



HAL
open science

Vers l'identification des fonctions impliquées dans les capacités de différents génotypes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à survivre et grandir avec un aliment uniquement à base de végétaux.

Thérèse Callet

► **To cite this version:**

Thérèse Callet. Vers l'identification des fonctions impliquées dans les capacités de différents génotypes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à survivre et grandir avec un aliment uniquement à base de végétaux.. Zootechnie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA001 . tel-02042858

HAL Id: tel-02042858

<https://theses.hal.science/tel-02042858>

Submitted on 20 Feb 2019

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

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

Vers l'identification des fonctions impliquées dans les capacités de différents génotypes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à survivre et grandir avec un aliment uniquement à base de végétaux

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech
(Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie,
environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Sciences agronomiques

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 22 Janvier 2018, par

Thérèse Callet

Composition du Jury :

Xavier Rognon Professeur, AgroParisTech	Président du jury
Luisa Valente Professeur, Université de Porto	Rapporteur
Hélène Gilbert Directrice de recherche, INRA (GenPhySE)	Rapporteur
Catherine Mariojous Professeur, AgroParisTech	Examinatrice
Hugues de Verdal Chercheur, CIRAD (ISEM)	Examineur
Mathilde Dupont-Nivet Directrice de recherche, INRA (GABI)	Directrice de thèse
Françoise Médale Directrice de recherche, INRA (NuMéA)	Co-directrice de thèse

Crédit photo : Mathilde Dupont-Nivet

Template L^AT_EX : inspiré de The Legrand Orange Book



Remerciements

Et voilà, ces trois années de thèse arrivent à leurs fins (elles sont passées à une vitesse folle soit dit en passant). Enfin presque, puisqu'il ne me reste plus que ces quelques lignes à écrire pour remercier toutes les personnes m'ayant aidé, de près ou de loin, tout au long de cette aventure qu'a été la thèse... Et finalement, cette dernière page n'est pas la plus simple à écrire. Vous êtes tellement nombreux à avoir contribué à ce projet et il n'est pas si facile de trouver les mots.

Bien évidemment, je souhaite tout