES DES DESCENDANTS.....	11
3.1. Dosage des acides aminés totaux plasmatiques	12
3.2. Dosage du glucose plasmatique.....	12
3.3. Dosage du cholestérol plasmatique.....	12
3.4. Dosage des triglycérides plasmatiques	13
4. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CORPORELLE DES DESCENDANTS	13
4.1. Détermination des teneurs en matière sèche.....	13
4.2. Lyophilisation des échantillons	14
4.3. Détermination des teneurs en cendres brutes.....	14
4.4. Dosage de l'énergie calorifique brute par calorimétrie	14
4.5. Détermination des teneurs en protéines par la méthode de Kjeldahl (1883).....	14
4.6. Détermination des teneurs en lipides totaux et acides gras par la méthode de Folch (1956).....	15
4.7. Détermination des teneurs en cholestérol corporelles	15
4.8. Détermination des teneurs en triglycérides hépatiques	16
4.9. Détermination des teneurs en glycogène hépatique et musculaire	16
4.10. Détermination de l'utilisation des nutriments par les descendants	16
5. ANALYSES MOLECULAIRES DU FOIE ET DU MUSCLE DES DESCENDANTS	16
5.1. Extraction des ARN totaux.....	17
5.2. Retrotranscription des ARN totaux en ADNc.....	17

5.3.	qPCR en temps réel de gènes cibles	17
5.4.	Activités enzymatiques.....	18
6.	ANALYSES STATISTIQUES	18
RESULTATS.....		19
1.	TAUX DE SURVIE ET PERFORMANCES DE CROISSANCE DES DESCENDANTS DE LA PREMIERE ALIMENTATION A LA FIN DU CHALLENGE VEG+DHA.....	19
2.	COMPOSITIONS CORPORELLES ET UTILISATION DE L'ALIMENT CHALLENGE VEG+DHA.....	20
3.	PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES DES DESCENDANTS A LA FIN DU CHALLENGE VEG+DHA	25
3.1.	Biochimie plasmatique	25
3.2.	Niveaux d'ARNm de gènes-clés du métabolisme des lipides	25
3.3.	Activités d'enzymes-clés de la lipogenèse et de la voie des pentoses phosphates	27
DISCUSSION		28
1.	LES MICRO-ALGUES : UNE NOUVELLE SOURCE DE DHA POUR LES ALIMENTS PISCICOLES	28
2.	PERFORMANCES DE REPRODUCTION DES GENITRICES ET EFFETS DE L'ALIMENTATION MATERNELLE SUR LA CROISSANCE DES DESCENDANTS.....	29
3.	LA NUTRITION MATERNELLE SEMBLE PROGRAMMER LE METABOLISME DES DESCENDANTS SUR DU COURT-TERME.....	30
3.1.	Métabolisme du cholestérol	31
3.2.	Lipogenèse.....	32
3.3.	Biosynthèse des acides gras à longue chaîne	33
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		35
BIBLIOGRAPHIE		36
ANNEXES.....		40

GLOSSAIRE

Alimentation endotrophe Période durant laquelle l'alevin se nourrit des réserves nutritives accumulées dans le vitellus.

Alimentation exotrophe Passage à une alimentation exogène grâce à l'ouverture de l'œsophage.

Aquaculture Elevage d'espèces aquatiques à des fins de commercialisation.

Chylomicron Lipoprotéine sanguine formée au cours de la digestion et constituée de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol.

Cytosol Partie liquide du cytoplasme des cellules.

Désaturation Amputation d'un ou plusieurs atomes à une molécule saturée.

Efficacité alimentaire Gain de poids observé au cours d'une période en fonction de l'aliment ingéré.

Elongation Addition d'atomes ou de composés chimiques à une molécule.

Enzyme Molécule organique dont le pouvoir catalyseur agit lors des réactions biochimiques.

Epigénétique Modification de l'expression de gènes sous l'action de stimuli environnementaux sans modification de la séquence nucléotidique.

Formulation Choix des proportions nutritives adaptées à une espèce dans un aliment.

Gain Désigne le bénéfice apporté par un aliment.

Hépatocytes Cellules du foie.

Indice hépato somatique Rapport du poids du foie sur le poids du poisson. Il traduit l'état nutritionnel et la métabolisation des lipides par l'organisme.

Indice viscéro somatique Rapport du poids des viscères sur le poids du poisson. Il traduit l'état nutritionnel et la métabolisation des lipides par l'organisme.

Ingestion Désigne l'acte d'absorber une substance nutritive par la bouche.

Lipogénèse Néo-production de graisses par un organisme.

Lipolyse Dégradation des graisses par un organisme.

Lipoprotéine Molécule composée d'une protéine et un corps gras.

Métabolisme Réactions biologiques et chimiques se produisant au sein d'un organisme.

Mitochondrie Organite cytoplasmique impliqué dans les réactions énergétiques de la cellule.

Nutrition Transformation, assimilation et excrétion des nutriments dans un organisme vivant.

Ovogenèse Etape durant laquelle se forment les ovules.

Pellets Granulés alimentaires destinés aux poissons d'élevage.

Peroxisome Organite cytoplasmique impliqué dans la production d'enzymes.

Prise alimentaire journalière Quantité journalière d'aliment ingéré.

Rétention Accumulation d'une substance biologique dans un organisme sans être excrétée.

Taux spécifique de croissance Représente l'augmentation de poids journalière d'un organisme.

Vitellogenèse Phase du cycle dans laquelle se forme le vitellus où s'accumule l'ensemble des réserves nutritives pour l'embryon.

Vitellus Réserves nutritives pour l'embryon dont l'alimentation est exclusivement endotrophe.

LISTE DES ABREVIATIONS

% : pourcent

%·j⁻¹ : pourcentage par jour

%cendres : pourcentage de cendres brutes

%f : pourcentage de frais

%LT : pourcentage des lipides totaux

%MS : pourcentage de masse sèche

∑LC-PUFA n-3 : somme des acides gras polyinsaturés à longue chaîne oméga 3

∑LC-PUFA n-6 : somme des acides gras polyinsaturés à longue chaîne oméga 6

∑MUFA : somme des acides gras mono-insaturés

°C : degrés Celsius

°C·10 s⁻¹ : degrés Celsius par 10 secondes

µg : microgramme

µg·ml⁻¹ : microgramme par millilitre

µl : microlitre

µmol·l⁻¹ : micromole par litre

µmol·ml⁻¹ : micromole par millilitre

abca1 : gène codant pour l'ATP-binding transporter cassette A1

ABCA1 : protéine ATP-binding transporter cassette A1

abcg5 : gène codant pour l'ATP-binding cassette sub-family G member 5

ABCG5 : protéine ATP-binding cassette sub-family G member 5

abcg8 : gène codant pour l'ATP-binding cassette sub-family G member 8

ABCG8 : protéine ATP-binding cassette sub-family G member 8

acetylCoA : acétyl-coenzyme A

ACLY1 : enzyme ATP citrate lyase

acy1 : gène codant pour l'ATP citrate lyase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AL : acide linoléique

ALA : acide α-linolénique

ARA : acide arachidonique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNr : acide ribonucléique ribosomiale

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine triphosphate

CHOD-POD : cholestérol oxydase-peroxydase

COM : aliment commercial

CP : concentré protéique

CPG : chromatographie en phase gazeuse

cpt1a : gène codant pour la carnitine palmitoyltransferase a

CPT1A : protéine carnitine palmitoyltransferase a

cpt1b : gène codant pour la carnitine palmitoyltransferase b

cpt1c : gène codant pour la carnitine palmitoyltransferase c

cpt1d : gène codant pour la carnitine palmitoyltransferase d

CYP51A : enzyme lanostérol 14-α-déméthylase

cyp51a : gène codant pour enzyme la lanostérol 14-α-déméthylase

CYP7A : enzyme cholestérol 7 alpha-hydroxylase

cyp7a : gène codant pour la cholestérol 7 alpha-hydroxylase

DFI : prise alimentaire journalière

DHA : acide docosahexaénoïque

DHCR7 : enzyme 7-déhydrocholestérol synthase

dhcr7 : gène codant pour la 7-déhydrocholestérol synthase

dNTP : désoxyribonucléotides

ELOVL2 : enzyme élongase 2

elovl2 : gène codant pour l'élongase 2

ELOVL5 : enzyme élongase 5

elovl5 : gène codant pour l'élongase 5

EPA : acide eicosapentaénoïque

FADS2 : enzyme $\Delta 6$ -désaturase

fads2 : gène codant pour la $\Delta 6$ -désaturase

FAS : enzyme acide gras synthase

fasn : gène codant pour l'acide gras synthase

FE : efficacité alimentaire

g : gramme

$g \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$: gramme par kilogramme par jour

G6PDH : enzyme glucose 6-phosphate déshydrogénase

g6pdh : gène codant pour la glucose 6-phosphate déshydrogénase

GOD-POD : glucose oxydase-peroxydase

GPO-POD : glycérol-3-oxydase-peroxydase

HMG-CoA : coenzyme 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A

HMGCR : enzyme 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA réductase

hmgcR : gène codant pour la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA réductase

HMGCS : enzyme 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA synthase

hmgcS : gène codant pour la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA synthase

HOAD : enzyme 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

hoad : gène codant la 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

j^{-1} : jour moins un

$KJ \cdot g^{-1}$: kilojoule par gramme

$KJ \cdot g^{-1}$ MS : kilojoule par gramme de matière sèche

LC-PUFA n-3 : acide gras polyinsaturé à longue chaîne

m : mètre

malonylCoA : malonyl coenzyme A

mg : milligramme

$mg \cdot g^{-1}$: milligramme par gramme

$mg \cdot ml^{-1}$: milligramme par millilitre

min : minutes

min^{-1} : minute moins un

ml : millilitre

$ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$: millilitre par micromole par centimètre

$ml \cdot min^{-1}$: millilitre par minute

mm : millimètre

$mmol \cdot l^{-1}$: millimole par litre

$mol \cdot l^{-1}$: mole par litre

$mU \cdot g^{-1}$: milli-unité par gramme

MUFA : acide gras mono-insaturé

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH, H^+ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

nm : nanomètre

NR : non renseigné

$pg \cdot \mu l^{-1}$: picogramme par microlitre

pmf : poids moyen final

pmi : poids moyen initial

rpm : rotation par minute

RT : retrotranscription

SGR : taux spécifique de croissance

VEG : aliment végétal

VEG+DHA : aliment végétal supplémenté en DHA

VLC-PUFA n-3 : acide gras oméga 3 polyinsaturé à très longue chaîne

VLC-PUFA n-6 : acide gras oméga 6 polyinsaturé à très longue chaîne

LISTE DES FIGURES

Figure 1. *Schéma simplifié des différentes voies du métabolisme des lipides.*

Figure 2. *Vue schématique des niveaux d'application des stimuli nutritionnels précoces au cours du cycle de développement chez le poisson (adapté de Panserat et al., 2018 ; ©Warren photographic).*

Figure 3. *Résumé schématique du protocole expérimental.*

Figure 4. *Performances de croissance des descendants de truite arc-en-ciel entre la première alimentation et la fin du challenge VEG+DHA.*

Figure 5. *Comparaison des teneurs corporelles des descendants en EPA et en DHA avant et à la fin du challenge VEG+DHA (en % des acides gras totaux).*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. *Ingrédients et composition des aliments.*

Tableau 2. *Composition des aliments en acides gras (en % des acides gras totaux).*

Tableau 3. *Paramètres biométriques, performances de croissance et taux de survie des descendants à partir de la première alimentation.*

Tableau 4. *Utilisation de l'aliment VEG+DHA par les descendants durant les 12 semaines de challenge.*

Tableau 5. *Composition corporelle des descendants à la fin du challenge VEG+DHA.*

Tableau 6. *Profil en acides gras des juvéniles avant le challenge VEG+DHA (en % des acides gras totaux).*

Tableau 7. *Profil en acides gras à la fin du challenge VEG+DHA (en % des acides gras totaux).*

Tableau 8. *Effets du passé nutritionnel maternel sur les teneurs en métabolites plasmatiques des descendants soumis à un challenge alimentaire VEG+DHA de 12 semaines.*

Tableau 9. *Effets du passé nutritionnel maternel sur les niveaux d'ARNm de gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras à longue chaîne dans le muscle des juvéniles soumis au challenge VEG+DHA.*

Tableau 10. *Effets du passé nutritionnel maternel sur les niveaux d'ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie des descendants soumis au challenge VEG+DHA.*

Tableau 11. *Effet du passé nutritionnel maternel sur les activités enzymatiques (en $\text{mU}\cdot\text{g}^{-1}$ de protéines) de la glucose-6-phosphatase (G6PDH) et de l'acide gras synthase (FAS) dans le foie des juvéniles soumis au challenge VEG+DHA.*

Tableau 12. *Cycle de lyophilisation utilisé dans l'appareil SERAIL CS5-0,4.*

Tableau 13. *Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.*

Tableau 14. *Performances de reproduction des génitrices après 25 semaines d'alimentation.*

LISTE DES ANNEXES

Annexe I – Dosage des acides aminés totaux plasmatiques

Annexe II – Dosage du glucose plasmatique et du glycogène hépatique et musculaire

Annexe III – Dosage du cholestérol plasmatique et corporel

Annexe IV – Dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques

Annexe V – Détermination des teneurs en matière sèche

Annexe VI – Lyophilisation des échantillons pour analyses

Annexe VII – Détermination des teneurs en cendres brutes

Annexe VII – Dosage de l'énergie calorifique brute par calorimétrie

Annexe IX – Détermination des teneurs en protéines par la méthode de Kjeldahl (1883)

Annexe X – Détermination des teneurs en lipides totaux et acides gras par la méthode de Folch (1956)

Annexe XI – Extraction d'ARN totaux

Annexe XII – Retrotranscription des ARN totaux en ADNc

Annexe XIII – qPCR en temps réel des ARN cibles

Annexe XIV – Activités enzymatiques et dosage des protéines hépatiques

Annexe XV – Performances de reproduction des génitrices

INTRODUCTION

1. AQUACULTURE ET NUTRITION DES POISSONS D'ELEVAGE

1.1. Contexte historique : de la domestication à une économie de production

La Révolution Néolithique (14 000 à 7 000 avant J.-C.), induite par l'abandon progressif des activités de chasse et de cueillette, a poussé l'Homme à développer de nouvelles pratiques agricoles. Cette nouvelle ère a été accompagnée d'une explosion démographique où les populations, devenues davantage sédentaires, ont été amenées à domestiquer certaines espèces végétales et animales pour leur alimentation et le commerce (Nash, 2010; Sauer, 1952; Senécal, 2010).

Précédée par la culture de végétaux, la domestication d'animaux terrestre a été initiée par l'élevage de bétail en 6000 av. J.-C.. Les prémices de domestication aquacole sont quant à elles plus contemporaines et ont été datées à 1500 av. J.-C. suite à la découverte de fresques égyptiennes dépeignant l'élevage du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) dans des étangs (Teletchea, 2016). Un peu plus tard, en Chine, les écrits originaux de la dynastie Chou (1100 av. J.-C.) décrivaient de façon détaillée la domestication de la carpe commune *Cyprinus carpio* utilisée à des fins alimentaires et ornementales. L'élevage de cette espèce s'est ensuite largement développée jusqu'à la prise de pouvoir de la famille Tang en l'an 618. Le nom de l'empereur faisant référence à celui de la carpe commune, l'abatage de ce poisson s'est vu être interdit durant près de trois siècles, forçant la Chine à diversifier les espèces aquatiques cultivées (Nash, 2010). Dans l'Antiquité, les romains ont été pionniers dans le stockage d'animaux aquatiques via l'utilisation de viviers marins et de parcs ostréicoles. Des carpes communes danubiennes ont également été importées de l'Europe de l'Est à cette même période et leur élevage s'est finalement rapidement répandue vers l'Ouest et en Angleterre sous l'influence de l'Eglise Cistercienne (Costa-Pierce, 2008). L'aquaculture s'est longtemps limitée aux pratiques ancestrales mais a connu durant les siècles suivant, des bouleversements majeurs en termes de maîtrise des cycles d'élevage, de modernisation et de diversification des systèmes de production. C'est au cours du 18^{ème} siècle qu'apparurent les premiers essais de fertilisation artificielle sur la truite européenne *Salmo trutta*. Cette découverte a permis à l'Europe de développer ses piscicultures de salmonidés avec l'élevage de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à la fin du 19^{ème} siècle. La production de truite fut alors la première production piscicole intensive en France. Les résultats fructueux obtenus sur ces poissons dulcicoles ont par la suite induit le développement d'écloseries d'espèces marines (e.g. crevette royale *Penaeus japonicus*, huitre creuse japonaise *Magallana gigas*, bar rayé *Morone saxatilis*) dans le monde à partir de 1980, permettant aux éleveurs de se défaire de leur dépendance au milieu naturel. Principalement utilisé en milieu ouvert, l'élevage d'animaux aquatiques a ensuite transité vers la culture en milieu fermé permettant un meilleur control de la qualité de l'eau, de la survie et de maîtriser la croissance des animaux (Doumenge, 1986; Harache, 2002; Ifremer, 2011).

Malgré son développement et sa modernisation, l'aquaculture est longtemps restée en retrait face à l'accaparement du marché par les activités de pêche de capture. En 1980, la majeure partie de la production carnée aquatique mondiale était effectivement assurée par les activités de pêche en milieu naturel. En 1950, la production aquacole ne dépassait pas les 600.000 tonnes, soit environ 3% du tonnage total incluant les 19 millions de tonnes issues des pêches de capture. L'augmentation incessante de la population mondiale et la diminution des

ressources halieutiques ont finalement suggéré le développement mondial de l'aquaculture à la fin du 20^{ème} siècle. Avec une production estimée à 110 millions de tonnes comprenant plus de 500 espèces en 2016, l'aquaculture s'est rapidement insérée dans une économie de production et de négoce. Elle représente aujourd'hui 16,5% de la production carnée totale et 55% de la production de poissons de consommation mondiale, générant ainsi près de 243,5 milliards de dollars de chiffre d'affaire en 2016 (FAO, 2016; Fry et al., 2018).

Dans un contexte de diminution des ressources halieutiques et de réduction des quotas de pêche, l'aquaculture est aujourd'hui confrontée à la stagnation de la production d'huile et de farine de poissons minotiers utilisées dans la confection des aliments piscicoles. Un déséquilibre proche entre l'offre et la demande est donc à prévoir, invitant l'aquaculture à trouver des alternatives durables à l'utilisation d'huile et de farine de poissons. Ces préoccupations ne sont pas récentes puisque l'incorporation d'ingrédients végétaux a permis de faire évoluer les formulations en réduisant la part de protéines animales dans les aliments aquacoles. Une substitution totale n'est cependant pas encore envisageable car elle provoque une diminution des performances de croissance et de reproduction chez de nombreuses espèces mais également une altération de la qualité de la chair, notamment en termes de compositions en acides gras (De Francesco et al., 2007; Drew et al., 2007; Lazzarotto et al., 2016; Mourente and Bell, 2006). **Le remplacement des huiles et farines de poisson par de nouvelles matières premières est donc à mettre en lien avec les particularités nutritionnelles respectives de chaque espèce de poisson.**

1.2. L'aliment en aquaculture : les besoins lipidiques des poissons d'élevage

1.2.1. Généralités

Jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle, les formes d'alimentation en aquaculture sont restées relativement ascétiques puisqu'elles reposaient exclusivement sur la productivité intrinsèque des bassins d'élevage ou sur l'utilisation de sous-produits animaux et végétaux non consommés par l'Homme (Davis, 2015; Tacon and Metian, 2015). La forte demande en produits aquatiques a néanmoins rapidement relevé l'inefficacité de ces pratiques en termes de productivité, encourageant les professionnels à développer des techniques d'amendement artificiel adaptées aux espèces. L'alimentation des espèces aquacoles n'a réellement été prise en considération qu'à partir des années 1950 lors de l'arrivée des premiers aliments artificiels humides et des pellets secs. Cette révolution zootechnique a alors inspiré la recherche scientifique à mieux comprendre et à améliorer la nutrition des espèces d'intérêt dans l'optique de couvrir leurs besoins nutritionnels et de produire des poissons riches en protéines, en minéraux, en vitamines et en acides gras essentiels pour l'Homme (Le Gouvello and Simard, 2017).

Selon Webber and Riordan (1976), la connaissance des caractéristiques biologiques propres aux organismes cultivés est primordiale et permet d'assurer la bonne conduite du système d'élevage. Les bases de la nutrition et de la formulation des aliments aquacoles se sont de ce fait fondées sur des études du comportement alimentaire des espèces dans leur milieu naturel. Ainsi, ces organismes ont pu être catégorisés en fonction de leurs besoins en protéines, lipides, carbohydrates, vitamines et minéraux mais également en fonction de l'aliment dominant de leur régime. Les herbivores consomment préférentiellement des végétaux (e.g. certains cyprinidés), les détritivores se nourrissent de matière organique morte (e.g. les siluriformes et crustacés), les carnivores ou piscivores mangent d'autres animaux (e.g. les salmonidés) et les omnivores ont une alimentation mixte (e.g. le tilapia). Cette diversité implique donc de considérer chaque espèce dépendamment de ses besoins

nutritionnels et de ses capacités métaboliques, d'autant plus que certaines espèces carnivores, telle que la truite, utilisent mal les glucides au niveau métabolique (Panserat et al., 2001). **Au vu de la grande diversité nutritionnelle des espèces aquatiques, ce travail s'est focalisé sur les besoins en lipides et acides gras des poissons d'élevage.**

1.2.2. *Les lipides dans les aliments piscicoles*

Les lipides, de par leur haute valeur énergétique ($39,5 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ contre $17,2 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les glucides) et leur composition en acides gras, constituent un des principaux ingrédients des aliments piscicoles. Ces lipides sont majoritairement apportés par les huiles de poissons qui tendent, depuis les 25 dernières années, à être remplacées par des huiles végétales moins onéreuses mais dépourvues en acides gras oméga 3 polyinsaturés à très longue chaîne (VLC-PUFA n-3) tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3). En effet, la plupart des végétaux sont riches en acides gras à 18 carbones mais ne contiennent pas d'EPA et de DHA, leur conférant ainsi des qualités nutritionnelles amoindries par rapport à des huiles de poissons. Bien que certaines espèces, comme la truite et le saumon, soient capables de biosynthétiser des VLC-PUFA à partir l'acide linoléique (AL) et de l'acide α -linoléique (ALA), les quantités produites restent trop faibles et la chair des poissons conserve rarement les qualités organoleptiques et nutritionnelles appréciées pour l'alimentation humaine (Cahu, 2004; Gélinau et al., 2001; Guillaume et al., 2001; Halver, 2013; Nasopoulou and Zabetakis, 2012; Watanabe, 1982). De plus, l'EPA et le DHA apparaissent comme des acides gras fondamentaux pour la croissance et l'intégrité des larves lors des premiers stades de vie (Watanabe, 1993).

La composition des aliments piscicoles est riche en lipides (e.g. 15-20% chez le truite et 30% chez les saumon). Ces fortes teneurs permettent aux poissons d'utiliser préférentiellement les lipides comme substrat énergétique et de réserver les protéines pour leur croissance. Le remplacement total ou partiel des huiles de poissons par des huiles végétales reste de ce fait possible chez de nombreuses espèces puisqu'il n'affecte pas leurs performances de croissance. En revanche, ces aliments riches en lipides engendrent des bouleversements métaboliques qui conduisent *in fine* à un engraissement périviscéral et musculaire de l'animal (Kolditz, 2008; Médale et al., 2013; Watanabe, 1982). **Le métabolisme des lipides dépendant en partie de l'alimentation, ce travail s'est concentré sur les mécanismes biochimiques propres aux lipides et aux acides gras.**

1.2.3. *Le métabolisme des lipides*

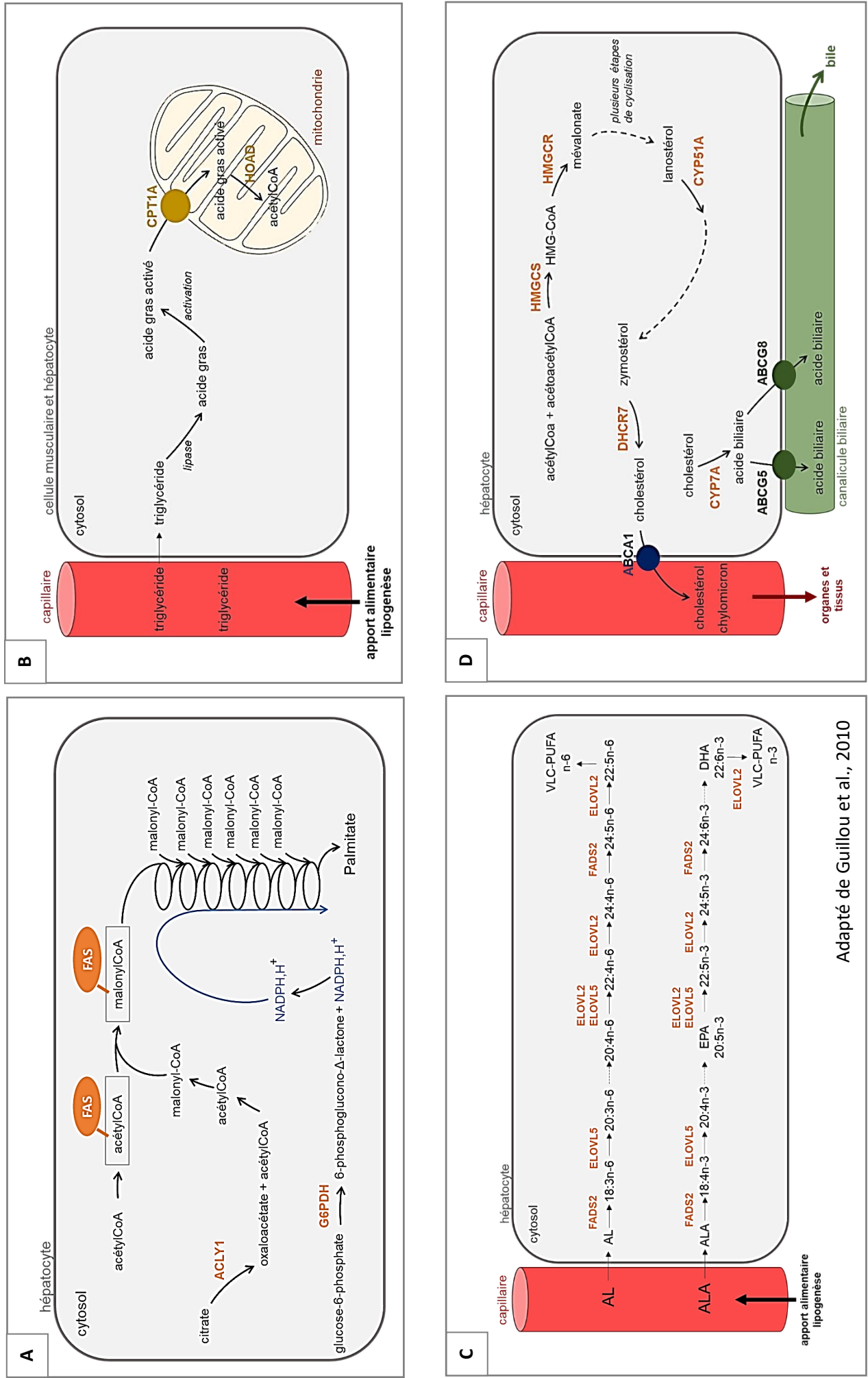
Le métabolisme des lipides débute lors de la digestion et de l'absorption et se subdivise ensuite en différentes voies métaboliques. Chez les poissons, la lipolyse s'effectue principalement dans le duodénum sous l'action émulsifiante de la bile produite par le foie et l'action lytique des lipases pancréatiques qui transforment les lipides en acides gras libres et en glycérol. L'absorption de ces nutriments, encore mal connue chez les poissons, semblent néanmoins suivre les grands principes physiologiques de diffusion passive et de transport actif illustrés chez les mammifères, et s'effectuent au niveau des villosités qui tapissent la paroi interne de l'intestin grêle. Suite à l'absorption, les nutriments lipidiques peuvent être impliqués dans différentes réactions biochimiques au niveau des hépatocytes, le foie étant l'acteur central du métabolisme nutritionnel (Tocher, 2003). **Les principales protéines de transport, enzymes et voies métaboliques étudiées durant le stage sont présentées dans les paragraphes suivants.**

La **lipogenèse** joue un rôle majeur dans la néosynthèse des acides gras mono-insaturés à 16 ou 18 carbones (MUFA) chez les animaux. L'ATP citrate lyase ACLY1 (EC2.3.3.8) initie la formation de l'acétyl-coenzyme A (acétylCoA) nécessaire aux premières étapes de la lipogenèse. Cette voie métabolique se déroule dans le cytosol des hépatocytes et catalyse l'ajout successif de malonyl-coenzyme A (malonylCoA) à l'acétylCoA grâce à l'acide gras synthase FAS (EC2.3.1.85). L'action de la FAS est appuyée par la coenzyme réduite NADPH,H⁺ principalement fournie par la glucose-6-phosphate déshydrogénase G6PDH (EC1.1.1.49) au cours de la voie des pentoses phosphates (**Figure 1A**).

Les poissons catabolisent les lipides préférentiellement aux glucides pour couvrir leurs besoins énergétiques. Le catabolisme des lipides se déroule dans les mitochondries et peroxysomes des cellules musculaires via la **β -oxydation des acides gras**. Les triglycérides, synthétisés au cours de la lipogenèse ou apportés par l'aliment, sont transportés par voie sanguine à l'ensemble des tissus et notamment aux muscles où ils seront absorbés par diffusion à travers la membrane cytoplasmique. Une fois dans le cytosol, les triglycérides sont clivés en acides gras sous l'action de lipases, puis activés et transportés dans la mitochondrie par les navettes carnitine composées de deux protéines membranaires dont la carnitine palmitoyltransferase 1 codées par les paralogues *cpt1a*, *cpt1b*, *cpt1c* et *cpt1d*. L'oxydation des acides gras permet de former des molécules d'acétylCoA et est réalisée au cours de nombreuses réactions enzymatiques dont fait partie l'enzyme 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase HOAD (EC1.1.1.35) (**Figure 1B**).

Les animaux ne possèdent pas la capacité de biosynthétiser les acides gras oméga 3 polyinsaturés à longue chaîne (LC-PUFA n-3). L'acide linoléique (AL, 18:2n-6) et l'acide α -linoléique (ALA, 18:3n-6) doivent donc nécessairement être apportés par l'alimentation. En effet, l'AL et l'ALA sont les précurseurs respectifs de la **biosynthèse des LC-PUFA oméga 3 et oméga 6**. Par désaturation et élongation successives, ces deux acides gras permettent d'obtenir des VLC-PUFA n-3 et VLC-PUFA n-6. L'ALA permet notamment de synthétiser l'EPA et le DHA sous l'action de la Δ 6-désaturase FADS2 (EC1.14.19.3) et des élongases 2 et 5 (ELOVL2 - EC2.3.1.199 et ELOVL5- EC2.3.1.199) (**Figure 1C**).

Le **métabolisme du cholestérol** se divise en deux grandes sections métaboliques : la synthèse à proprement parler et son élimination par la bile suite à la synthèse d'acides biliaires. Premièrement, la **synthèse du cholestérol** est engagée par la synthèse du 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA HMG-CoA (EC2.3.3.10) dans le cytosol des hépatocytes à partir de l'acétylCoA et de l'acétoacétyl-coenzyme A sous l'action d'une synthase codée par le gène *hmgcS*. Puis, l'HMG-CoA est réduit en mévalonate par la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA réductase HMGCR (EC1.1.1.34). Le lanostérol formé après plusieurs étapes de cyclisation est ensuite transformé en zymostérol sous l'action de la lanostérol 14- α -déméthylase CYP51A (EC1.14.14.154). La dernière étape de la synthèse du cholestérol est finalement catalysée par la 7-déhydrocholestérol synthase DHCR7 (EC1.3.1.21). Le cholestérol ainsi biosynthétisé peut ensuite être transporté, sous sa forme libre ou être associé à des lipoprotéines dans des chylomicrons, par la protéine de transport ATP-binding transporter cassette A1 (ABCA1) vers le sang afin d'être distribué vers les tissus et les organes en besoin. Le cholestérol en excès peut également être dégradé par le foie en acides biliaires par l'enzyme cholestérol 7 alpha-hydroxylase a CYP7A (EC1.14.14.23) et être éliminé dans la canalicule biliaire par les protéines transmembranaires ATP-binding cassette sub-family G member 5 et 8 (ABCG5 et ABCG8) (**Figure 1D**) (Beigneux et al., 2004; Council et al., 2011; Guillou et al., 2010; Stryer et al., 2003; Tocher et al., 2008; Turkmen et al., 2019).



Adapté de Guillou et al., 2010

Figure 1. Schéma simplifié des différentes voies du métabolisme des lipides (©Laura Frohn, 2019, INRA-NuMeA).
 A : lipogénèse ; B : β -oxydation des acides gras ; C : biosynthèse des acides gras à longue chaîne ; D : métabolisme du cholestérol

2. LE CONCEPT DE PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE

Il a été montré que des événements environnementaux agissant aux stades précoces de développement d'un organisme étaient susceptibles d'impacter ses caractéristiques biologiques sur le long terme. Qu'ils soient d'origine endogène, exogène, biotique ou abiotique, ces stimuli peuvent être enregistrés et retenus par l'organisme, et programmer durablement son développement ainsi que ses fonctions cognitives et physiologiques. Ce phénomène, mieux connu sous le terme de programmation, a été décrit par la théorie des 4 R « The 4 R's of programming » par Hales et Barker à la fin du 19^{ème} siècle. Lors des stades précoces, l'organisme peut recevoir et enregistrer un stimulus (Receive et Record) dont il se rappellera (Remember) et qu'il exprimera sous la forme d'un phénotype particulier en tant que juvénile ou à l'âge adulte (Reveal) (Bock and Whelan, 2008; Hales and Barker, 1992; Lucas, 1998).

Compte tenu de l'évidence de l'action de certains stimuli sur le devenir des organismes, il a ensuite été question de comprendre si d'autres facteurs, telle que la nutrition, pouvaient être sujets à programmation. C'est dans les années 1960 que le concept de *programmation nutritionnelle* a vu le jour. Il est apparu que la *programmation nutritionnelle* pouvait être induite durablement à travers l'alimentation maternelle (**a**), via les facteurs environnementaux abiotiques (e.g. hypoxie ; Liu et al., 2017) (**b**) mais aussi lors de la première alimentation (**c**) (**Figure 2**). En effet, de nombreuses études sur les mammifères ont permis de montrer l'existence d'effets durables de la nutrition pré- et postnatale sur les mécanismes physiologiques des organismes (Lucas, 1998). Il a notamment été montré chez le rat, qu'une modification de la composition alimentaire durant une période de forte plasticité métabolique pouvait engager, sous l'action de la *programmation nutritionnelle*, un remaniement métabolique exprimé sous la forme d'un phénotype nutritionnel spécifique à l'âge adulte (McCance, 1962; Widdowson Elsie May and McCance Robert Alexander, 1963). Largement étudiée chez les mammifères, la *programmation nutritionnelle* chez le poisson a été initiée par les travaux de (Geurden et al., 2007)) sur des juvéniles de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* lors de la première alimentation. Aujourd'hui, la recherche s'est tournée vers l'étude de la *programmation nutritionnelle* à différents stades de vie et sur de nombreuses espèces de poisson. Les mécanismes à l'origine de la programmation sont à ce jour encore mal connus. Néanmoins, la modification de la composition des réserves nutritives fœtales via l'alimentation maternelle et les mécanismes épigénétiques pourraient être impliqués dans le processus de *programmation nutritionnelle* (Panserat et al., 2018).

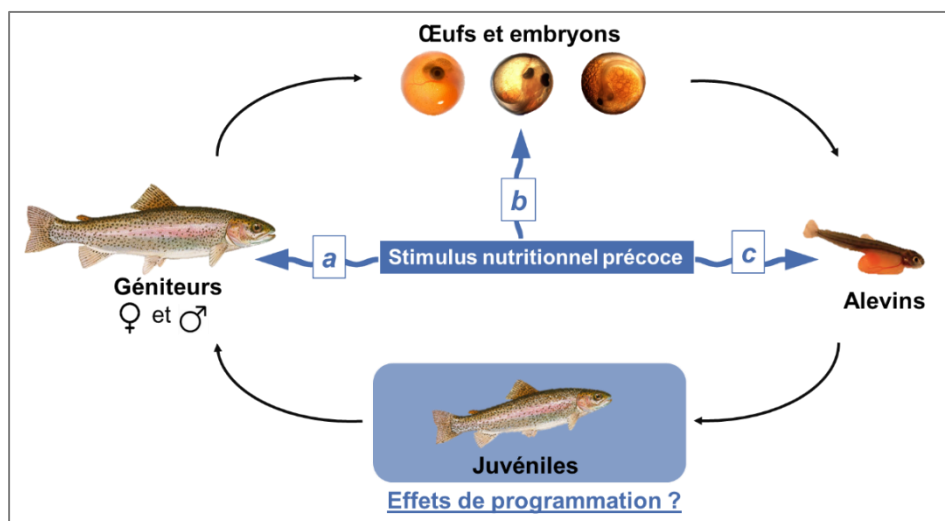


Figure 2. Vue schématique des niveaux d'application des stimuli nutritionnels précoces au cours du cycle de développement chez le poisson (adapté de Panserat et al., 2018 ; ©Warren photographic).

Dans le contexte aquacole actuel, la *programmation nutritionnelle* pourrait être un des leviers de l'amélioration de l'utilisation de nouveaux ingrédients. **Dans cette étude, avec l'hypothèse que le régime maternel puisse affecter la composition du vitellus notamment au niveau des réserves lipidiques, il a été choisi d'appliquer le stimulus nutritionnel à travers l'alimentation lipidique de génitrices de truites arc-en-ciel.**

3. OBJECTIFS DU STAGE

Le travail présenté dans ce mémoire vise à **évaluer les conséquences d'une alimentation végétale, supplémentée ou non en DHA d'origine micro-algale, au cours du cycle de reproduction de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) sur les performances de croissance et le métabolisme des descendants.**

Durant les 26 semaines précédant la reproduction, des génitrices de truite arc-en-ciel ont été nourries avec un aliment strictement végétal supplémenté ou non en DHA. Les juvéniles obtenus ont ensuite été challengés avec un aliment végétal supplémenté en DHA dans le but d'évaluer leur réponse métabolique. En fonction du régime nutritionnel maternel, il s'agissait d'évaluer chez les descendants :

- (1) les performances de croissance et les paramètres alimentaires ;
- (2) les teneurs de certains indicateurs métaboliques plasmatiques ainsi que les compositions corporelles ;
- (3) l'expression de certains gènes du métabolisme des lipides et les activités d'enzymes-clés de la lipogenèse.

MATERIEL ET METHODE

1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'expérimentation support de mon stage de Master 2 a été réalisée dans le cadre du projet NutriEgg. Proposé par l'INRA en 2016 pour une durée de 3 ans, le programme scientifique NutriEgg est porté par les unités de recherche NuMeA (Nutrition, Métabolisme et Aquaculture) de Saint-Pée sur Nivelle et LPGP (Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons) de Rennes et s'appuie sur les dispositifs expérimentaux des piscicultures INRA des Monts d'Arrée (PEIMA, Sizun, France) et de Donzacq (France). Ce programme a été financé à hauteur de 500.000 euros par le Fonds Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche (FEAMP) et s'inscrit dans un contexte de développement durable de la pêche et de l'aquaculture. L'expérimentation a été effectuée conformément aux lois françaises et européennes concernant la protection et le bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques (Directive 2010/63/EU). Le protocole expérimental n'a pas été soumis à un comité d'éthique car les régimes utilisés ont été formulés de façon à couvrir les besoins nutritionnels des poissons et les prélèvements tissulaires ont tous été effectués après anesthésie puis euthanasie des poissons.

Le protocole expérimental est schématisé dans la **Figure 1**. Des femelles de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (souche automnale) ont été produites et élevées sous photopériode et condition de température naturelles dans les installations de la PEIMA. Au début de l'expérience (décembre 2017), les femelles (1420 ± 245 g) ont été divisées aléatoirement en trois groupes dans des bassins extérieurs et nourries avec des régimes alimentaires différents. Le premier groupe de génitrices a été nourri avec un régime commercial (Le Gouessant, Lamballe, France) (COM), le second groupe avec un régime exclusivement végétal (VEG) et le troisième groupe avec un régime exclusivement végétal mais supplémenté en DHA d'origine micro-algale (VEG+DHA). Les génitrices ont été nourries à satiété visuelle avec leur aliment respectif durant 25 semaines. Chaque traitement alimentaire a été réalisé en triplicatas de bassins. Les ingrédients et la composition de chaque aliment sont présentés dans le **Tableau 1** et le **Tableau 2**. A la fin des 25 semaines d'alimentation (juin 2018), 4 femelles ovulantes (2423 ± 262 g) par traitement ont été sélectionnées et strippées manuellement. Les œufs obtenus ont été fécondés avec un pool de spermatozoïdes de mâles nourris avec un aliment commercial. Les paramètres biométriques de chaque femelle ont été relevés (adiposité du muscle évaluée par fatmétrie, mesures de poids et de taille). Les gonades, le foie et les viscères ont été prélevés. Le nombre d'œufs par ponte, le taux d'œufs blancs (24 heures après hydratation), le diamètre moyen des œufs, le taux de survie à l'éclosion et le taux de malformés ont également été mesurés. Les œufs fécondés ont été séparés par régime d'origine de leur génitrice. A la première alimentation (environ 60 j^{-1} post-fécondation, août 2017), l'ensemble des alevins (73 ± 4 mg) a été nourri avec un aliment commercial classique durant 24 semaines. Les biomasses totales par bassin, les quantités d'aliment distribuées et les taux de survie ont été relevés toutes les 3 semaines. A la fin des 24 semaines (novembre 2018), les juvéniles ($16 \pm 0,5$ g) ont été transférés à la pisciculture expérimentale INRA de Donzacq (France) puis acclimatés aux conditions du site durant une semaine. Les individus ont été divisés selon le passé nutritionnel de leurs génitrices respectives à raison de 50 individus par bassin et de 3 bassins par traitement. A la fin de l'acclimatation, 6 individus par régime maternel ont été sédatés (benzocaïne, $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), puis mis à mort par surdose anesthésique (benzocaïne, $90 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) avant d'être congelés à -80°C (**Figure 3 en A**). Les juvéniles (tous régimes maternels confondus) ont ensuite été soumis à un challenge nutritionnel avec l'aliment strictement végétal supplémenté en biomasse algale riche en DHA (VEG+DHA). Les animaux ont été nourris 2 fois par jour à satiété visuelle sur une durée totale de 12 semaines. Les biomasses totales par bassin, les quantités d'aliment distribuées et les taux de survie ont été relevés toutes les 3 semaines durant le challenge nutritionnel. A la fin des 12 semaines (février 2019) et 6 heures après le dernier repas, 6 descendants (147 ± 3 g) par femelle ont été sédatés (benzocaïne, $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), puis mis à mort par surdose anesthésique (benzocaïne, $90 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) avant d'être congelés à -80°C pour analyses de compositions corporelles. Neuf autres poissons par génitrice, soit 3 poissons par bacs, ont été sédatés puis mis à mort afin d'en prélever et d'en congeler le sang, les viscères, le foie et le muscle pour analyses biochimiques, moléculaires et biométriques (**Figure 3 en B**).

Tableau 1. *Ingrédients et composition des aliments.*

Aliments	COM	VEG	VEG+DHA
<i>Matières premières (en % de matière sèche)</i>			
Farine de poisson	NR	0,00	0,00
Huile de poisson	NR	0,00	0,00
Algue <i>Schizochytrium</i>	NR	0,00	6,90
Gluten de maïs	NR	19,7	19,7
Tourteau de soja	NR	14,0	14,5
CP de pois (lysamine)	NR	14,4	15,0
CP de soja	NR	12,4	9,60
CP de féverole	NR	9,00	9,00
CP de luzerne	NR	4,00	0,00
Guar	NR	8,80	9,00
Amidon de blé pré-gélatinisé	NR	1,30	0,00
Cellulose	NR	0,40	0,00
Huile de colza	NR	7,50	3,30
Huile de lin	NR	1,10	1,10
Choline chlorure 60%	NR	0,25	0,25
Lécithine de soja	NR	1,00	1,00
Mix minéraux	NR	1,60	1,60
Mix vitaminiques	NR	1,50	1,50
Dicalcium de phosphate	NR	1,70	1,30
L-lysine	NR	0,80	0,80
L-méthionine	NR	0,50	0,50
Astaxanthine	NR	0,04	0,04

Analyse de la composition des aliments

Matière sèche (%)	91,8	97,5	96,7
Cendres (%MS)	12,9	7,30	7,30
Protéine brute (%MS)	53,0	53,8	54,5
<i>Arginine (%)</i>	NR	3,50	3,50
<i>Leucine (%)</i>	NR	4,70	4,70
<i>Lysine (%)</i>	NR	3,30	3,20
<i>Méthionine (%)</i>	NR	1,20	1,20
<i>Méthionine + Cystine (%)</i>	NR	1,80	1,80
Amidon (%MS)	15,0	6,90	5,60
Lipides totaux (%MS)	8,40	13,4	12,9
<i>AL (%LT)</i>	0,80	3,50	2,60
<i>ALA (%LT)</i>	0,00	1,60	1,00
<i>EPA (%LT)</i>	0,60	0,00	0,00
<i>DHA (%LT)</i>	0,40	0,00	1,10
Energie brute (kJ·g ⁻¹ de MS)	21,1	23,3	23,4

COM, aliment commercial Le Gouessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; NR, non renseigné ; CP, concentré protéique ; AL, acide linoléique ; ALA, acide α -linoléique ; DHA, acide docosahexaénoïque ; %LT, pourcentage des lipides totaux ; % MS, pourcentage de matière sèche ; kJ·g⁻¹ de MS, kilojoule par gramme de matière sèche.

Tableau 2. Composition des aliments en acides gras (en % des acides gras totaux).

Aliments	COM	VEG	VEG+DHA
Acides gras totaux (%)	97,5	99,3	97,2
Saturés	39,6	18,2	36,2
Σ MUFA	29,0	43,3	25,3
Σ LC-PUFA n-6	9,90	25,9	20,3
18:2 n-6 (AL)	9,50	25,9	20,3
20:4 n-6 (ARA)	0,40	0,00	0,00
Σ LC-PUFA n-3	11,0	11,7	15,3
18:3 n-3 (ALA)	0,00	11,7	7,40
20:4 n-3	0,20	0,00	0,00
20:5 n-3 (EPA)	6,60	0,00	0,00
20:6 n-3	6,60	0,00	0,00
22:6 n-3 (DHA)	4,20	0,00	7,90

COM, aliment commercial Le Gouessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; ΣMUFA, somme des acides gras mono-insaturés ; ΣLC-PUFA n-6, somme des acides gras oméga 6 polyinsaturés à longue chaîne ; ΣLC-PUFA n-3, somme des acides gras oméga 3 polyinsaturés à longue chaîne ; AL, acide linoléique ; ARA, acide arachidonique ; ALA, acide α-linolénique ; EPA, acide eicosapentaénoïque ; DHA, acide docosahexaénoïque.

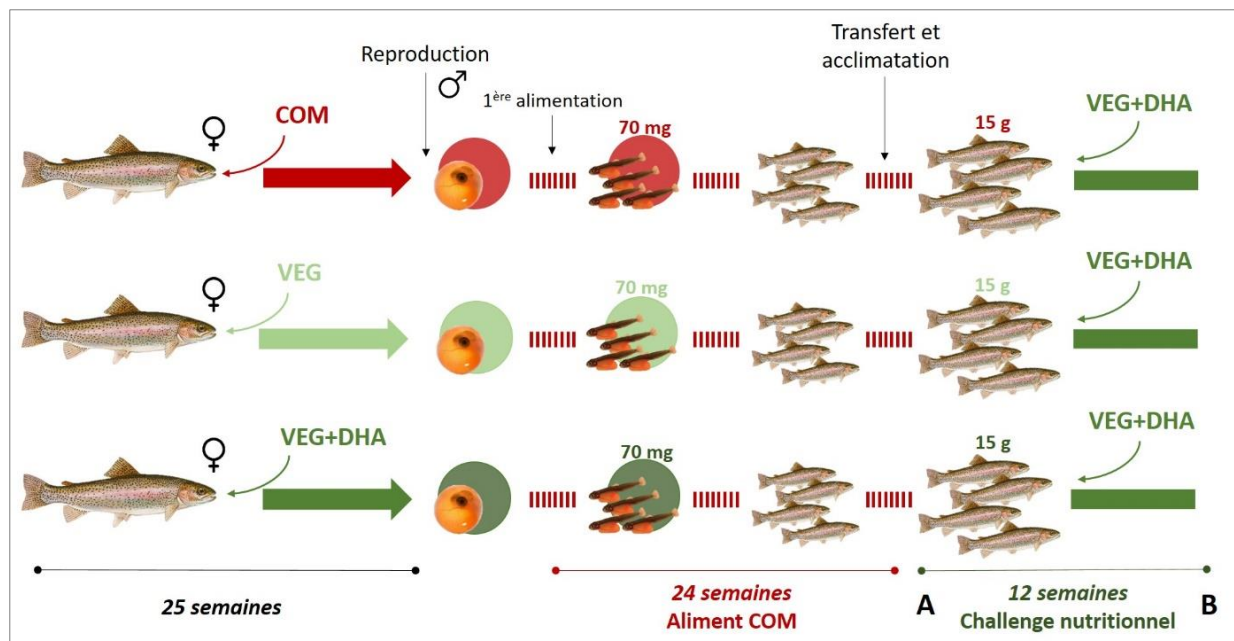


Figure 3. Résumé schématique du protocole expérimental (©Laura Frohn, 2019, INRA-NuMeA).

2. DONNEES ZOOTECHNIQUES

2.1. Performances de croissance des descendants

Les paramètres zootechniques de croissance ont été déterminés pour l'augmentation journalière de poids sur une période donnée et exprimée par le taux spécifique de croissance SGR en j^{-1} (équation 1).

$$SGR = \frac{\ln(pmf) - \ln(pmi)}{\Delta t} \times 100 \quad (1)$$

$$pmi = \frac{\text{poids total initial}}{\text{nombre total d'individus}} \quad (2)$$

$$pmf = \frac{\text{poids total final}}{\text{nombre total d'individus}} \quad (3)$$

Avec pmi (équation 2) : le poids moyen avant le challenge (en grammes), pmf (équation 3) : le poids moyen à la fin du challenge (en grammes) et Δt : la durée de la période considérée (en jours).

2.2. Paramètres de consommation des descendants

Les paramètres de consommation ont été déterminés pour la prise alimentaire journalière moyenne DFI en $\% \cdot j^{-1}$ (équation 4). Le gain de poids vif observé en fonction de la quantité d'aliment distribuée au cours d'une période donnée a été exprimé par le calcul de l'efficacité alimentaire FE (équation 5).

$$DFI = \frac{\text{quantité totale d'aliment distribuée}}{\frac{\text{poids total initial} + \text{poids total final}}{2} \times 10^{-3} \times \Delta t} \quad (4)$$

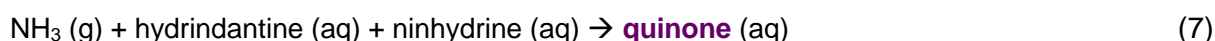
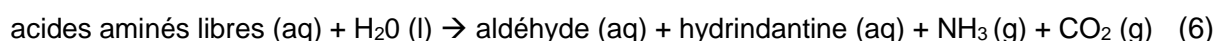
$$FE = \frac{\text{poids total final} + \text{poids des morts} - \text{poids total initial}}{\text{quantité d'aliment distribuée}} \quad (5)$$

3. ANALYSES BIOCHIMIQUES DES METABOLITES PLASMATIQUES DES DESCENDANTS

Les analyses biochimiques ont été effectuées sur des plasmas des juvéniles issus des génitrices COM, VEG et VEG+DHA. Les plasmas ont été prélevés à la fin des 12 semaines de challenge nutritionnel VEG+DHA et 6 heures après le dernier repas. Les analyses décrites ci-dessous expliquent les principes des méthodes utilisées. Le détail des différents modes opératoires se trouvent dans les **Annexes I à IV**.

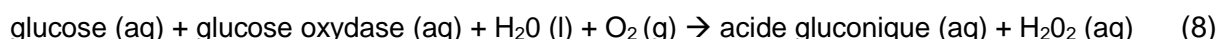
3.1. Dosage des acides aminés totaux plasmatiques

Les teneurs en acides aminés totaux plasmatiques ont été déterminées selon le principe de dosage colorimétrique à la Ninhydrine Sigma à 2% (**Annexe I**). Le réactif (N7285, Aldrich) est composé d'une solution de ninhydrine et d'hydrindantine diluée dans du DMSO et du tampon acétate de lithium (pH 5,2). Les acides aminés en solution sont désaminés et décarboxylés sous l'action de la ninhydrine. La réaction libère une molécule d'ammoniac NH_3 et une molécule de CO_2 pour former un aldéhyde et une molécule d'hydrindantine (ninhydrine réduite) (**équation 6**). L'ammoniac et l'hydrindantine formés réagissent ensuite avec une molécule de ninhydrine pour former un groupe quinone (**équation 7**) dont la coloration pourpre est directement proportionnelle à la concentration en acides aminés totaux de l'échantillon. La densité optique de l'échantillon peut finalement être mesurée par spectrophotométrie à 570 nm.



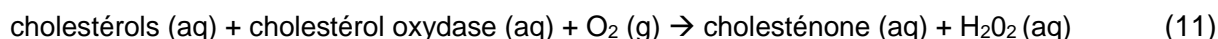
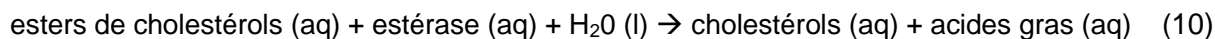
3.2. Dosage du glucose plasmatique

Les teneurs en glucose plasmatiques ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque à l'aide d'un kit Sobioda selon la méthode quantitative GOD-POD (glucose oxydase-peroxydase) (**Annexe II**). Le réactif (W1306.122, Sobioda) est composé de glucose oxydase (EC1.1.3.4) permettant la catalyse du glucose entraînant la libération d'une molécule de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 pour une molécule d'acide gluconique (**équation 8**). La peroxydase (EC 1.11.1.7) permet ensuite de catalyser l' H_2O_2 en un groupement quinone dont la coloration rose est directement proportionnelle à la concentration en glucose de l'échantillon (**équation 9**). La densité optique de l'échantillon peut finalement être mesurée par spectrophotométrie à 505 nm.

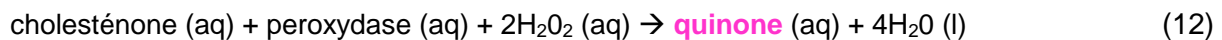


3.3. Dosage du cholestérol plasmatique

Les teneurs en cholestérol contenues dans le plasma sanguin ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque à l'aide d'un kit Sobioda (réf. réactif : WCHOL100) selon la méthode quantitative CHOD-POD (cholestérol oxydase-peroxydase) (**Annexe III**). Le réactif est composé de cholestérol estérase (EC3.1.1.13), de cholestérol oxydase (EC1.1.3.6) et de peroxydase (EC 1.11.1.7). Le cholestérol estérase transforme dans un premier temps les esters de cholestérol en cholestérol et en acides gras libres (**équation 10**). Le cholestérol est ensuite oxydé par la cholestérol oxydase (**équation 11**), produisant ainsi du cholesténone et de l' H_2O_2 .

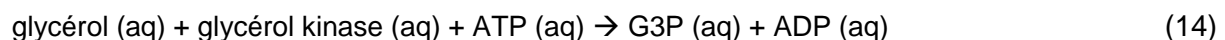
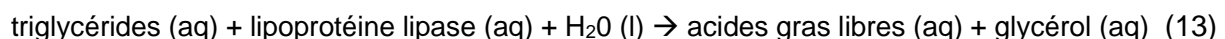


Enfin, la peroxydase transforme le cholesténone en groupement quinone (**équation 12**) dont la coloration rose est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol de l'échantillon. La densité optique de l'échantillon peut finalement être mesurée par spectrophotométrie à 550 nm.



3.4. Dosage des triglycérides plasmatiques

Les teneurs en triglycérides plasmatiques ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque avec un kit Sobioda selon la méthode quantitative GPO-POD (glycérol-3-oxydase-peroxydase) (**Annexe IV**). Le réactif (WTRIG050, Sobioda) est composé de lipoprotéine lipase (EC3.1.1.34), de glycérol kinase (EC2.7.1.30), de glycérol-3-oxydase (EC1.1.3.21) et de peroxydase (EC 1.11.1.7). Les triglycérides plasmatiques incubés avec la lipoprotéine lipase libèrent des acides gras libres et du glycérol (**équation 13**). Le glycérol est ensuite transformé en glycéraldéhyde-3-phosphate G3P sous l'action de la glycérol kinase (**équation 14**). La glycérol-3-oxydase catalyse la transformation du G3P en acide aminé non protéinogène DAP libérant une molécule d'H₂O₂ (**équation 15**). Enfin, le peroxyde d'hydrogène est transformé par la peroxydase en groupe quinone (**équation 16**) dont la coloration rose est directement proportionnelle à la concentration en triglycérides de l'échantillon. La densité optique de l'échantillon peut finalement être mesurée par spectrophotométrie à 505 nm.



4. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CORPORELLE DES DESCENDANTS

L'analyse de la composition corporelle a été effectuée sur des juvéniles entiers issus des génitrices COM, VEG et VEG+DHA. Les individus ont été prélevés à la fin des 12 semaines de challenge nutritionnel VEG+DHA et 6 heures après le dernier repas. Les analyses décrites ci-dessous expliquent les principes des méthodes utilisées. Le détail des différents modes opératoires se trouvent en **Annexes II, III, IV et V à X**.

4.1. Détermination des teneurs en matière sèche

Les teneurs en matière sèche ont été déterminées par dessiccation en étuve. Le pourcentage de matière sèche (%MS) contenu dans chaque échantillon a été déterminé par différence de masses (**Annexe V**).

4.2. Lyophilisation des échantillons

Le cycle de lyophilisation composé de 3 étapes permet de congeler (transformation de l'eau en glace), de sublimer (transformation de la glace en vapeur) et de désorber (élimination des gaz) les échantillons sans altérer leurs caractéristiques biologiques, chimiques et physiques (**Tableau 12** de l'**Annexe VI**).

4.3. Détermination des teneurs en cendres brutes

Les teneurs en cendres brutes ont été déterminées par incinération des lyophilisats en four à cendres. Le pourcentage de cendres brutes (%cendres) contenu dans chaque échantillon a été déterminé par différence de masses (**Annexe VII**).

4.4. Dosage de l'énergie calorifique brute par calorimétrie

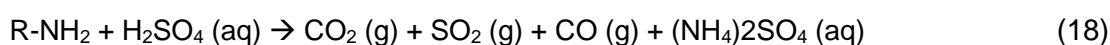
L'énergie calorifique brute (H_0), aussi appelée chaleur de combustion ou pouvoir calorifique, représente l'énergie thermique produite lors de la combustion d'une matière combustible par le dioxygène O_2 (**Annexe VIII**). Cette énergie calorifique peut être quantifiée dans un calorimètre. Le calorimètre mesure la quantité de chaleur dégagée lors de la combustion complète d'un échantillon et transforme cette énergie en énergie calorifique H_0 (**équation 17**).

$$H_0 = - \frac{C \times \Delta T^\circ - Q_1 - Q_2}{m} \quad (17)$$

Avec C : la capacité calorifique du calorimètre aussi appelée constante de bombe (en kilojoules par gramme), ΔT° : l'augmentation de la température mesurée suite à la combustion (en $^\circ C$), Q_1 : la somme des quantités de chaleurs parasites (en kilojoules par gramme), Q_2 : la quantité de chaleur dégagée par la gélule en amidon vide (en $KJ \cdot g^{-1}$) et m : la masse sèche de l'échantillon étudié (en grammes).

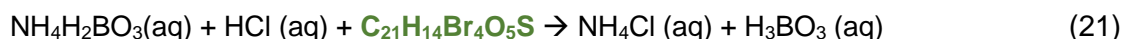
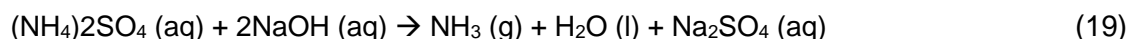
4.5. Détermination des teneurs en protéines par la méthode de Kjeldahl (1883)

L'azote organique contenu dans les tissus est essentiellement présent sous forme de protéines ou d'acides nucléiques. Afin de déterminer les teneurs en protéines des échantillons, les dosages peuvent être effectués selon la méthode de Kjeldahl décrite en 1883 (**Annexe IX**). Cette méthode comprend un cycle thermique de 3h15 composé de 6 étapes allant de $100^\circ C$ à $430^\circ C$. La méthode de Kjeldahl consiste à transformer l'azote organique ($R-NH_2$) en azote minéral (ion ammonium NH_4^+) en présence d'acide sulfurique (H_2SO_4) à température élevée. La réaction conduit à la formation de gaz (dioxyde de carbone CO_2 , dioxyde de soufre SO_2 et monoxyde de carbone CO) ainsi que de sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) (**équation 18**).



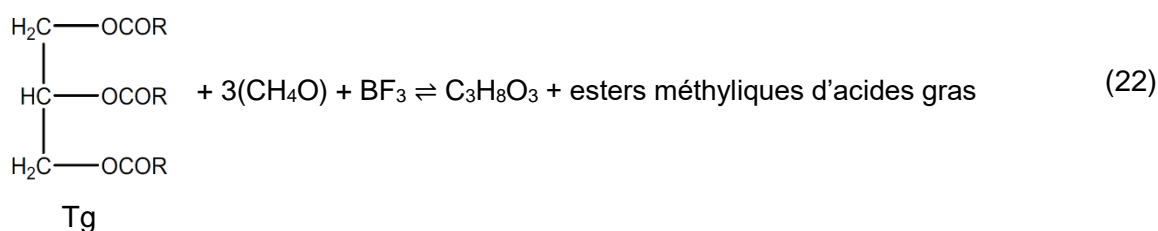
La solution d'azote minéral produit sous la forme $(NH_4)_2SO_4$ est ensuite additionnée en excès à une solution d'hydroxyde de sodium $NaOH$, puis distillée. Cette étape induit la formation d'ammoniac gazeux NH_3 (**équation 19**). Le NH_3 est ensuite mis en contact avec une

solution d'acide borique (H_3BO_3) provoquant la formation de borate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$) (**équation 20**). La quantité de borate d'ammonium peut alors être dosée par un titrage à l'acide chlorhydrique (HCl) en présence de vert de bromocrésol ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$) (**équation 21**).



4.6. Détermination des teneurs en lipides totaux et acides gras par la méthode de Folch (1956)

La méthode d'extraction décrite en 1957 par Folch et al. permet d'isoler et de purifier les lipides totaux contenus dans les tissus animaux (**Annexe X**). L'homogénéisation d'un échantillon dans une solution de dichlorométhane et de méthanol permet d'extraire les lipides contenus dans les tissus organiques. L'extraction implique dans un premier temps l'obtention d'une solution monophasique composée de lipides dissous mais également de contaminants aqueux. La phase apolaire de l'homogénat contenant les lipides peut ensuite être séparée de la phase polaire hydrophile par ajout d'une solution saline. On obtient alors une solution biphasique dont la phase organique inférieure peut être récupérée et évaporée afin d'en isoler les lipides totaux. Les lipides totaux obtenus sont ensuite méthylés à haute température, sous l'action du méthanol (CH_4O) et du trifluorure de bore (BF_3). La méthylation ou transestérification des triglycérides (Tg) permet de transformer les groupements carboxyliques en esters de méthyliques d'acides gras (**équation 22**, adaptée de Hamad, 2009). Les groupements $-\text{COOCH}_3$ ont pour caractéristiques d'être moins polaires et plus volatiles que les acides carboxyliques et peuvent alors être quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). La CPG est une technique d'analyse permettant de séparer des composés volatiles par un gaz inerte et d'analyser leur affinité électrostatique pour une colonne plus ou moins polaire. L'affinité des différents esters méthyliques pour la colonne leur conférera un temps de rétention plus ou moins élevé en fonction de leur taux de méthylation, de la longueur de leur chaîne carbonée et de leur nombre d'insaturation. Les acides gras méthylés peuvent ensuite être identifiés par comparaison avec le temps de rétention de standards.



4.7. Détermination des teneurs en cholestérol corporelles

Les teneurs en cholestérol corporelles ont été déterminées à partir des lipides totaux dilués extraits par la méthode de Folch (1957) (**point 4.6.**) dans un mélange d'isopropanol et d'Igepal (10%) par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque avec un kit Sobiada selon la méthode quantitative CHOD-POD (**point 3.3.** et **Annexe III**).

4.8. Détermination des teneurs en triglycérides hépatiques

Les teneurs en triglycérides ont été déterminées selon la méthode quantitative colorimétrique GPO-POD (**point 3.4.** et **Annexe IV**) sur les foies isolés des descendants des génitrices COM, VEG et VEG+DHA à la fin des 12 semaines de challenge nutritionnel VEG+DHA et 6 heures après le dernier repas.

4.9. Détermination des teneurs en glycogène hépatique et musculaire

Les teneurs en glycogène ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque à l'aide d'un kit Sobioda selon la méthode quantitative GOD-POD (**point 3.2.** et **Annexe II**) sur les foies et le muscle isolés des descendants des génitrices COM, VEG et VEG+DHA à la fin des 12 semaines de challenge nutritionnel VEG+DHA et 6 heures après le dernier repas.

4.10. Détermination de l'utilisation des nutriments par les descendants

Les paramètres d'ingestion en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (**équation 23**), de gain en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (**équation 24**) et de rétention en % (**équation 25**) ont été estimés pour les protéines, les lipides, les acides gras et l'énergie digestible à partir des résultats biochimiques obtenus.

$$INGESTION = \frac{\text{quantité de } X \text{ dans l'aliment } \%f \times DFI}{100} \quad (23)$$

$$GAIN = \frac{\frac{\text{quantité de } X \text{ dans le poisson final } \%f \times pmf}{100} - \frac{\text{quantité de } X \text{ dans le poisson initial } \%f \times pmi}{100}}{\frac{pmi+pmf}{2} \times 10^{-3} \times \Delta t} \quad (24)$$

$$RETENTION = \frac{GAIN}{ABSORPTION} \times 100 \quad (25)$$

Avec X : la quantité de protéines, lipides, acides gras ou énergie digestible en pourcentage de matière fraîche (en $\%f$), DFI : la prise alimentaire journalière soit la quantité d'aliment consommée par poisson et par jour (en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$), pmi : le poids moyen initial, pmf : le poids moyen final et Δt : la durée du challenge alimentaire (en jours).

5. ANALYSES MOLECULAIRES DU FOIE ET DU MUSCLE DES DESCENDANTS

Les analyses moléculaires ont été effectuées sur des foies et des muscles isolés des juvéniles issus des génitrices COM, VEG et VEG+DHA. Les organes ont été prélevés à la fin des 12 semaines de challenge nutritionnel VEG+DHA et 6 heures après le dernier repas. Les analyses décrites ci-dessous expliquent les principes des méthodes utilisées. Le détail des différents modes opératoires se trouvent en **Annexes XI à XIII**.

5.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des acides ribonucléiques totaux selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) couple le broyage mécanique des tissus à une lyse chimique des membranes cellulaires (**Annexe XI**). Cette technique permet de casser le complexe tissulaire initial et d'en extraire l'information génétique tout en préservant son intégrité. Une fois l'échantillon homogénéisé, le tampon d'extraction TRIzol® Reagent va induire la destruction des parois cellulaires et la libération du matériel génétique dans un mélange de lysats et de composés cellulaires dissous. L'élimination des composés cellulaires susceptibles d'inhiber certaines réactions enzymatiques est réalisée par un traitement dénaturant au chloroforme. Les lysats sont quant à eux éliminés par centrifugation et les acides nucléiques dissous peuvent alors être récupérés dans le surnageant. Les ARN sont ensuite isolés par précipitation à l'isopropanol, puis lavés à l'éthanol permettant une purification supplémentaire des lysats résiduels. Les pelotes d'ARN finalement obtenues peuvent être dissoutes dans de l'eau stérile.

5.2. Retrotranscription des ARN totaux en ADNc

La retrotranscription des ARN totaux comprend la transformation des ARN messagers (ARNm), des ARN de transfert (ARNt) et des ARN ribosomiques (ARNr) en ADN complémentaires (ADNc) (**Annexe XII**). La retrotranscription implique au préalable la dénaturation de la structure secondaire de l'ARN, puis la fixation aléatoire des amorces aux brins dénaturés ainsi qu'aux structures secondaires persistantes. Les ARN totaux dénaturés liés à leurs amorces sont ensuite soumis à retrotranscription par l'enzyme transcriptase inverse (EC2.7.7.49) isolée par Howard M. Temin et David Baltimore en 1970 (Temin and Baltimore, 1972). La transcriptase inverse *SuperScript III* possède des propriétés catalytiques de la réaction de retrotranscription lui permettant d'apparier à partir des amorces, les désoxyribonucléotides dNTP (désoxy-adénine tri-phosphate, désoxy-cytosine tri-phosphate, désoxy-guanine tri-phosphate et désoxy-thymine tri-phosphate) présents dans la solution aux désoxyribonucléotides du brin d'ARN dénaturé. L'ARN luciférase (EC1.13.12.7) présente dans la solution est également soumise à retrotranscription et amplification, permettant ainsi de vérifier l'efficacité de la retrotranscription de par son caractère bioluminescent.

5.3. qPCR en temps réel de gènes cibles

La PCR (de l'anglais « *Polymerase Chain Reaction* ») est une technique d'amplification de l'ADN découverte en 1985 par Kary Mullis (Mullis et al., 1986). Elle permet d'amplifier les brins d'ADN en se basant sur le principe de répllication de l'ADN en assurant la dénaturation de sa structure bicaténaire, son hybridation aux amorces et son élongation par une enzyme polymérase (EC2.7.7.7) (**Annexe XIII**). A la fin des années 1990, Heid et al. (1996) mettent au point la PCR quantitative en temps réel. Cette nouvelle méthode se différencie de la PCR classique par la quantification des portions d'ADN amplifiée (amplicons) tout au long de la réaction enzymatique grâce au marqueur fluorescent SYBR Green. Ce marqueur possède la capacité de se lier aux petits sillons des acides nucléiques doubles brins. Lorsque le nombre d'amplicons augmente de manière exponentielle au cours des cycles de PCR successifs, la fluorescence émise par le SYBR Green dessine une cinétique d'expression directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. L'intensité de la fluorescence émise peut alors être traitée par un logiciel et être transformée en valeur quantitative tels que

le nombre de cycles de PCR ou la concentration en ADN présente dans l'échantillon. Ainsi, plus le nombre de cycles est faible, plus la quantité d'ADN est élevée.

Les transcrits dont les expressions ont été quantifiées dans le muscle des alevins challengés sont les paralogues de la carnitine palmitoyltransferase (*cpt1a*, *cpt1b*, *cpt1c* et *cpt1d*) ainsi que la 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (*hoad*) pour la β -oxydation des acides gras à longue chaîne. Les transcrits dont les expressions ont été quantifiées dans le foie des alevins challengés sont les élongases 2 et 5 (*elovl2* et *elovl5*) et la Δ 6-désaturase (*fads2*) pour la biosynthèse des acides gras à longue chaîne ; la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA synthase (*hmgcS*), la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA réductase (*hmgcR*), la cholestérol 7 alpha-hydroxylase a (*cyp7a*), la lanostérol 14- α -déméthylase (*cyp51a*), la 7-déhydrocholestérol synthase (*dhcr7*), l'ATP-binding transporter cassette A1 (*abca1*), l'ATP-binding cassette sub-family G member 5 (*abcg5*) et l'ATP-binding cassette sub-family G member 8 (*abcg8*) pour le métabolisme du cholestérol ; l'ATP citrate synthase (*acly1*) et l'acide gras synthase (*fasn*) pour la lipogénèse et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (*g6pdh*) pour le métabolisme des pentoses phosphates. Les séquences des amorces utilisées se trouvent dans le **Tableau 13** de l'**Annexe XIII**.

5.4. Activités enzymatiques

Les enzymes sont des protéines catalysantes impliquées dans les réactions biochimiques. Elles sont généralement aidées par des cofacteurs non protéiques ou par des coenzymes. Les enzymes permettent d'accélérer la transformation d'un substrat S en un produit P en liant leur site actif au substrat de manière spécifique selon le modèle de la « serrure et de la clef » (Emil Fischer, 1894) et de « l'ajustement induit » (Daniel Koshland, 1958). L'énergie d'activation de la réaction chimique est alors abaissée et la catalyse de la réaction débute. L'activité d'une enzyme peut donc être estimée par la vitesse de disparition du substrat (ΔS) ou la vitesse d'apparition du produit (ΔP) au cours du temps (Δt) (**équation 26**) et est exprimée en $U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$.

$$-\frac{\Delta S}{\Delta t} \quad \text{ou} \quad \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (26)$$

Les activités des enzymes FAS (acide gras synthase) et G6PDH (glucose-6-phosphate déshydrogénase) ont été mesurées selon le mode opératoire décrit en **Annexe XIV**. Le protocole se base sur les réactions impliquées dans les voies métaboliques décrites dans le **point 1.2.3.** de l'introduction.

6. ANALYSES STATISTIQUES

Les données sont représentées par leur moyenne \bar{x} et leur erreur standard SD. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du package Rcmdr du programme R (The R Foundation for Statistical Computing, 2018). La normalité des distributions et l'homogénéité des variances ont respectivement été vérifiées avec un test de Shapiro-Wilk et de Brown-Forsythe pour une probabilité de 0,05. Si les conditions de normalité et d'homoscédasticité étaient vérifiées, les données ont été analysées par un test ANOVA à un facteur suivie d'un test *post hoc* de Tukey. Si les deux conditions n'étaient pas vérifiées, un test non paramétrique

de Kruskal-Wallis a été appliqué sur le jeu de données. Les différences significatives ont été considérées statistiquement différentes pour une p-value inférieure à 0,05 rejetant ainsi l'hypothèse d'égalité H_0 . Les données représentées par des pourcentages ont été soumises à une transformation *arc sinus* avant application des tests statistiques évoqués précédemment.

RESULTATS

1. TAUX DE SURVIE ET PERFORMANCES DE CROISSANCE DES DESCENDANTS DE LA PREMIERE ALIMENTATION A LA FIN DU CHALLENGE VEG+DHA

Les performances de croissance des descendants sont représentées sur la **Figure 4** et le **Tableau 3**. A la première alimentation, les poids moyens des juvéniles étaient significativement différents entre les trois lots ($p < 0,05$) en défaveur des descendants issus des génitrices COM. Au début du challenge VEG+DHA, les juvéniles issus des génitrices VEG étaient significativement plus petits que les juvéniles issus des génitrices VEG+DHA ($p < 0,01$). A la fin du challenge VEG+DHA, soit 12 semaines après le début du challenge nutritionnel, les poids moyens et les taux spécifiques de croissance étaient finalement identiques entre les trois groupes de juvéniles. Aucune différence statistiquement significative n'a été relevée pour les taux de survie de la première alimentation à la fin des 12 semaines de challenge avec l'aliment VEG+DHA. Les indices viscéro et hépato somatiques se sont également avérés être identiques entre les 3 groupes de juvéniles à la fin du challenge VEG+DHA (Tableau 3).

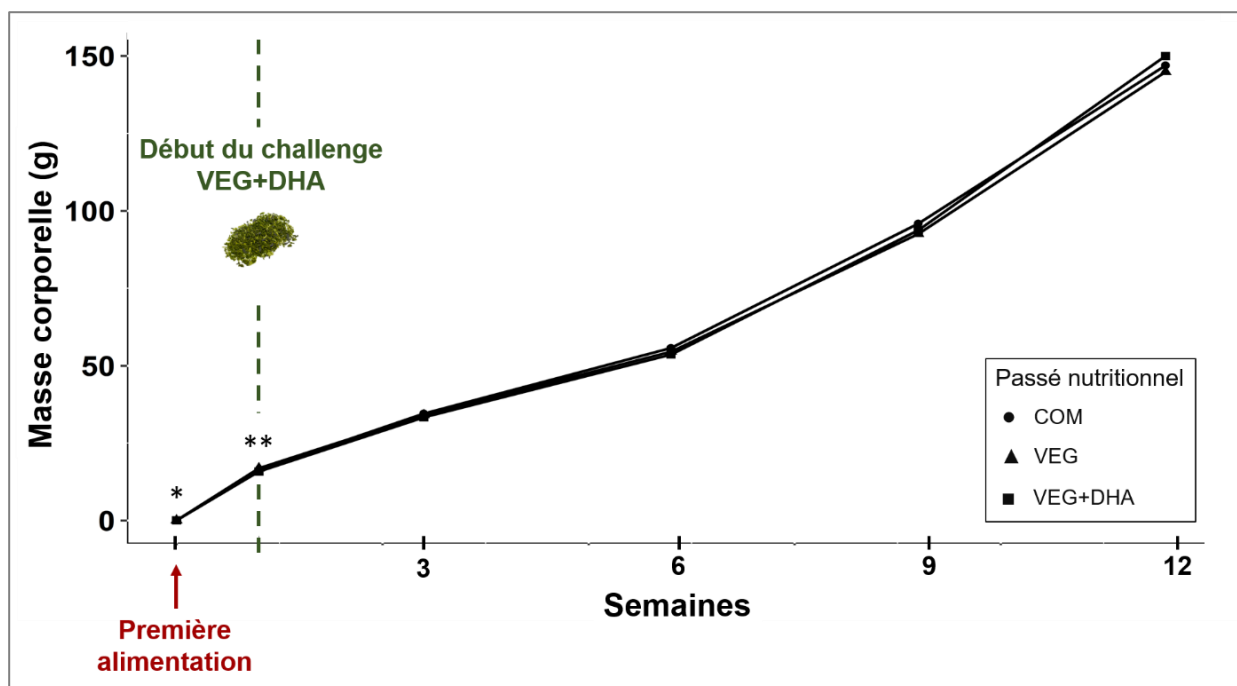


Figure 4. Performances de croissance des descendants de truite arc-en-ciel entre la première alimentation et la fin du challenge VEG+DHA.

Tableau 3. Paramètres biométriques, performances de croissance et taux de survie des descendants à partir de la première alimentation.

Passé nutritionnel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Poids moyens							
Première alimentation (mg)	69,0 ^b	0,00	72,0 ^{ab}	0,00	77,5 ^a	0,00	*
Début du challenge (g)	16,4 ^{ab}	0,09	15,8 ^b	0,31	16,9 ^a	0,20	**
A la fin du challenge (g)	147	2,64	150	8,35	145	3,79	ns
SGR (j ⁻¹)							
Avant le challenge ¹	4,18	2,40	4,11	2,15	3,26	2,42	ns
Durant le challenge	2,63	0,59	2,67	0,56	2,56	0,50	ns
HSI (%)	6,91	1,23	6,11	0,98	7,38	1,19	ns
VSI (%)	16,57	2,20	16,24	1,89	17,12	2,02	ns
Taux de survie moyen (%)							
Avant le challenge ¹	98,0	2,00	99,0	1,30	97,0	3,20	ns
Durant le challenge	100	0,00	100	0,00	100	0,00	ns

COM, aliment commercial Le Gouessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; SGR, taux spécifique de croissance ; HSI, indice hépato somatique ; VSI, indice viscéro somatique. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité sont indiqués par des astérisques (* P<0,05 ; ** P<0,01 ; ns : non significatif) et ont été estimés par un test ANOVA ou de Kruskal-Wallis avec n=9 juvéniles. ^{a, ab, b} Les différences significatives sont indiquées par des lettres. ¹ De la première alimentation au début du challenge VEG+DHA.

2. COMPOSITIONS CORPORELLES ET UTILISATION DE L'ALIMENT CHALLENGE VEG+DHA

Les données moyennes de consommation et l'utilisation des nutriments contenus dans l'aliment challenge VEG+DHA par les descendants sont présentées dans le **Tableau 4**. L'efficacité alimentaire (FE) était significativement plus élevée chez les descendants issus des génitrices nourries avec l'aliment VEG comparée à celle des juvéniles issus des génitrices COM (+7%, p<0,01), sans modification significative de la prise alimentaire journalière (DFI).

La composition corporelle des descendants à la fin du challenge VEG+DHA est résumée dans le **Tableau 5**. L'analyse statistique des teneurs en matières sèches (%), cendres (%MS), protéines (%MS), lipides totaux (%MS) et quantité d'énergie (KJ.g⁻¹ MS) n'a montré aucune différence significative entre les lots (p>0,05). Les valeurs d'ingestion, de gain et de rétention des nutriments ont été calculées pour les protéines, les lipides et l'énergie contenus dans l'aliment VEG+DHA. Aucune différence statistique n'a été relevée pour l'ingestion des protéines, des lipides et de l'énergie, pour les gains en protéines et lipides, ou encore pour les rétentions protéique et lipidique. Toutefois, les juvéniles issus des femelles nourries avec l'aliment VEG présentaient un gain énergétique significativement plus élevé que les juvéniles issus des génitrices VEG+DHA (+3%, p<0,05), ainsi qu'une rétention énergétique améliorée de 8% par rapport aux descendants des femelles COM (p<0,05). Les descendants des femelles VEG+DHA présentaient des teneurs corporelles en cholestérol (%MS) significativement supérieures comparées au juvéniles des génitrices VEG (p<0,05). En revanche, aucun effet du passé nutritionnel maternel n'a été relevé pour les concentrations en triglycérides hépatiques (mg.g⁻¹ de poisson), ou encore pour les concentrations en glycogène hépatique et musculaire (mg.g⁻¹ de poisson) (p>0,05).

Tableau 4. Utilisation de l'aliment VEG+DHA par les descendants durant les 12 semaines de challenge.

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
FE	1,05^b	0,05	1,12^a	0,07	1,08^{ab}	0,05	**
DFI (%·j ⁻¹)	0,96	0,05	0,89	0,05	0,92	0,04	ns
Ingestion (g·kg ⁻¹ ·j ⁻¹)							
Protéines	12,9	0,42	12,2	0,38	12,4	0,18	ns
Lipides	2,96	0,10	2,83	0,04	2,79	0,09	ns
Energie	5,37	0,17	5,06	0,16	5,14	0,07	ns
Gain (g·kg ⁻¹ ·j ⁻¹)							
Protéines	8,64	0,34	8,60	0,07	9,02	0,12	ns
Lipides	2,03	0,18	1,96	0,16	1,99	0,22	ns
Energie	4,48^{ab}	0,05	4,60^a	0,04	4,45^b	0,06	*
Rétention (%)							
Protéines	67,0	4,7	74,1	3,2	69,4	0,7	ns
Lipides	68,6	4,2	70,6	7,1	70,2	6,8	ns
Energie	83,6^b	2,1	91,0^a	3,8	86,6^{ab}	1,9	*

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; FE, efficacité alimentaire ; DFI, prise alimentaire journalière. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité sont indiqués par des astérisques (* P<0,05 ; ** P<0,01 ; ns : non significatif) et ont été estimés par un test ANOVA ou un test de Kruskal-Wallis avec n=6 juvéniles. ^{a, ab, b} Les différences significatives sont indiquées par des lettres.

Tableau 5. Composition corporelle des descendants à la fin du challenge VEG+DHA.

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Composition corporelle							
Matières sèches (%)	28,6	0,72	27,8	0,50	28,4	0,34	ns
Cendres (%MS)	7,65	0,40	7,54	0,40	7,54	0,32	ns
Protéines (%MS)	53,6	1,22	54,4	0,42	53,6	0,56	ns
Lipides totaux (%MS)	12,1	0,78	11,5	0,62	12,5	0,93	ns
Energie (KJ·g MS)	27,9	0,43	27,6	0,18	27,9	0,46	ns
Cholestérol (%MS)	0,12^{ab}	0,02	0,11^b	0,00	0,14^a	0,01	*
Composition tissulaire							
Triglycérides hépatiques (mg·g ⁻¹)	5,47	0,20	5,64	1,65	5,91	1,05	ns
Glycogène hépatique (mg·g ⁻¹)	76,2	28,2	73,0	25,9	96,5	32,3	ns
Glycogène musculaire (mg·g ⁻¹)	5,50	2,34	5,76	2,28	5,78	2,28	ns

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; ns, non significatif. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité ont été estimés par un test ANOVA avec n=6 juvéniles.

Les profils en acides gras (% acides gras totaux) des descendants avant et après le challenge VEG+DHA sont décrits dans les **Tableau 6** et **7**. A la fin des 12 semaines de challenge, les profils n'ont montré aucune différence statistique entre les descendants ($p>0,05$), excepté pour la somme des acides gras polyinsaturés oméga 6 (PUFA n-6, $p<0,05$) et pour l'acide α -linoléique (AL) dont les concentrations étaient significativement plus élevées chez les juvéniles issus des femelles VEG et VEG+DHA ($p<0,01$). Les concentrations corporelles en EPA et en DHA ont également été comparées entre début et la fin du challenge (**Figure 5**). Aucune différence statistiquement significative n'a été relevée pour les concentrations en EPA ou en DHA avant le challenge ($p>0,05$) et à la fin du challenge ($p>0,05$) et ce, pour les 3 lots de descendants. L'ensemble des juvéniles présentaient toutefois une nette diminution des teneurs en EPA au cours des 12 semaines de challenge nutritionnel. Les teneurs corporelles en DHA sont quant à elles restées stables au cours du challenge pour l'ensemble des descendants. Ces données n'ont pu être vérifiées statistiquement, le nombre de réplicas étant trop faible.

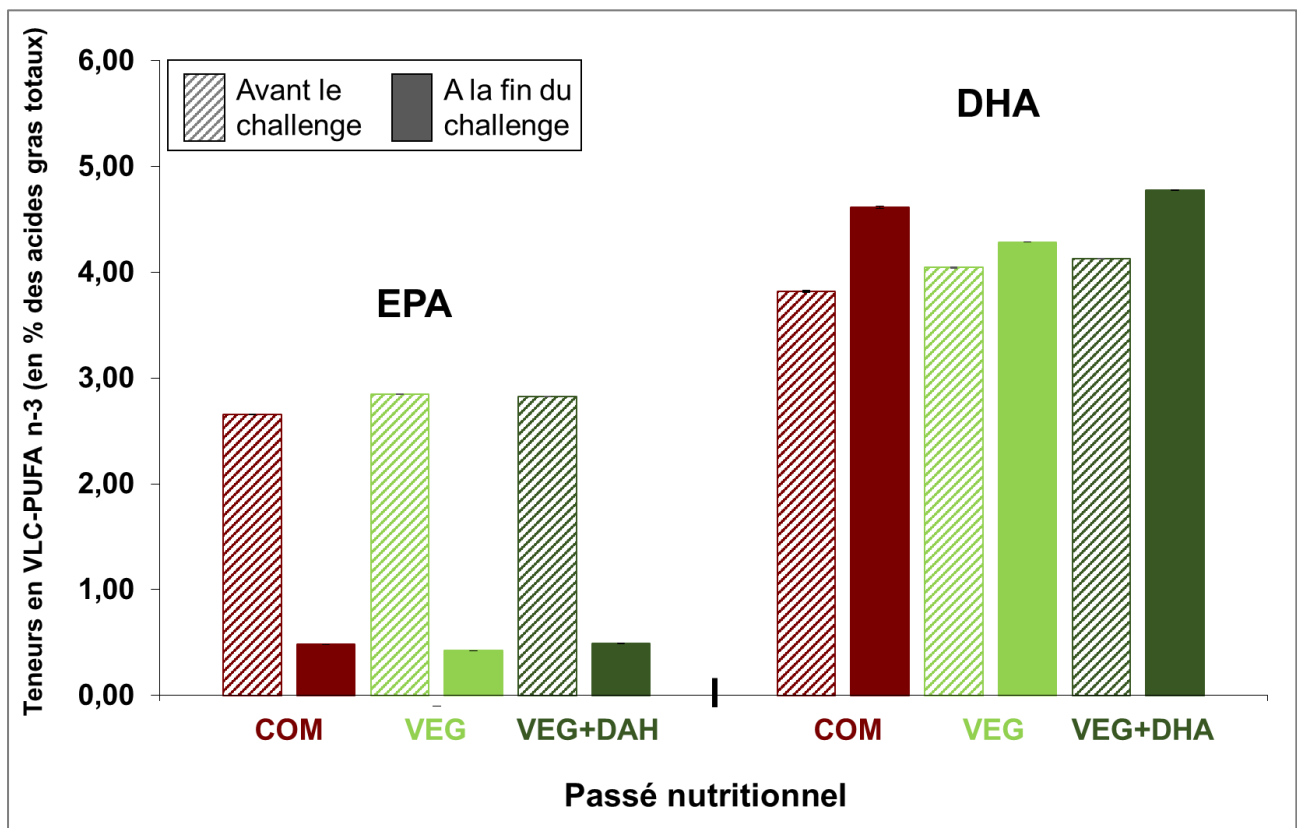


Figure 5. Comparaison des teneurs corporelles des descendants en EPA et en DHA avant et à la fin du challenge VEG+DHA (en % des acides gras totaux).

Tableau 6. Profil en acides gras des juvéniles avant le challenge VEG+DHA (en % des acides gras totaux).

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Acides gras totaux (%)	98,1	0,04	98,2	0,01	98,2	0,12	ns
Saturés	39,0	0,50	37,9	0,34	38,8	0,78	ns
12:0	0,16	0,00	0,13	0,01	0,15	0,01	ns
14:0	9,03	0,22	8,07	0,14	8,6	0,29	ns
15:0	0,69	0,00	0,62	0,01	0,67	0,02	ns
16:0	25,6	0,30	25,5	0,23	25,8	0,57	ns
17:0	0,33	0,01	0,32	0,18	0,33	0,18	ns
18:0	3,07	0,02	3,31	0,02	3,26	0,02	ns
20:0	0,04	0,06	0,00	0,00	0,05	0,07	ns
∑ MUFA	38,0	0,02	38,6	0,05	38,1	0,11	ns
14:1	0,09	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	ns
16:1	9,52	0,07	8,96	0,14	9,47	0,22	ns
18:1	26,4	0,12	27,5	0,08	26,4	0,23	ns
20:1	1,47	0,01	1,57	0,00	1,58	0,10	ns
22:1	0,55	0,04	0,57	0,01	0,56	0,06	ns
∑ LC-PUFA n-6	9,27	0,18	9,62	0,18	9,10	0,10	ns
18:2 n-6 (AL)	8,30	0,11	8,50	0,03	8,06	0,04	ns
18:3 n-6	0,13	0,06	0,18	0,01	0,17	0,00	ns
20:2 n-6	0,28	0,01	0,28	0,03	0,25	0,00	ns
20:3 n-6	0,12	0,01	0,11	0,02	0,18	0,00	ns
20:4 n-6 (ARA)	0,44	0,00	0,54	0,10	0,44	0,06	ns
∑ LC-PUFA n-3	6,90	0,14	7,29	0,15	7,40	0,62	ns
18:3 n-3 (ALA)	1,86	0,04	1,88	0,02	1,78	0,01	ns
18:4 n-3	1,03	0,06	1,07	0,02	1,05	0,00	ns
20:4 n-3	0,42	0,05	0,40	0,05	0,44	0,01	ns
20:5 n-3 (EPA)	2,66	0,04	2,85	0,01	2,83	0,09	ns
22:6 n-3 (DHA)	3,82	0,15	4,04	0,09	4,13	0,51	ns

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; ns : non significatif ; ∑ MUFA : somme des acides gras mono-insaturés ; ∑ LC-PUFA n-6 : somme des acides gras oméga 6 polyinsaturés à longue chaîne ; ∑ LC-PUFA n-3 : somme des acides gras polyinsaturés oméga 3 à longue chaîne. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité ont été estimés par un test ANOVA ou de Kruskal Wallis avec n=6 juvéniles.

Tableau 7. Profil en acides gras à la fin du challenge VEG+DHA (en % des acides gras totaux).

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Acides gras totaux (%)	99,1	0,45	99,5	0,47	98,5	0,89	ns
Saturés	35,8	0,38	35,8	0,50	34,8	0,35	ns
12:0	0,12	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
14:0	1,92	0,08	1,88	0,08	1,87	0,14	ns
15:0	0,28	0,02	0,26	0,03	0,28	0,03	ns
16:0	29,6	0,10	29,6	0,50	28,7	0,41	ns
17:0	0,19	0,02	0,18	0,03	0,13	0,11	ns
18:0	3,66	0,22	3,79	0,31	3,84	0,10	ns
20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
∑ MUFA	33,1	1,30	33,3	0,57	33,8	1,20	ns
14:1	0,12	0,03	0,14	0,00	0,12	0,03	ns
16:1	3,49	0,20	3,27	0,17	3,32	0,14	ns
18:1	28,8	1,07	29,2	0,41	29,4	0,98	ns
20:1	0,76	0,05	0,77	0,02	0,88	0,08	ns
∑ LC-PUFA n-6	18,8^b	0,25	19,5^a	0,33	19,2^{ab}	0,23	*
18:2 n-6 (AL)	17,4^b	0,18	18,1^a	0,14	17,8^a	0,15	**
18:3 n-6	0,20	0,04	0,18	0,05	0,20	0,05	ns
20:2 n-6	0,55	0,03	0,56	0,02	0,58	0,01	ns
20:4 n-6 (ARA)	0,42	0,04	0,41	0,02	0,34	0,10	ns
∑ LC-PUFA n-3	11,4	0,99	10,8	0,11	11,7	0,21	ns
18:3 n-3 (ALA)	5,46	0,07	5,61	0,06	5,66	0,14	ns
18:4 n-3	0,46	0,05	0,50	0,03	0,49	0,06	ns
20:3 n-3	0,12	0,03	0,00	0,00	0,13	0,03	ns
20:4 n-3	0,22	0,05	0,00	0,00	0,17	0,06	ns
20:5 n-3 (EPA)	0,48	0,05	0,42	0,03	0,49	0,03	ns
22:6 n-3 (DHA)	4,61	0,81	4,28	0,07	4,78	0,22	ns

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; ∑ MUFA : somme des acides gras mono-insaturés ; ∑ LC-PUFA n-6 : somme des acides gras oméga 6 polyinsaturés à longue chaîne ; ∑ LC-PUFA n-3 : somme des acides gras polyinsaturés oméga 3 à longue chaîne. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité sont indiqués par des astérisques (* P<0,05 ; ** P<0,01 ; ns : non significatif) et ont été estimés par un test ANOVA ou Kruskal Wallis avec n=6 juvéniles. ^{a, ab, b} Les différences significatives sont indiquées par des lettres.

3. PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES DES DESCENDANTS A LA FIN DU CHALLENGE VEG+DHA

3.1. Biochimie plasmatique

Les principaux métabolites plasmatiques relatifs aux métabolismes des lipides et des glucides (acides aminés totaux, glucose, cholestérol et triglycérides) dosés dans le plasma des descendants à la fin des 12 semaines de challenge VEG+DHA sont présentés dans le **Tableau 8**. Aucun effet significatif du passé nutritionnel maternel n'a été relevé pour les concentrations plasmatiques en acides aminés totaux et en glucose chez les descendants ($p>0,05$). En revanche, les concentrations en cholestérol et en triglycérides plasmatiques étaient significativement moins élevées chez les juvéniles issus des femelles VEG+DHA comparés aux descendants des femelles COM ($p<0,05$).

Tableau 8. Effets du passé nutritionnel maternel sur les teneurs en métabolites plasmatiques des descendants soumis à un challenge alimentaire VEG+DHA de 12 semaines.

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Acides aminés totaux ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$)	6,95	1,44	6,75	1,35	7,23	1,02	ns
Glucose ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	5,76	0,71	5,47	0,42	5,26	0,89	ns
Cholestérol ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	6,36^a	0,69	5,73^{ab}	0,65	5,12^b	1,10	*
Triglycérides ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	6,83^a	1,14	5,34^{ab}	1,17	4,74^b	2,03	*

COM, aliment commercial Le Gouessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité sont indiqués par des astérisques (* $P<0,05$; ns : non significatif) et ont été estimées par un test ANOVA avec $n=9$ juvéniles. ^{a, ab, b} Les différences significatives sont indiquées par des lettres.

3.2. Niveaux d'ARNm de gènes-clés du métabolisme des lipides

Les niveaux d'ARN messagers impliqués dans la β -oxydation des acides gras à longue chaîne (*cpt1a*, *cpt1b*, *cpt1c*, *cpt1d*, *hoad*), la biosynthèse des acides gras à longue chaîne (*elovl2*, *elovl5* et *fads2*), le métabolisme du cholestérol (*hmgcS*, *hmgcR*, *cyp7a*, *cyp51a*, *abcg5*, *abcg8* et *dhcr7*), la lipogenèse (*acly1* et *fasn*) et la voie des pentoses phosphates (*g6pdh*) ont été mesurés dans le muscle ou dans le foie des descendants à la fin des 12 semaines de challenge VEG+DHA.

Dans le muscle (**Tableau 9**), aucun effet du passé nutritionnel maternel n'a été relevé sur les niveaux d'expression des paralogues de la carnitine palmitoyltransferase (*cpt1a*, *cpt1c* et *cpt1d*) et la 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (*hoad*), tous deux impliqués dans la β -oxydation des acides gras à longue chaîne ($p>0,05$). Le gène *cpt1b* n'était exprimé dans aucun des lots de juvéniles.

Tableau 9. Effets du passé nutritionnel maternel sur les niveaux d'ARNm de gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans le muscle des juvéniles soumis au challenge VEG+DHA.

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
β-oxydation des LC-PUFA							
<i>cpt1a</i>	0,54	0,83	0,74	0,66	0,86	1,10	ns
<i>cpt1b</i>	NE		NE		NE		-
<i>cpt1c</i>	0,82	0,55	0,70	0,49	0,81	0,46	ns
<i>cpt1d</i>	1,06	0,22	1,00	0,36	1,22	0,32	ns
<i>hoad</i>	0,70	0,30	0,90	0,39	1,03	0,45	ns

COM, aliment commercial Le Gouessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; LC-PUFA, acides gras polyinsaturés à longue chaîne ; NE, non exprimé ; ns, non significatif. Les données décrivent la quantification relative des niveaux d'ARNm de gènes cibles normalisés par l'expression d'*EF1 α* et sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité ont été estimés par un test ANOVA ou Kruskal-Wallis avec n=9 juvéniles.

Dans le foie (**Tableau 10**) et pour les gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras à longue chaîne, l'élongase *elovl2* était sous-exprimée chez les descendants des femelles VEG et VEG+DHA par rapport aux descendants des femelles COM ($p < 0,01$), tandis que l'élongase *elovl5* était significativement sous-exprimée chez les individus issus des génitrices nourries avec l'aliment VEG+DHA comparés aux descendants des femelles COM ($p < 0,05$). Aucun effet du passé nutritionnel maternel ($p > 0,05$) n'a été montré sur les niveaux d'expressions de *fads2* ($\Delta 6$ -désaturase).

Concernant le métabolisme du cholestérol, aucun effet du passé nutritionnel maternel n'a été montré sur les niveaux d'expression des gènes codant pour la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA synthase (*hmgcS*), la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA réductase (*hmgcR*), la cholestérol 7 α -hydroxylase a (*cyp7a*), la lanostérol 14- α -déméthylase (*cyp51a*) et la 7-déhydrocholestérol synthase (*dhcr7*) ($p > 0,05$). Cependant, les gènes codant pour l'ATP-binding cassette sub-family G member 5 (*abcg5*) et l'ATP-binding cassette sub-family G member 8 (*abcg8*), tous deux impliqués dans l'élimination du cholestérol par la voie biliaire, se sont avérés être surexprimés chez les juvéniles issus des femelles COM et VEG comparés à ceux issus des femelles VEG+DHA ($p < 0,001$). Le gène *abca1* codant pour l'ATP-binding transporter cassette A1 (*abca1*) induisant l'export du cholestérol vers le plasma montrait quant à lui des niveaux d'expressions statistiquement plus élevés chez les descendants issus des femelles VEG+DHA comparés aux juvéniles des femelles COM et VEG ($p < 0,05$).

Enfin, le gène de l'ATP citrate synthase *acly1* appartenant au métabolisme de la lipogénèse s'est avéré être surexprimé chez les juvéniles issus des femelles COM et VEG comparés à ceux issus des femelles VEG+DHA ($p < 0,001$). Le gène *fasn* (acide gras synthase) était lui, significativement sous-exprimé chez les individus issus des génitrices nourries avec l'aliment VEG+DHA comparés aux descendants des femelles COM ($p < 0,001$).

Les résultats obtenus pour le gène *g6pdh* codant pour l'enzyme glucose 6-phosphate déshydrogénase de la voie des pentoses phosphates n'a montré aucun effet de l'alimentation maternelle sur les descendants.

3.3. Activités d'enzymes-clés de la lipogénèse et de la voie des pentoses phosphates

La mesure des activités enzymatiques s'est tournée vers la G6PDH et la FAS car elles décrivent l'activité lipogénique globale. En effet, l'enzyme glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) de la voie des pentoses phosphates est le principal fournisseur de NADP réduit essentiel à l'activité de l'enzyme lipogénique FAS (acide gras synthase).

L'activité des enzymes G6PDH et FAS ont été mesurées dans le foie des descendants à la fin des 12 semaines de challenge avec l'aliment VEG+DHA. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 11**. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée pour les activités hépatiques de ces deux enzymes entre les trois lots de juvéniles ($p > 0,05$).

Tableau 10. Effets du passé nutritionnel maternel sur les niveaux d'ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie des descendants soumis au challenge VEG+DHA.

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Biosynthèse des LC-PUFA							
<i>elovl2</i>	1,35^a	0,86	0,82^b	0,33	0,86^b	0,45	**
<i>elovl5</i>	1,01^a	0,22	0,95^{ab}	0,25	0,89^b	0,44	*
<i>fads2</i>	1,04	0,46	0,92	0,31	1,06	0,55	ns
Métabolisme du cholestérol							
<i>hmgcS</i>	1,05	0,85	0,92	0,68	1,18	1,19	ns
<i>hmgcR</i>	1,14	0,77	0,91	0,54	0,97	0,73	ns
<i>cyp7a</i>	0,94	0,27	0,97	0,38	0,85	0,49	ns
<i>cyp51a</i>	0,93	0,50	0,98	0,44	1,06	0,83	ns
<i>abca1</i>	0,78^b	0,29	0,71^b	0,31	1,32^a	0,74	*
<i>abcg5</i>	1,10^a	0,31	1,18^a	0,46	0,66^b	0,29	***
<i>abcg8</i>	1,10^a	0,22	1,23^a	0,42	0,75^b	0,41	***
<i>dhcr7</i>	1,02	0,36	0,92	0,30	0,86	0,33	ns
Lipogénèse							
<i>acly1</i>	1,06^a	0,50	1,20^a	0,43	0,64^b	0,35	***
<i>fasn</i>	1,55^a	1,14	0,97^{ab}	0,65	0,43^b	0,38	***
Voie des pentoses phosphates							
<i>g6pdh</i>	0,95	0,56	0,79	0,37	0,87	0,59	ns

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; LC-PUFA, acides gras polyinsaturés à longue chaîne ; NE, non exprimé. Les données décrivent la quantification relative des niveaux d'ARNm de gènes cibles normalisés par l'expression de la *LUCIFERASE* et sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité sont indiqués par des astérisques (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns : non significatif) et ont été estimés par un test ANOVA ou Kruskal-Wallis avec $n=9$ juvéniles. ^a, ^{ab}, ^b Les différences significatives sont indiquées par des lettres.

Tableau 11. Effet du passé nutritionnel maternel sur les activités enzymatiques (en $mU \cdot g^{-1}$ de protéines) de la glucose-6-phosphatase (G6PDH) et de l'acide gras synthase (FAS) dans le foie des juvéniles soumis au challenge VEG+DHA.

Passé nutritionnel maternel	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
G6PDH	29,2	2,88	27,9	4,68	28,6	4,06	ns
FAS	0,38	0,10	0,45	0,36	0,33	0,12	ns

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA ; ns : non significatif. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ erreur standard SD. Les degrés de significativité ont été estimés par un test ANOVA ou Kruskal-Wallis avec $n=9$ juvéniles.

DISCUSSION

1. LES MICRO-ALGUES : UNE NOUVELLE SOURCE DE DHA POUR LES ALIMENTS PISCICOLES

La compréhension de la physiologie nutritionnelle des espèces carnivores et l'étude des régimes alimentaires naturels des poissons ont permis d'explorer l'utilisation de nouveaux ingrédients plus durables et ayant un moindre impact sur l'environnement (Houston et al., 2017). Dans un premier temps, l'utilisation de matières premières végétales est apparue comme évidente. L'utilisation d'un aliment partiellement ou strictement végétal induit néanmoins des retards ou des baisses de croissance chez les espèces nécessitant un apport protéique très élevé comme c'est le cas pour la truite (40%) (Guillaume et al., 2001).

De nombreuses espèces, qu'elles soient carnivores ou herbivores, requièrent également un apport important en acides gras polyinsaturés à très longue chaîne tels que l'EPA et le DHA. Ces acides gras sont généralement apportés par l'alimentation mais peuvent également être synthétiser par les organismes à partir d'acides gras essentiels. C'est notamment le cas de la truite, de la carpe et du saumon qui possèdent la capacité de produire de l'EPA et du DHA via la désaturation et l'élongation des acides gras de la série n-3 et n-6 (18:3 n-3 et 18:3 n-6). A l'opposé, certains poissons marins comme le turbot et le bar, sont incapables d'allonger ces acides gras et doivent obligatoirement se nourrir d'un aliment riche en EPA et en DHA. Bien que la truite appartienne à la catégorie des poissons capables d'élonger les acides linoléique et α -linoléique, la synthèse d'acides gras à plus longue chaîne n'est effectuée qu'en très petite quantité (Cahu, 2004).

Aujourd'hui, l'aquaculture se veut de produire un poisson riche en EPA et en DHA bénéfiques pour la santé du consommateur. La supplémentation en EPA et en DHA dans les aliments piscicoles serait donc un moyen d'augmenter les concentrations dans la chair des poissons. A ce jour, les huiles de poissons minotiers demeurent être les principales sources non OGM d'EPA et de DHA (Graham et al., 2004). Par exemple, l'huile d'anchois contient 1,6

à 2,0% d'EPA et 9,0 à 12,7% de DHA, tandis que la plupart des végétaux terrestres n'en contient pas (Turchini et al., 2010).

Cette étude s'est voulue d'être innovante par l'intégration d'une source de DHA non animale et non OGM dans un aliment strictement végétal. Cette supplémentation a été possible grâce à l'utilisation de l'algue *Schizochytrium sp* naturellement riche en DHA. Les résultats ont montré que le passage d'un aliment commercial (lors de l'acclimatation des alevins) à un aliment végétal supplémenté en DHA d'origine micro-algale, permettait de maintenir le taux de DHA corporel. En effet, les profils en acides gras corporels reflétaient la composition de l'aliment challenge sur l'ensemble des lots de descendants testés. L'analyse des compositions corporelles a montré une diminution stricte de la teneur en EPA durant les 12 semaines de challenge, en lien avec l'absence de cet acide gras dans l'aliment, et quel que soit le passé nutritionnel des descendants. A l'opposé, les teneurs en DHA sont quant à elles restées stables chez les juvéniles au cours du challenge, indépendamment du régime de leurs génitrices respectives. Ces résultats indiquent donc très nettement que le DHA apporté par la poudre de micro-algues a pu être assimilé par les animaux tout en se maintenant durant la période de challenge de 12 semaines. Le DHA d'origine micro-algale semble être une nouvelle source d'acide gras à longue chaîne et pourra à l'avenir, être intégré dans les formulations d'aliment aquacoles en substitut à l'huile de poisson.

2. PERFORMANCES DE REPRODUCTION DES GENITRICES ET EFFETS DE L'ALIMENTATION MATERNELLE SUR LA CROISSANCE DES DESCENDANTS

La truite arc-en-ciel est une espèce carnivore et le remplacement des huiles et farines de poissons par des protéines et huiles végétales dans son alimentation a souvent montré des effets négatifs sur les performances de reproduction, sur la croissance ainsi qu'au niveau de la prise et de l'efficacité alimentaires (Gomes et al., 1995; Lazzarotto et al., 2016). Cependant peu d'études se sont intéressées aux conséquences de l'alimentation maternelle sur le phénotype des descendants. Bien que la truite arc-en-ciel nourrie avec un aliment strictement végétal soit capable de produire des œufs dans lesquels sont accumulés de l'EPA et du DHA, néosynthétisés à partir de l'acide linoléique apporté par l'alimentation, et d'engendrer des alevins viables, il n'en reste pas moins que les teneurs en EPA et DHA des œufs sont plus faibles en comparaison à de truites nourries avec un aliment contenant de la farine et de l'huile de poisson (Ballestrazzi et al., 2003). L'EPA et le DHA sont reconnus comme des facteurs déterminants de la qualité des œufs et des alevins chez plusieurs espèces de poissons (Izquierdo, 1996; Izquierdo et al., 2001; Rainuzzo et al., 1997; Watanabe, 1993). Il semblait donc important d'évaluer les avantages et les inconvénients d'une supplémentation alimentaire en DHA par le biais de micro-algues au cours du cycle de reproduction de la truite arc-en-ciel nourrie avec un aliment végétal, sur les performances des descendants.

Dans cette étude, des génitrices de truites arc-en-ciel ont donc été nourries pendant 25 semaines et jusqu'à la reproduction, avec un aliment végétal supplémenté ou non en DHA d'origine micro-algale (aliments VEG et VEG+DHA) ou un aliment commercial à base d'huiles et de farines de poisson (aliment COM). Les performances de reproduction n'ont pas été affectées par la nature du régime alimentaire des femelles (données présentées en **Annexe XV**). Nous observons en revanche une diminution de la taille des œufs (diamètre moyen moins élevé) chez les génitrices nourries avec l'aliment strictement végétal (VEG) conformément aux observations précédemment effectuées par Lazzarotto et al. en 2016. Les taux de survie et de malformation des alevins à l'éclosion étaient quant à eux identiques, quel que soit leur passé nutritionnel.

A la première alimentation et durant les 24 semaines d'alimentation commerciale (huiles et farines de poisson) suivantes, les descendants des femelles VEG et COM ont maintenu une masse corporelle inférieure comparés aux juvéniles issus des femelles VEG+DHA, résultats pouvant être mis en lien avec la taille initiale des œufs. Ce n'est qu'après le transfert dans une eau à 17°C (préférendum thermique de la truite arc-en-ciel pour la croissance) sur la pisciculture de Donzacq et à partir du challenge végétal supplémenté en DHA d'origine micro-algale, que les différences en termes de croissance se sont estompées. A la fin du challenge, l'ensemble des juvéniles présentait une masse corporelle identique quel que soit le régime de leurs génitrices respectives. Ainsi, dans des conditions de température optimale pour la croissance, une alimentation maternelle végétale supplémentée ou non en DHA permet d'obtenir des descendants avec une croissance correcte et similaire aux alevins issus des femelles nourries avec un aliment contenant de la farine et de l'huile de poisson. L'alimentation des génitrices, qu'elle soit strictement végétale ou supplémentée en DHA, n'a donc eu aucun effet négatif sur la croissance des descendants si on la compare à un régime classique à base d'huiles et de farines de poisson.

Le lissage de la croissance au cours du challenge peut s'expliquer par une efficacité alimentaire améliorée de 7% chez les descendants des femelles VEG, sans modification de la prise alimentaire journalière. L'amélioration de l'efficacité alimentaire chez ces juvéniles a probablement été induite par une modification de leur métabolisme via le régime strictement végétal de leur génitrice, les rendant alors moins exigeants en énergie mais plus efficaces en termes de rétention énergétique.

3. LA NUTRITION MATERNELLE SEMBLE PROGRAMMER LE METABOLISME DES DESCENDANTS SUR DU COURT-TERME

Après l'éclosion et jusqu'à résorption du sac vitellin, les alevins ne peuvent pas se nourrir avec un aliment d'origine exogène. Ils dépendent donc des réserves nutritives maternelles accumulées lors la vitellogenèse, constituant la dernière phase de l'ovogénèse. La composition de ces réserves reflètent l'alimentation de la femelle et sont destinées à nourrir l'embryon de manière endotrophe jusqu'à la résorption totale du sac vitellin et le passage à une alimentation exotrophe (Halver, 2013; Vernier, 1967).

De nombreuses études ont testé l'effet d'un stimulus nutritionnel à la première alimentation ou lors de la résorption du vitellus (Geurden et al., 2014, 2007; Lazzarotto et al., 2016; Liu et al., 2017). Dans cette étude, nous avons choisi d'appliquer le stimulus nutritionnel sur des truites arc-en-ciel au cours du cycle de reproduction (stade prénatal) dans le but d'évaluer si la composition du régime maternel pouvait affecter le phénotype des descendants et ainsi mettre en évidence l'existence d'une programmation nutritionnelle par voie parentale chez cette espèce.

Les résultats n'ont montré aucune conséquence négative d'une alimentation maternelle végétale supplémentée ou non en DHA sur la croissance et la survie des descendants, ni de modification de l'expression de certains gènes musculaires impliqués dans l'oxydation des acides gras à longue chaîne. L'étude a toutefois relevé une forte modification du métabolisme des lipides au niveau hépatique chez les juvéniles, dépendamment de la nature du régime maternel. En effet, l'alimentation maternelle semble avoir modifié les métabolismes du cholestérol, de la lipogenèse et de la biosynthèse des acides gras à longue chaîne des descendants ; descendants ayant été soumis à un challenge alimentaire (végétal supplémenté en DHA) au stade juvénile (15 g) suite à 24 semaines d'acclimatation avec un aliment commercial composé d'huiles et de farines de poisson. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une programmation nutritionnelle d'origine maternelle au niveau du

métabolisme des lipides chez la truite arc-en-ciel, en lien avec la nature de l'alimentation des génitrices.

3.1. Métabolisme du cholestérol

Avant toute chose, il est important de noter que l'incorporation d'une part élevée de matières premières végétales dans les aliments piscicoles induit une diminution du taux de cholestérol disponible pour les animaux. En effet, bien que riches en divers stérols, les végétaux ne contiennent pas de cholestérol. Il a également été montré que ces stérols végétaux inhibaient l'absorption du cholestérol chez les mammifères et sans doute aussi chez les poissons (Leaver et al., 2008; Phillips et al., 2002). Dans la présente étude, les aliments VEG et VEG+DHA ne contenaient pas de produits d'origine animale et étaient donc dépourvus de cholestérol. Le cholestérol joue néanmoins un rôle essentiel dans la fluidité et la perméabilité membranaires des cellules, en plus d'être le précurseur de nombreux composés biologiquement actifs tels que les acides biliaires ou les hormones stéroïdiennes (Maxfield & Tabas, 2005). L'hypothèse qu'une diminution de l'apport alimentaire en cholestérol puisse affecter la production et la qualité des œufs, nous amené à considérer le métabolisme du cholestérol chez les descendants.

A la fin des 12 semaines de challenge, les descendants des femelles nourries avec les aliments végétaux VEG et VEG+DHA, exemptes d'un apport en cholestérol durant les 25 semaines précédant la reproduction, présentaient des teneurs en cholestérol plasmatique plus faibles que les juvéniles issus des génitrices nourries avec un aliment commercial pourvu de cholestérol. Le taux corporel de cholestérol était en revanche plus élevé chez les juvéniles issus des femelles nourries avec l'aliment végétal supplémenté en DHA. Dans la mesure où l'ensemble des descendants ont été nourris avec les mêmes régimes (commercial puis végétal supplémenté en DHA), les différences observées en termes de cholestérol plasmatique et corporel sont à mettre en relation avec l'alimentation des génitrices. L'absence de cholestérol dans l'alimentation maternelle semble avoir induit une programmation nutritionnelle du métabolisme du cholestérol chez les descendants. Cette programmation pourrait être la conséquence d'une modification de la composition en stérols (cholestérol et phytostérols) du vitellus provoquant, chez les descendants, une modification de l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. La composition en stérols devra néanmoins être analysée pour étayer cette hypothèse.

Chez les poissons, la synthèse de cholestérol se déroule dans le foie et son export vers les tissus périphériques s'effectue par le sang. Les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol ou la synthèse des acides biliaires n'ont pas été impactés par la nature de l'alimentation maternelle. En revanche, la programmation du métabolisme du cholestérol par l'alimentation maternelle semble néanmoins avoir affecté l'élimination directe du cholestérol par la voie biliaire comme le suggèrent les différences significatives de l'expression des gènes codant pour les transports (*abcg5* et *abcg8*) mais également l'efflux du cholestérol hépatique vers le sang (*abca1*). La diminution des niveaux d'expression des gènes *abcg5* et *abcg8*, codant pour des protéines impliquées dans l'élimination biliaire du cholestérol chez les descendants des femelles nourries avec l'aliment VEG+DHA pourrait ainsi limiter la perte du cholestérol par la bile et contribuer à la préservation du cholestérol néosynthétisé en favorisant son stockage au niveau corporel. Chez les descendants des femelles VEG+DHA, nous observons également une augmentation de l'expression du transporteur *abca1*, facilitant ainsi l'efflux sanguin du cholestérol et donc la distribution du cholestérol vers les tissus périphériques.

Chez de nombreuses espèces, les concentrations en cholestérol plasmatique et corporel diminuent lorsque l'aliment est pauvre en cholestérol (Houston et al., 2017). Face à de tels régimes dénués de cholestérol, il aurait été probable d'observer une augmentation de

l'activité des gènes de la synthèse du cholestérol, permettant aux poissons de prévenir l'élimination du cholestérol néosynthétisé. Il semble que face à un régime sans cholestérol, les descendants des génitrices nourries avec l'aliment végétal supplémenté en DHA, aient plutôt acquis, par voie maternelle, des mécanismes de régulation leur permettant de préserver leur cholestérol corporel en prévision d'une absence de cholestérol dans l'alimentation.

Ce qu'il faut retenir concernant le métabolisme du cholestérol

- Les résultats plasmatiques, moléculaires et de composition corporelle confirment un effet de programmation maternelle au niveau du métabolisme du cholestérol.
- Les descendants des femelles VEG+DHA semblent avoir une capacité de rétention du cholestérol supérieure à celle des autres descendants.

3.2. Lipogenèse

La lipogenèse implique l'ensemble des processus métaboliques permettant la néoformation d'acides gras oméga 9 à partir du palmitate ainsi que la formation de tissus adipeux de réserves via les triglycérides. En effet, les triglycérides synthétisés dans le foie peuvent être stockés dans la cellule ou être transportés dans le sang pour être mis en réserve dans les adipocytes des tissus périphériques. Les descendants des femelles VEG+DHA présentaient, tout comme pour le cholestérol, des teneurs en triglycérides plasmatiques moins élevées par rapport aux juvéniles issus des génitrices VEG et COM. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé pour le cholestérol plasmatique étant donné que les triglycérides sont communément associés au cholestérol dans les chylomicrons (Council et al., 2011).

Chez les espèces piscivores, il a souvent été montré que le remplacement de l'huile et de la farine de poisson par des ingrédients végétaux induisait un engraissement de la chair et des viscères ainsi qu'une altération de la qualité du muscle (Burel et al., 2000; Cahu, 2004; Kaushik et al., 2004; Médale et al., 2013). Il est donc paru évident d'explorer les mécanismes de la lipogenèse chez les descendants étant donné que les régimes maternels VEG et VEG+DHA étaient strictement composés d'huiles et de protéines végétales.

Premièrement les gènes *acly1* et *fasn*, codant pour les deux enzymes initiatrices de la lipogenèse, se sont avérées être sous-exprimées au niveau moléculaire, mais uniquement chez les juvéniles dont les génitrices ont été nourries avec l'aliment végétal supplémenté en DHA, suggérant une diminution des capacités lipogéniques chez ces descendant. Cependant, ces résultats n'ont pu être confirmés au niveau de l'activité enzymatique de FAS. En revanche, comme l'indique l'absence de modification d'expression de la G6PDH impliquée dans la formation de NADPH, H⁺, aucune programmation nutritionnelle du cycle des pentoses phosphates n'a pu être mise en évidence. Bien que les activités enzymatiques ne concordent pas avec les résultats d'expressions géniques, il est important de garder en mémoire que les mécanismes métaboliques mis en jeu en réponse à un repas sont dynamiques, et que les échantillons de foie ont été prélevés 6 heures après le dernier repas. Il aurait donc été probable d'observer une activité plus élevée au moment du repas ou à un autre moment de la journée. Une cinétique postprandiale aurait permis de prendre en compte ce caractère dynamique.

L'analyse des compositions corporelles n'a montré aucune augmentation des teneurs en lipides totaux et donc, aucun signe d'engraissement du foie et des viscères chez les juvéniles issus des femelles VEG+DHA. De plus, les concentrations en triglycérides

hépatiques n'étaient pas plus élevées chez les descendants issus des régimes végétaux et aucune accumulation adipeuse n'a été observée au niveau du foie et des viscères suite à l'évaluation des indices hépato et viscéro somatiques. Ceci conforte l'absence d'une accentuation de la lipogenèse, malgré une surexpression des gènes de la lipogenèse chez les descendants des femelles VEG+DHA.

Bien que les jeunes truites issues des génitrices VEG+DHA semblent être de bonnes candidates dans l'obtention d'une chair moins grasse pour l'alimentation humaine, les résultats sont à prendre avec précaution car ils ont été obtenus sur une durée de challenge relativement courte. En effet, les échantillons ont été prélevés sur des truites d'environ 150 grammes qui n'avaient pas encore atteint le stade portion commercialisable de 300 grammes. Au vu de ces résultats il aurait été intéressant de prolonger le challenge au moins jusqu'au stade portion et au mieux jusqu'au stade grande truite (poisson de plus de 1 kg) afin d'évaluer si les effets observés à court-terme au niveau moléculaire se maintiennent sur une plus longue période et s'ils entraînent *in fine*, une modification de l'engraissement.

Ce qu'il faut retenir concernant la lipogenèse

- La lipogenèse a été soumise à programmation maternelle sans conséquence à court-terme sur l'engraissement des animaux.
- Les capacités « hypo-lipogéniques » des descendants des femelles VEG+DHA doivent être confirmées en prolongeant l'expérimentation au moins jusqu'aux stades de commercialisation.

3.3. Biosynthèse des acides gras à longue chaîne

La biosynthèse des acides gras à longue chaîne oméga 3 et oméga 6, est initiée par l'élongation des acides linoléique (18:2 n-6) et α -linoléique (18:3 n-3). Ces deux acides gras essentiels permettent, par désaturations et élongations successives, d'obtenir des acides gras oméga 3 à très longue chaîne tels que l'EPA et le DHA. Sachant que le poisson constitue la principale source d'EPA et de DHA pour l'Homme et que les végétaux ne possèdent pas la capacité de synthétiser ces deux acides gras, l'utilisation d'aliments piscicoles à base d'ingrédients végétaux est un facteur limitant à l'obtention de poissons riches en EPA et en DHA (A. Watters & M. Edmonds, 2012). La substitution de l'huile de poisson par des huiles végétales réduit donc considérablement les teneurs en EPA et en DHA dans la chair et diminue par conséquent la qualité nutritionnelle du poisson (Caballero et al., 2002; Drew et al., 2007; Greene & Selivonchick, 1990). En outre, il a également été montré que l'accumulation d'EPA et de DHA dans les œufs de truite arc-en-ciel était plus faible chez les femelles nourries avec un aliment végétal (Ballestrazzi et al., 2003). Il semblait donc important d'évaluer les conséquences d'une supplémentation en DHA dans un régime végétal chez les génitrices, afin d'estimer les capacités de synthèse d'EPA et de DHA chez les descendants.

Parmi l'ensemble des gènes de la biosynthèse des acides gras à longue chaîne étudiés, seuls deux élongases semblaient être soumises à un effet de programmation maternel. L'enzyme ELOVL5 impliquée dans les premières étapes de la biosynthèse et ELOVL2 impliquée dans la conversion de l'EPA en DHA, étaient sous-exprimées chez les descendants des femelles nourries avec les aliments VEG et VEG+DHA, indiquant un effet délétère de l'alimentation maternelle chez ces individus. Ces résultats sous-entendent donc que, face à une alimentation végétale supplémentée en DHA, ces descendants seraient

susceptibles de synthétiser moins d'EPA et de DHA comparés à leurs homologues issus des femelles COM. L'étude des profils en acides gras n'a cependant montré aucune différence en termes de compositions corporelles en acides gras. Par conséquent, nous observons comme pour la lipogenèse, une programmation maternelle au niveau moléculaire sans répercussion sur la composition corporelle du poisson. Les acides gras retrouvés dans les compositions corporelles des descendants reflètent simplement la composition de l'aliment challenge riche en DHA et dépourvue d'EPA. Ainsi, le passage d'un aliment commercial (riche en EPA et en DHA) à un aliment végétal supplémenté en DHA a permis de maintenir les teneurs corporelles en DHA indiquant que la supplémentation en micro-algues est efficace.

Au vu des résultats moléculaires obtenus dans cette étude, l'alimentation maternelle végétale, qu'elle soit supplémentée ou non en DHA, semble induire une diminution de la synthèse d'acides gras à longue chaîne ayant un intérêt pour l'alimentation humaine. L'expression des gènes-clés du métabolisme en question n'a cependant pu être mise en lien avec ce qui a été observé au niveau du phénotype des descendants. Les profils en acides gras semblent plutôt refléter la composition de l'aliment challenge et permettent également de confirmer que le DHA contenu dans la poudre de micro-algues peut être utilisé et assimilé par la truite arc-en-ciel.

Ce qu'il faut retenir concernant la biosynthèse des acides gras à longue chaîne

- Les modifications aux niveaux moléculaires indiquent un effet de programmation sur le métabolisme de la biosynthèse des LC-PUFA n-3.
- Bien que le métabolisme des LC-PUFA ait été modifié au niveau moléculaire chez les descendants, les régimes maternels à base de végétaux ne semblent pas induire une amélioration de la production d'oméga 3 chez les juvéniles.
- L'apport de DHA par la supplémentation en micro-algues permet de maintenir le taux de DHA corporel chez l'ensemble de descendants, indépendamment de leur passé nutritionnel maternel.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce stage était d'évaluer les conséquences d'un régime maternel à base de végétaux supplémenté en DHA d'origine micro-algale sur le métabolisme des descendants de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*.

Clairement et pour la première fois dans la littérature, les résultats biochimiques et moléculaires obtenus dans ce travail ont montré que la nutrition lipidique maternelle, en particulier en termes de DHA, pouvait induire une modification du métabolisme des lipides chez les descendants. En effet, les métabolismes du cholestérol, de la lipogenèse et de la biosynthèse des acides gras à longue chaîne ont été modifiés chez les descendants en fonction de l'alimentation maternelle. Afin d'approfondir les résultats obtenus, il sera intéressant d'explorer les mécanismes à l'origine de la programmation nutritionnelle parentale en étudiant par exemple, les mécanismes épigénétiques représentés par des modifications permanentes de certaines marques épigénétiques (e.g. histones et ADN).

Afin de tester la croissance et la reproduction des truites arc-en-ciel en conditions d'élevage dans des fermes aquacoles, l'aliment VEG+DHA est actuellement testé aux *Viviers de Rébénacq* sur l'intégralité d'un cycle de production et nous permettra de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en conditions expérimentales.

BIBLIOGRAPHIE

- A. Watters, C., M. Edmonds, C., 2012. A Cost Analysis of EPA and DHA in Fish, Supplements, and Foods. *J Nutr Food Sci* 02. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000159>
- Ballestrazzi, R., Rainis, S., Tulli, F., Bracelli, A., 2003. The effect of dietary coconut oil on reproductive traits and egg fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 11, 289–299. <https://doi.org/10.1023/A:1024876024720>
- Beigneux, A.P., Kosinski, C., Gavino, B., Horton, J.D., Skarnes, W.C., Young, S.G., 2004. ATP-Citrate Lyase Deficiency in the Mouse. *J. Biol. Chem.* 279, 9557–9564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310512200>
- Bock, G.R., Whelan, J., 2008. The Childhood Environment and Adult Disease. *John Wiley & Sons*.
- 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, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., Kaushik, S.J., 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188, 285–298. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00337-9)
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253–271. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00852-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00852-3)
- Cahu, C., 2004. Domestication and nutrition in fish 17, 205–210.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Costa-Pierce, B.A., 2008. Ecological Aquaculture: The Evolution of the Blue Revolution. *John Wiley & Sons*.
- Jobling, M., 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. *National Academies Press*.
- Davis, D.A., 2015. Feed and Feeding Practices in Aquaculture. *Woodhead Publishing*.
- De Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., GÓMEZ-RÉQUENI, P., Médale, F., Kaushik, S. j., Mecatti, M., Poli, B. m., 2007. Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. *Aquaculture Nutrition* 13, 361–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00485.x>
- Doumenge, F., 1986. La révolution aquacole. *Annales de géographie* 95, 445–482. <https://doi.org/10.3406/geo.1986.20434>
- Drew, M.D., Ogunkoya, A.E., Janz, D.M., Van Kessel, A.G., 2007. Dietary influence of replacing fish meal and oil with canola protein concentrate and vegetable oils on growth performance, fatty acid composition and organochlorine residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, Nutrition and Feeding of Fish* 267, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.002>
- FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture 2016: contributing to food security and nutrition for all.
- Fischer, E., 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 27, 2985–2993. <https://doi.org/10.1002/cber.18940270364>
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fry, J.P., Mailloux, N.A., Love, D.C., Milli, M.C., Cao, L., 2018. Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly? *Environ. Res. Lett.* 13, 024017. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaa273>
- Gélineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L., Kaushik, S., 2001. Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 487–503. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001103>

- Geurden, I., Aramendi, M., Zambonino-Infante, J., Panserat, S., 2007. Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292, R2275–R2283. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00444.2006>
- Geurden, I., Mennigen, J., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Cerezo, T., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Gatesoupe, J., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2014. High or low dietary carbohydrate:protein ratios during first-feeding affect glucose metabolism and intestinal microbiota in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 217, 3396–3406. <https://doi.org/10.1242/jeb.106062>
- Gomes, E.F., Rema, P., 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, 177–186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6)
- Graham, I.A., Cirpus, P., Rein, D., Napier, J.A., 2004. The use of very long chain polyunsaturated fatty acids to ameliorate metabolic syndrome: transgenic plants as an alternative sustainable source to fish oils. *Nutrition Bulletin* 29, 228–233. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00440.x>
- Greene, D.H.S., Selivonchick, D.P., 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89, 165–182. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90308-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90308-A)
- Guillaume, J., Publishing, P., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R., 2001. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. *Springer Science & Business Media*.
- Guillou, H., Zadravec, D., Martin, P.G.P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49, 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>
- Hales, C.N., Barker, D.J.P., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601. <https://doi.org/10.1007/BF00400248>
- Halver, J., 2013. Fish Nutrition. *Elsevier*.
- Hamad, B., 2009. Transestérification des huiles végétales par l'éthanol en conditions douces par catalyses hétérogènes acide et basique. *Thèse*. Lyon 1.
- Harach, 2002. Development and diversification issues in aquaculture. A historical and dynamic view of fish culture diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 59, 15-23.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research* 6, 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Houston, S.J.S., Karalazos, V., Tinsley, J., Betancor, M.B., Martin, S.A.M., Tocher, D.R., Monroig, O., 2017. The compositional and metabolic responses of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to a gradient of dietary fish oil and associated n-3 long-chain PUFA content. *British Journal of Nutrition* 118, 1010–1022. <https://doi.org/10.1017/S0007114517002975>
- Ifremer, 2011. Historique [WWW Document]. Aquaculture. URL <https://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Presentation-generale/Historique> (accessed 8.5.19).
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2, 183–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.1996.tb00058.x>
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture, Reproductive Biotechnology in Finfish*. *Aquaculture* 197, 25–42. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00581-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6)
- Kaushik, S.J., Covès, D., Dutto, G., 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, 391–404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)
- Kjeldahl, C., 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z Anal Chem* 22, 366.
- Kolditz, C.-I., 2008. Déterminisme nutritionnel et génétique de la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*): étude par analyse de l'expression de gènes candidats, du protéome et du transcriptome du foie et du muscle. *Thèse*. Bordeaux 1.
- Koshland, D. E., 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 44, 98-104. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.2.98>

- Lazzarotto, V., Corraze, G., Larroquet, L., Mazurais, D., Médale, F., 2016. Does broodstock nutritional history affect the response of progeny to different first-feeding diets? A whole-body transcriptomic study of rainbow trout alevins. *British Journal of Nutrition* 115, 2079–2092. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001252>
- Le Gouvello, R., Simard, F., 2017. Durabilité des aliments pour le poisson en aquaculture: réflexions et recommandations sur les aspects technologiques, économiques, sociaux et environnementaux. *UICN*.
- Leaver, M.J., Villeneuve, L.A., Obach, A., Jensen, L., Bron, J.E., Tocher, D.R., Taggart, J.B., 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9, 299. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-299>
- Liu, J., Dias, K., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Panserat, S., Marandel, L., 2017. Long-term programming effect of embryonic hypoxia exposure and high-carbohydrate diet at first feeding on glucose metabolism in juvenile rainbow trout. *J Exp Biol* 220, 3686–3694. <https://doi.org/10.1242/jeb.161406>
- Lucas, A., 1998. Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *J Nutr* 128, 401S-406S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.401S>
- Maxfield, F.R., Tabas, I., 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612.
- McCance, R.A., 1962. FOOD, GROWTH, AND TIME. *The Lancet*. Originally published as Volume 2, Issue 7257 280, 621–626. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(62\)92539-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(62)92539-4)
- Médale, F., Le Boucher, R., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Aubin, J., Panserat, S., 2013. Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. *INRA Prod. Anim.* 26(4) 303-316.
- Mourente, G., Bell, J.G., 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 145, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.08.012>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51, 263-273. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Nash, C., 2010. The History of Aquaculture. *John Wiley & Sons*.
- Nasopoulou, C., Zabetakis, I., 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT* 47, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.018>
- Panserat, S., Marandel, L., Seilliez, I., Skiba-Cassy, S., 2018. New Insights on Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts. *Annual Review of Animal Biosciences* 7, 195–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115250>
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204, 2351–2360.
- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., Simpkins, A.H., 2002. Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *Journal of Food Composition and Analysis* 15, 123–142. <https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1044>
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 95 155, 103–115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00121-X)
- Sauer, C.O., 1952. Agricultural origins and dispersals. *American Geographical Society*, New York, Etats-Unis d'Amérique.
- Senécal, P., 2010. Histoire de l'interprétation de la transition néolithique: évolution des théories, modèles et hypothèses. *Thèse*. Montréal.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2003. Biochimie. *Flammarion Médecine-Sciences*.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2015. Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23, 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>

- Teletchea, F., 2016. Habilitation "Apports de la systématique à la domestication de nouvelles espèces en aquaculture : applications aux premiers stades vie. *Mémoire HDR*. Université de Lorraine.
- Temin, H.M., Baltimore, D., 1972. RNA-Directed DNA Synthesis and RNA Tumor Viruses, in: Smith, K.M., Lauffer, M.A., Bang, F.B. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 129–186. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60749-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60749-6)
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>
- Turchini, G.M., Ng, W.-K., Tocher, D.R., Ng, W.-K., Tocher, D.R., 2010. Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds. *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/9781439808634>
- Turkmen, S., Hernández-Cruz, C.M., Zamorano, M.J., Fernández-Palacios, H., Montero, D., Afonso, J.M., Izquierdo, M., 2019. Long-chain PUFA profiles in parental diets induce long-term effects on growth, fatty acid profiles, expression of fatty acid desaturase 2 and selected immune system-related genes in the offspring of gilthead seabream. *Br. J. Nutr.* 122, 25–38. <https://doi.org/10.1017/S0007114519000977>
- Vernier, J.-M., 1967. Table chronologique du développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri Rich. 1836. Annales d'embryologie et de morphogenèse*, Vol.2, n°4, 495-520.
- Watanabe, T., 1993. Importance of Docosahexaenoic Acid in Marine Larval Fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 152–161. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00004.x>
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 73, 3–15. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90196-1)
- Webber, H.H., Riordan, P.F., 1976. Criteria for candidate species for aquaculture. *Aquaculture* 7, 107–123. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90001-6)
- Widdowson Elsie May, McCance Robert Alexander, 1963. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 158, 329–342. <https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0051>

ANNEXES

Annexe I - *Dosage des acides aminés totaux plasmatiques*

Les teneurs plasmatiques en acides aminés totaux ont été mesurées par dosage colorimétrique à la Ninhydrine Sigma à 2% (réf. Aldrich : N7285).

Cent microlitres (100 μ l) de chaque échantillon plasmatique ont été déposés dans un Eppendorf (1,5 ml) muni d'une membrane ultrafiltrante Amicon YM100 (100 kDa). L'ensemble des échantillons a été centrifugé à 14000g durant 1h30 à 15°C (centrifugeuse Thermofischer Scientific MEGAFUGE 16R). Les ultrafiltrats obtenus ont été pesés (balance de précision SARTORIUS MSA225P-1CE-DI, $d = 10^{-5}$) puis dilués au tiers ou au quart dans de l'eau distillée (réf. : VWR 23597.405). La gamme d'étalonnage (0 à 4 μ mol·ml⁻¹) a été réalisée à partir d'une solution mère commerciale, composée de 17 acides aminés et de cystine (1,5 μ mol·ml⁻¹) (réf. sigma : AA-S-18). Une solution contrôle de plasma C_p (8 \pm 2 μ mol·ml⁻¹) diluée au cinquième a été réalisée en parallèle. La gamme d'étalonnage, la C_p diluée ainsi que les ultrafiltrats plasmatiques dilués ont été redilués dans des tubes Falcon de 15 ml à raison de 25 μ l de solution pour 575 μ l d'eau distillée et 200 μ l de Ninhydrine Sigma (2%) ont été ajoutés dans chaque tube. Les échantillons ont ensuite été placés dans un bain-marie à 100°C durant 11 minutes puis refroidis à température ambiante durant 5 minutes. Enfin, 1,5 ml d'une solution d'éthanol à 96% ont été ajoutés dans chaque tube. Les densités optiques ont été mesurées en cuve par un spectrophotomètre (spectrophotomètre SHIMADZU PharmaSpec UV-1700) à 570 nm sur 5 μ l de solution. L'expression et la détermination des concentrations en acides aminés totaux ont été réalisées à partir de la droite d'étalonnage, en tenant compte des volumes d'ultrafiltrat et des facteurs de dilution.

Annexe II - *Dosage du glucose plasmatique et du glycogène hépatique et musculaire*

Les teneurs en glucose et en glycogène ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque avec un kit Sobioda (réf. réactif : W1306.122) selon la méthode quantitative GOD-POD (glucose oxydase-peroxydase).

Une gamme de glucose (0 à 3,70 mg·ml⁻¹) et une gamme de glycogène (0 à 10 mg·ml⁻¹) ont été réalisées à partir des standards CALIMAT (réf. Biomérieux : 62321). Les échantillons plasmatiques purs, les solutions d'étalonnage et le contrôle (C_p) ont été disposés en triplicatas sur la microplaque à raison de 5 μ l par puit. Deux cent cinquante microlitres (250 μ l) de réactif ont été ajoutés dans chaque puit, la microplaque a été homogénéisée au vortex puis mise à incuber dans un bain thermostaté durant 15 minutes à 37°C. Les densités optiques des échantillons plasmatiques, musculaire, hépatique, de la gamme d'étalonnage et de la C_p ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre SHIMADZU UV-1700) à 505 nm après incubation. La détermination des concentrations en glucose a été réalisée à partir de la droite d'étalonnage.

Les échantillons de foie et de muscle ont été soumis à broyage et extraction avant d'effectuer les dosages. Les échantillons de foie (100 mg) et de muscle (200 mg) ont été broyés à l'ULTRA-TURRAX® dans 1 ml de solution de chlorure d'hydrogène HCl à 1 mol·l⁻¹. L'extraction du glucose total (glucose libre et glycogène) a été réalisée à chaud durant 3 heures et 30 minutes à 100°C dans la solution d'HCl. A la fin de l'incubation, les solutions ont

été centrifugées à 3000g durant 20 minutes. Les surnageants ont été récupérés et le glycogène a été neutralisé avec 150 µl d'hydroxyde de potassium KOH à 5 mol·l⁻¹. Le glucose libre a quant à lui été extrait à froid dans 50 µl de KOH (5 mol·l⁻¹). Les échantillons ont été centrifugés à 3000g durant 20 minutes et les surnageants ont été récupérés. Les dosages du glucose total et du glucose libre ont été effectués sur les surnageants de foie et de muscle dilués de manière analogue à la méthode de dosage plasmatique. La quantité de glycogène a été déterminée par soustraction des teneurs en glucose libre à la teneur totale en glucose (glycogène et glucose libre).

Annexe III - Dosage du cholestérol plasmatique et corporel

Les teneurs en cholestérol ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque avec un kit Sobioda (réf. réactif : WCHOL100) selon la méthode quantitative CHOD-POD (cholestérol oxydase-peroxydase).

Une gamme de cholestérol (0 à 3 mg·ml⁻¹) a été réalisée à partir du standard CALIMAT (réf. Biomérieux : 62321). Les échantillons plasmatiques dilués, les solutions d'étalonnage et le contrôle (C_p) ont ensuite été disposés individuellement et en duplicas dans chaque puit de la microplaque à raison de 5 µl par puit. Deux cent microlitres (200 µl) de réactif ont ensuite été ajoutés dans chaque puit, la microplaque a été homogénéisée au vortex puis mise à incuber dans un bain thermostaté durant 15 minutes à 37°C. Les densités optiques des échantillons plasmatiques, de la gamme d'étalonnage et de la C_p ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1700) à 505 nm après incubation. La détermination des concentrations en cholestérol a été réalisée à partir de la droite d'étalonnage, en tenant compte des volumes d'ultrafiltrat et des facteurs de dilution.

Le dosage du cholestérol corporel a été réalisé à partir des échantillons de lipides totaux dilués au demi dans un mélange d'isopropanol et d'Igepal (10%). Les dosages ont été effectués sur les solutions lipidiques et ont été réalisés de manière analogue à la méthode décrite pour les échantillons plasmatiques.

Annexe IV - Dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques

Les teneurs en triglycérides ont été déterminées par un dosage enzymatique colorimétrique sur microplaque avec un kit Sobioda (réf. réactif : WTRIG050) selon la méthode quantitative GPO-POD (glycérol-3-oxydase-peroxydase).

Une gamme de triglycérides (0 à 4 mg·ml⁻¹) a été réalisée à partir du standard CALIMAT (réf. Biomérieux : 62321). Les échantillons de foie dilués, les échantillons plasmatiques dilués, les solutions d'étalonnage et le contrôle (C_p) ont été disposés individuellement et en duplicas dans chaque puit de la microplaque à raison de 5 µl par puit. Deux cent microlitres (200 µl) de réactif ont ensuite été ajoutés dans chaque puit, la microplaque a été homogénéisée au vortex puis mise à l'étuve pour incubation durant 20 minutes à 38°C. Les densités optiques des échantillons plasmatiques, de la gamme d'étalonnage et de la C_p ont été mesurées dans un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1700) à 505 nm après incubation. La détermination des concentrations en triglycérides a été réalisée à partir de la droite d'étalonnage, en tenant compte des volumes d'ultrafiltrat et des facteurs de dilution.

Les broyages des tissus ont été réalisés à l'ULTRA-TURRAX® sur 100 mg de foie dans 1 ml de solution détergente non dénaturante composée de 5% d'octylphénoxy polyéthoxyéthanol (5% Igepal/ddH₂O). Une fois broyés, les échantillons ont été incubés dans un bain-marie à agitation (Stuart Scientific Shaking Water Bath SBS30) à 90°C durant 5 minutes et 600 µl de chaque lysat ont été centrifugés à 12000g pendant 10 minutes (centrifugeuse Thermofischer Scientific MEGAFUGE 16R). Les surnageants obtenus ont été dilués au 8^{ème} dans la solution d'Igepal (5%) puis dosés selon la méthode décrite pour les échantillons plasmatiques.

Annexe V - Détermination des teneurs en matière sèche

Les poissons entiers congelés ont été broyés à deux reprises dans un hachoir à viande et les coupelles vides en aluminium ont été pesées (m_0) (balance de précision SARTORIUS ENTRIS 224 I, $d = 10^{-4}$). Environ 2 grammes de broyat ont été disposés dans les coupelles, pesées (m_1) et placées dans une étuve thermostatée à $103 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 heures. Les broyats ont été refroidis dans un dessiccateur à vide comportant des billes de carbonate de calcium (CaCl_2) et les coupelles contenant les broyats secs ont été pesées individuellement (m_2). Le pourcentage de matière sèche (%MS) contenu dans chaque échantillon a été déterminé par différence de masses (**équation 27**).

$$\%MS = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (27)$$

Avec m_0 : la masse de la coupelle vide (en grammes), m_1 : la masse de la coupelle et du broyat humide (en grammes) et m_2 : la masse de la coupelle et du broyat sec (en grammes).

Annexe VI - Lyophilisation des échantillons pour analyses

Les poissons entiers congelés ont été broyés à l'aide d'un hachoir à viande, puis disposés dans des barquettes en aluminium sur une épaisseur d'un centimètre et placés dans un lyophilisateur SERAIL CS5-0,4 durant 34 heures (**Tableau 12**). A la fin de la lyophilisation, les échantillons ont été broyés puis conservés en chambre froide dans des pots hermétiques jusqu'à analyse.

Tableau 12. Cycle de lyophilisation utilisé dans l'appareil SERAIL CS5-0,4.

			Température	Temps (min)	Caractéristiques
Etape 1 Basse pression	Congélation	1A	-45°C	30	L'eau contenue dans l'échantillon passe rapidement de la température ambiante à -45°C, ce qui permet la formation de petits cristaux de glace. La température est ensuite maintenue jusqu'à l'étape 2.
		1B	-45°C	30	
		1C	-45°C	60	
Etape 2 Sous vide	Sublimation (dessiccation primaire)	2A	-45°C	60	La mise sous vide de l'appareil provoque le début de la sublimation. La vapeur d'eau émise est récupérée dans un compresseur. La compression de la vapeur d'eau va provoquer un échauffement et la chaleur sera redistribuée afin de réchauffer les échantillons. Durant la sublimation, la température des échantillons augmente progressivement et ces derniers perdent leur eau. A la fin de la sublimation, les échantillons ne contiennent plus que 3 à 6 % d'humidité.
		2B	-30°C	60	
		2C	-15°C	60	
		2D	0°C	60	
		2E	+10°C	60	
		2F	+20°C	60	
Etape 3 Vide poussé	Désorption (dessiccation secondaire)	3A	+23°C	60	Le maintien des échantillons sous un vide poussé et à la température maximale de non détérioration, permet de provoquer le départ des molécules d'eau retenue par absorption.
		3B	+25°C	60	
		3C	+25°C	60	

Annexe VII - Détermination des teneurs en cendres brutes

Les déterminations ont été réalisées par incinération (four à cendres LENTON FURNACES) sur 100 mg de lyophilisat dans des coupelles en porcelaine préalablement pesées (m_0) (balance de précision SARTORIUS ENTRIS 224 I, $d = 10^{-4}$). Les coupelles contenant les échantillons ont été placées à l'étuve durant 24 heures, puis refroidies au dessiccateur durant 1 heure. Une fois revenues à température ambiante, les coupelles ont été pesées (m_1). Enfin, les coupelles ont été mises à incinérer durant 17 heures à 570°C puis pesées (m_2) après refroidissement au dessiccateur. Le pourcentage de cendres brutes (% de cendres) contenue dans chaque échantillon a été déterminé par différence de masses (équation 28).

$$\% \text{ de cendres} = \frac{(m_2 - m_0) \times 100}{(m_1 - m_0)} \quad (28)$$

Avec m_0 : la masse de la coupelle vide (en grammes), m_1 : la masse de la coupelle contenant le lyophilisat (en grammes) et m_2 : la masse de la coupelle contenant les cendres brutes (en grammes).

Annexe VIII - Dosage de l'énergie calorifique brute par calorimétrie

L'énergie calorifique brute a été déterminée en duplicas par combustion adiabatique (sans transfert de chaleur avec l'extérieur) dans un calorimètre IKA C5003. Pour chaque échantillon, environ 250 mg de lyophilisat (balance de précision SARTORIUS ENTRIS 224 I, $d = 10^{-4}$) ont été disposés dans une capsule en amidon (IKA Werke Staufen, réf. : 4500046481). Chaque capsule a été placée et comburée individuellement dans une bombe calorimétrique saturée en dioxygène. Les résultats obtenus ont été exprimés en kilojoules par gramme de matière sèche.

Annexe IX - Détermination des teneurs en protéines par la méthode de Kjeldahl (1883)

Les teneurs en protéines ont été déterminées en duplicas par la méthode de (Kjeldahl, 1883). Pour chaque échantillon, environ 350 mg de lyophilisat ont été disposés dans des nacelles de pesées (balance de précision SARTORIUS ENTRIS 224 I, $d = 10^{-4}$) puis transvasés dans des matras de minéralisation. Afin d'accélérer et d'optimiser la réaction de digestion, un catalyseur composé de sulfate de potassium et de sélénium (pastilles Kjeltabs Se/3,5) ainsi que 5 ml d'acide sulfurique à 95% ont été ajoutés dans chaque matras. L'ensemble des matras a été disposé sur une rampe à minéralisation muni d'un bloc chauffant et d'un récupérateur de vapeurs. Les protéines ont été digérées durant 3 heures et 15 minutes puis distillées dans un système Tecator KJELTEC1026. L'ammoniac gazeux a été dosé dans ce même système selon le principe de titrage à l'acide chlorhydrique. Les taux de protéines ont été directement exprimés en pourcentage par l'appareil et ramenés à leur teneur en matière sèche respective.

Annexe X - Détermination des teneurs en lipides totaux et acides gras par la méthode de Folch (1956)

Les teneurs en lipides totaux ont été déterminées selon la méthode de Folch et al. (1957). Les extractions ont été réalisées en duplicas par un mélange de solvants composé de deux volumes de dichlorométhane pour un volume de méthanol. Pour chaque échantillon, environ 5 grammes de matière fraîche (m_0) ont été broyés individuellement à l'Ultra-Turrax dans 40 ml de solvant d'extraction et une spatule d'HYFLO SUPERCEL® (silice). Chaque broyat a ensuite été filtré sous vide (filtre Wathman GF/A 55 mm). Les opérations d'extraction et de filtration ont été répétées trois fois. Les filtrats obtenus ont été mélangés à 30 ml de solution de chlorure de sodium (0,73 %) puis mis à décanter durant 24 heures. La phase inférieure organique (dichlorométhane et lipides totaux) de chaque échantillon a ensuite été

récupérée dans un ballon préalablement pesé (m_1), puis évaporée dans un évaporateur rotatif BUCHI (*Rotovapor RE 121*). Les ballons contenant les lipides totaux ont été placés dans un dessiccateur durant 24 heures puis pesés. Enfin, les teneurs en lipides de chaque échantillon ont été déterminées et exprimées en pourcentage (**équation 29**), puis ramenées à leur teneur en matière sèche respective (**équation 30**).

$$\% \text{ de lipides} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (29)$$

$$\% \text{ de lipides dans la MS} = \frac{\% \text{ de lipides}}{\% \text{ MS}} \times 100 \quad (30)$$

Avec m_0 : la masse de l'échantillon (en grammes), m_1 : la masse du ballon vide (en grammes) et m_2 : la masse du ballon contenant les lipides (en grammes), %MS : le taux de matière sèche de l'échantillon (en %).

Les lipides totaux obtenus par la méthode d'extraction de Folch ont ensuite été transestérifiés par du méthanol sous l'action du triflorure de bore (catalyseur) à température élevée permettant de former des esters méthyliques. Cent milligrammes de lipides totaux ont été repris dans 0,5 ml de dichlorométhane et 6 ml de potasse alcoolique (0,5M). Les solutions ont été transférées dans des flacons hermétiques et placées à l'étuve (103°C) durant 10 minutes. Une fois revenus à température ambiante, les échantillons ont été méthylés au triflorure de bore à raison de 1 ml pour 10 mg de lipides puis replacés à l'étuve durant 40 minutes (103 °C). Après ajout d'un volume d'eau identique au volume de triflorure de bore et de 5 ml d'hexane, l'ensemble des échantillons a été mis à centrifuger à 3000g pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu a été mis à décanter durant 10 minutes et la phase supérieure a été récupérée et filtrée sur du sulfate de sodium anhydre. Le volume d'hexane final a été ajusté à 10 mg/ml. Les esters de méthyl ont ensuite été séparés par chromatographie en phase gazeuse (CPG Varian 3800) à raison d'un débit d'hélium de 1ml·min⁻¹. Un microlitre de chaque échantillon (solution d'acides gras méthylés) a été injecté sur une colonne capillaire (DB wax – 30 m x 0,25 mm) par un passeur automatique. La quantification de chaque acide gras a été effectuée par le logiciel *Star* de Varian selon des standards établis. Les quantités de chaque acide gras ont été exprimées en pourcentage par rapport à la somme des acides gras totaux.

Annexe XI - Extraction d'ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du TRIzol® Reagent – Invitrogen (solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine) selon la méthode initialement décrite par Chomczynski & Sacchi (1987).

Pour chaque échantillon, 50 à 75 mg de foie et 100 à 140 mg de muscle congelés ont été prélevés et broyés individuellement (broyeur-homogénéiseur Precellys® durant 40 secondes à 5500 rpm) dans des tubes contenant des billes (Ø 2,8 mm) et 1000 µl de TRIzol® Reagent. Les broyats de muscle ont été centrifugés durant 10 minutes afin d'en retirer les débris organiques insolubles (Heraeus MEGAFUGE 16 R Centrifuge, 12000 rpm, 4°C), et les surnageants de foie et de muscle ont été aliquotés individuellement dans des tubes Falcon de 2 ml. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 200 µl de chloroforme ont été ajoutés à chaque aliquote et les échantillons ont été centrifugés durant 15 minutes (12000 rpm, 4°C). Les surnageants obtenus (suspensions d'ADN et d'ARN) ont été mélangés à 500 µl d'isopropanol, incubés 10 minutes à température ambiante et centrifugés durant 10 minutes

(12000 rpm, 4°C) afin de faire précipiter l'ARN dans le culot. Après avoir ôté l'isopropanol, les pelotes d'ARN obtenues ont été lavées avec 1000 µl d'éthanol à 75% et les échantillons ont été centrifugés durant 5 min (12000 rpm, 4°C). L'éthanol a ensuite été retiré et les pelotes ont été dissoutes dans 300 µl d'eau stérile pour le foie et 150 µl d'eau stérile pour le muscle. Les quantités d'ARN ont été estimées par spectrophotométrie microvolume (NanoDrop® ND-1000) pour une unité d'absorbance à 260 nm équivalente à 40 µg·ml⁻¹ d'ARN. La qualité de l'extraction a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Enfin, les échantillons extraits ont été conservés à -20°C.

Annexe XII - *Retrotranscription des ARN totaux en ADNc*

La transcription inverse (RT) des ARN totaux extraits (ARNm, ARNt, ARNr) permet la synthèse des ADN complémentaires (ADNc). La première étape de la RT consiste en la dénaturation de l'ARN. La seconde étape permet la transcription inverse des ARN dénaturés en ADNc sous l'action de la reverse transcriptase, enzyme découverte par Howard M. Temin et David Baltimore en 1970 (Temin & Baltimore, 1972). La retrotranscription a été réalisée en barrette en duplicas pour les ARN totaux extraits du foie et du muscle des juvéniles.

A partir des concentrations en ARN totaux obtenues par spectrophotométrie microvolume, 2 µg de chaque échantillon d'ARN ont été dilués dans de l'eau stérile pour un volume final de 20 µl. Les amorces aléatoires (Random primers PROMEGA C1181), les désoxyribonucléotides (dNTPs PROMEGA C1145) et l'ARN luciférase (2 pg·µl⁻¹) ont été respectivement ajoutés dans chaque solution d'ARN à hauteur de 2 µl, 2 µl et 1 µl. Deux blancs (réactions contrôles) ont été réalisés afin de mettre en évidence une éventuelle contamination des réactifs : un blanc ADN à partir de 1 µg d'ARN extrait pour un volume total de 10 µl et un blanc RT à partir de 10,5 µl d'eau stérile. Les mêmes volumes d'amorces et de dNTPs ont été ajoutés à chacun de deux blancs mais sans ARN luciférase. Les échantillons et les blancs ont ensuite été soumis à dénaturation pendant 5 minutes à 65°C dans un Thermocycler T100 BIORAD puis maintenues à 4°C. Les échantillons dénaturés ont été aliquotés afin d'obtenir des duplicas et ont chacun accueilli 1,5 µl d'eau stérile, 0,5 µl de transcriptase inverse (SuperScriptIII RNaseH-Reverse Transcriptase Invitrogen 18080-044), 4 µl de tampon 5X First Strand Buffer Invitrogen (stabilise l'activité de la transcriptase inverse), 1 µl de dithiothréitol Invitrogen (0,1 mol·l⁻¹, réducteur fort déstabilisateur des ponts disulfures des RNases) et 1 µl d'inhibiteur à RNases (RNase OUT Invitrogen 10777-019). Les mêmes volumes d'eau, de tampon, de dithiothréitol et d'inhibiteur à RNase ont été ajoutés aux blancs. La transcriptase inverse (0,5 µl) n'a été ajoutée que dans le blanc RT. Enfin, l'ensemble des échantillons a été exposé à un cycle de retrotranscription composé de trois étapes thermiques (5 minutes à 25°C, 60 minutes de retrotranscription à 55°C et 15 minutes d'inactivation de la transcriptase inverse à 70 °C) dans un Thermocycler T100 BIORAD.

Annexe XIII - qPCR en temps réel des ARN cibles

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) est une méthode d'amplification par polymérisation en chaîne permettant de dupliquer une séquence d'ADNc et de suivre la quantité d'ADNc produite en temps réel à chaque cycle de PCR. L'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques permet d'étudier l'expression d'un gène d'intérêt. Les transcrits dont les expressions ont été quantifiées dans le muscle des alevins challengés sont les paralogues de la carnitine palmitoyltransferase (*cpt1a*, *cpt1b*, *cpt1c* et *cpt1d*) ainsi que la 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (*hoad*) pour la β -oxydation des acides gras à longue chaîne. Les transcrits dont les expressions ont été quantifiées dans le foie des alevins challengés sont les élongases 2 et 5 (*elovl2* et *elovl5*) et la $\Delta 6$ -désaturase (*fads2*) pour la biosynthèse des acides gras à longue chaîne ; la 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl-CoA synthase (*hmgcS*), la 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl-CoA réductase (*hmgcR*), la cholestérol 7 alpha-hydroxylase a (*cyp7a*), la lanostérol 14- α -déméthylase (*cyp51a*), la 7-déhydrocholestérol synthase (*dhcr7*), l'ATP-binding transporter cassette A1 (*abca1*), l'ATP-binding cassette sub-family G member 5 (*abcg5*) et l'ATP-binding cassette sub-family G member 8 (*abcg8*) pour le métabolisme du cholestérol ; l'ATP citrate synthase (*acly1*) et l'acide gras synthase (*fasn*) pour la lipogenèse ; la glucose 6-phosphate déshydrogénase (*g6pdh*) pour le métabolisme des pentoses phosphates (**Tableau 13**).

Les amplifications ont été effectuées sur des mélanges comportant 2 μ l d'échantillon d'ADNc dilué au 76^{ème}, 0,24 μ l de chaque amorce, 3 μ l de Light Cycler 480SY SYBR® Green Master (Roche diagnostics) et 0,52 μ l d'eau stérile Nuclease-free Water PROMEGA P1195. Chaque qPCR a été effectuée pour les produits de retrotranscription, les blancs (blanc RT, blanc ADN et blanc PCR) et les points de gamme (gamme étalon réalisée à partir d'un pool d'ADNc issus des produits de RT) répliqués sur une plaque PCR semi-jupée Dutscher 4TI-0381. Le programme de PCR a été initié à 95°C pendant 10 minutes afin de dénaturer l'ADNc et d'activer l'enzyme TAQ polymérase dans un thermocycler Lightcycler® 480 II Roche. L'initiation a été suivie de 45 cycles d'amplification composés chacun de deux étapes thermiques successives (10 secondes à 60°C ; 15 secondes à 72°C). Les courbes de fusion ont été programmées à la fin de chaque cycle d'amplification (1,1°C·10 s⁻¹ de 65°C à 97°C) afin de confirmer la spécificité de la réaction. Les résultats obtenus en fin de PCR ont été traités avec le logiciel LightCycler® 480 SW 1.5 (Roche Diagnostics, Neuilly sur Seine, France) et ont été exprimés en valeurs de cycle seuil de fluorescence (*C_p*) et en concentrations d'ADN selon la méthode E du logiciel (version SW 1,5 ; Roche Diagnostics). La normalisation des gènes a été effectuée avec le facteur d'élongation 1 α (*EF1 α*) ou la luciférase (*LUCIFERASE*). L'efficacité *E* de la PCR a été vérifiée pour chaque gène étudié en calculant la pente de la droite standard (1,85 < *E* < 2) et les produits de RT ont été vérifiés par le calcul des écarts Δ RT entre les duplicas de valeurs de *C_p* (Δ RT \leq |-1|).

Tableau 13. Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR

	Gènes	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
Muscle	<i>ef1a</i>	TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG	ACCCGAGGGACATCCTGTG
	<i>cpt1a</i>	TCGATTTTCAAGGGTCTTCG	CACAACGATCAGCAAACCTGG
	<i>cpt1b</i>	CCCTAAGCAAAAAGGGTCT	CATGATGTCACCTCCGACAG
	<i>cpt1c</i>	CGCTTCAAGAATGGGGTGAT	CAACCACCTGCTGTTTCTCA
	<i>cpt1d</i>	CCGTTCCCTAACAGAGGTGCT	ACACTCCGTAGCCATCGTCT
	<i>hoad</i>	GGACAAAGTGGCACCAGCAC	GGGACGGGGTTGAAGAAGTG
Foie	<i>luciférase</i>	CTGGAGAAGCCTGCCAGCTA	CCATGTGACCAGCTTGACGA
	<i>elovl2</i>	TGTGGTTTCCCGTTGGATGCC	ACAGAGTGGCCATTTGGGCG
	<i>elovl4</i>	AGGATAGCGTCTGCTCTGTG	GGAATTTCTGGATCTTGGGT
	<i>elovl5</i>	GAACAGCTTCATCCATGTCC	TGACTGCACATATCGTCTGG
	<i>hmgcs</i>	AGTGGCAAAGAGAGGGTGTG	TTCTGGTTGGAGACGAGGAG
	<i>hmgcr</i>	GAACGGTGAATGTGCTGTGT	GACCATTTGGGAGCTTGTGT
	<i>fads2</i>	AGGGTGCCTCTGCTAACTGG	TGGTGTGGGTGATGGTAGGG
	<i>fasn</i>	TGATCTGAAGGCCCGTGTCA	GGGTGACGTTGCCGTGGTAT
	<i>cyp7a</i>	ACGTCCGAGTGGCTAAAGAG	GGTCAAAGTGGAGCATCTGG
	<i>cyp51a</i>	CCCGTTGTCAGCTTTACCA	GCATTGAGATCTTCGTTCTTGC
	<i>abca1</i>	CAGGAAAGACGAGCACCTT	TCTGCCACCTCACACACTTC
	<i>abcg5</i>	CACCGACATGGAGACAGAAA	GACAGATGGAAGGGGATGAA
	<i>abcg8</i>	GATACCAGGGTTCCAGAGCA	CCAGAAACAGAGGGACCAGA
	<i>dhcr7</i>	GTAACCCACCAGACCCAAGA	CCTCTCCTATGCAGCCAAAC
	<i>acly1</i>	GCTTTTGCCACGGTGGTCTC	GCTTCCGCTACGCCAATGTC

Annexe XIV - Activités enzymatiques et dosage des protéines hépatiques

Les activités des enzymes hépatiques FAS (acide gras synthase) et G6PDH (glucose-6-phosphate déshydrogénase) ont été mesurées sur microplaques par spectrophotométrie (spectrophotomètre SHIMADZU PharmaSpec UV-1700).

Les échantillons ont été broyés à raison de 200 mg de foie dans 7 volumes de tampon (0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl, 0,005 mol·l⁻¹ EDTA, 0,002 mol·l⁻¹ DTT, inhibiteur de protéase en tablette Sigma P2714, pH 7,4). Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 24000g durant 20 minutes à 4°C. Pour l'enzyme G6PDH, 20 µl de surnageants dilués au huitième ont été incubés pendant 10 minutes à 37°C avec 200 µl d'un mélange réactionnel à pH 7,8 composé de Tris-HCl (1 mol·l⁻¹), de MgCl₂ (0,2 mol·l⁻¹) et de NADP (0,01 mol·l⁻¹). A la fin de l'incubation, 20 µl de substrat (glucose-6-phosphate à 0,02 mmol·l⁻¹) ont été ajoutés aux échantillons. La cinétique d'apparition du NADPH a été suivie à 340 nm durant 10 minutes et l'activité totale de G6PDH a été calculée avec l'équation 31 et exprimée en mU·mg·min⁻¹. L'activité de l'enzyme FAS a été mesurée et calculée de manière analogue. Les 20 µl de dilués ont néanmoins été incubés avec 160 µl d'un mix spécifique de pH 7,8 contenant du K₂PO₄H (0,1 mol·l⁻¹), du NADPH (0,1 mmol·l⁻¹) et de l'acétyl-CoA (25 µmol·l⁻¹), et le substrat de la réaction était composé d'une solution de malonylCoA à 600 µmol·l⁻¹. Pour chaque échantillon, l'absorbance d'un blanc ne comportant pas de substrat a été mesurée. Afin de calculer l'activité spécifique de chaque enzyme (équation 32), les teneurs en protéines ont été déterminées

avec une gamme étalon d'albumine bovine selon la méthode de colorimétrie de Bradford (1976).

$$ACTIVITE\ TOTALE = \frac{(DO\ \varepsilon - DO\ B) \times V \times T \times F}{E \times d \times PE \times m \times qNADPH} \quad (31)$$

$$ACTIVITE\ SPECIFIQUE = \frac{ACTIVITE\ TOTALE}{qPROTEINES} \quad (32)$$

Avec $DO\ \varepsilon$: l'absorbance de l'échantillon en fonction du temps (en min^{-1}), $DO\ B$: l'absorbance du blanc en fonction du temps (en min^{-1}), V : le volume de l'essai dans la cuve (240 μl pour la G6PDH et 200 μl pour la FAS), T : la quantité totale de l'homogénat comprenant le tampon et l'échantillon (en milligrammes), F : le facteur de dilution de l'homogénat, E : le coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm ($6,2\ \text{ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), d : la longueur du trajet optique (0,7615 cm), PE : le volume du surnageant récupéré après centrifugation (200 μl), m : la masse de l'échantillon de foie (en milligrammes), $qNADPH$: le nombre de moles de NADPH produites au cours de la réaction (1 mole produite pour la G6PDH et 14 moles produites pour la FAS), $qPROTEINES$: la quantité de protéines mesurée dans l'échantillon par la méthode de Bradford (1976) (en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Annexe XV - Performances de reproduction des génitrices

Aucune différence statistiquement significative n'a été relevée pour les paramètres de croissance et les taux de survie des génitrices (**Annexe O**). Le nombre d'œufs produits par ponte, les taux d'œufs blancs 24 heures post-hydratation, les taux de survie à l'éclosion et les pourcentages de malformés étaient statistiquement identiques entre les 3 lots de femelles. A la ponte, le diamètre moyen des œufs issus des femelles nourries avec l'aliment VEG était cependant significativement plus faible (-9%, $p < 0,01$) comparé à celui des œufs issus des femelles nourries avec l'aliment VEG+DHA (**Tableau 14**).

Tableau 14. Performances de reproduction des génitrices après 25 semaines d'alimentation.

Régimes	COM		VEG		VEG+DHA		Significativité
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Reproduction							
Nombre d'œufs par ponte	6464	2906	6735	1391	5961	937	ns
Taux d'œufs blancs ¹ (%)	21,1	9,84	12,6	10,3	11,1	7,03	ns
Diamètre des œufs (mm)	4,26^{ab}	0,17	4,03^b	0,14	4,41^a	0,06	**
Survie à l'éclosion (%)	75,0	10,1	48,9	25,2	82,4	10,0	ns
Taux de malformés (%)	3,63	1,70	13,1	12,5	4,98	2,46	ns

COM, aliment commercial Le Guessant ; VEG, aliment végétal ; VEG+DHA, aliment végétal supplémenté en DHA. Les données sont représentées par la moyenne $\bar{x} \pm$ l'erreur standard SD avec $n=4$ femelles par régime. Les degrés de significativité sont indiqués par des astérisques (** $P < 0,01$; ns : non significatif) et ont été estimés par un test ANOVA ou un test de Kruskal-Wallis. ^{a, ab, b} Les différences significatives sont indiquées par des lettres.

	<p>Diplôme : Master Sciences Biologiques Marines</p> <p>Spécialité : Sciences Halieutiques et Aquacoles</p> <p>Spécialisation / option : Aquaculture</p> <p>Enseignant référent : Hervé LE BRIS</p>
<p>Auteur : Laura FROHN Date de naissance : 07/08/1996</p>	<p>Organisme d'accueil : INRA – Nutrition Métabolisme et Aquaculture</p>
<p>Nb pages : 35 Annexes : 15</p>	<p>Adresse : AQUAPOLE, Quartier Ibaron, 64310 Saint Pée sur Nivelle</p>
<p>Année de soutenance : 2019</p>	<p>Maître de stage : Sandrine SKIBA</p>
<p>Titre français : Alimentation végétale supplémentée en DHA d'origine micro-algale au cours du cycle de reproduction de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) : conséquences métaboliques chez les descendants.</p>	
<p>Titre anglais : Plant-based diet supplemented with microalgae DHA during the reproductive cycle of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>): metabolic consequences on progenies.</p>	
<p>Résumé. La formulation des aliments aquacoles a fortement évolué afin d'inclure une part de plus en plus importante de matières premières végétales. La substitution de l'huile de poissons par des huiles végétales réduit néanmoins l'apport en acides gras oméga 3 à longue chaîne tel que le DHA. C'est pourquoi, durant les 25 semaines précédant la reproduction, trois lots de truites femelles ont été nourries avec un aliment végétal supplémenté ou non en DHA d'origine micro-algale, ou avec un aliment commercial riche en huiles et en farines de poisson. Basée sur le concept de programmation nutritionnelle, cette étude a évalué les capacités métaboliques de descendants de truites arc-en-ciel en lien avec l'alimentation de leurs génitrices. Les effets sur la descendance ont été étudiés suite à 12 semaines de challenge alimentaire végétal supplémenté en DHA micro-algale. Bien que la croissance des juvéniles n'ait pas été affectée, des différences - liées à la nutrition parentale – en termes d'efficacité alimentaire, de composition corporelle, de biochimie plasmatique et d'expression de certains gènes-clés impliqués dans les métabolismes du cholestérol, de la lipogenèse et de la biosynthèse de acides gras à longue chaîne ont été relevées. Nos résultats confirment l'existence d'une programmation au niveau du métabolisme des lipides chez la truite arc-en-ciel, en lien avec l'alimentation maternelle.</p>	
<p>Abstract. Aquaculture feeds have significantly evolved towards inclusion of a significant proportion of plant raw materials. Nevertheless, the replacement of fish oil with vegetable oils reduces the availability of long-chain omega 3 fatty acids such as DHA. During the 25 weeks preceding reproduction, 3 groups of females were fed with, either plant-based diet supplemented, or not, with DHA from micro-algal origin, or with a commercial feed rich in fish oil and fishmeal. Based on the nutritional programming concept, this study assessed the metabolic abilities of rainbow trout progenies in relation to the broodstock nutrition. Effects on offspring have been studied after being fed 12 weeks with a plant-based diet supplemented with micro-algal DHA. Although juvenile growth performances have not been affected, differences in feed efficiencies, body compositions, plasma metabolites and expression of some key genes involved in cholesterol metabolism, lipogenesis and long-chain fatty acid biosynthesis were observed. Our results confirm the concept of metabolic programming, linked to maternal nutrition.</p>	
<p>Mots-clefs : truite arc-en-ciel, nutrition, programmation nutritionnelle, DHA, métabolisme lipidique Keywords : rainbow trout, nutrition, nutritional programming, DHA, lipid metabolism</p>	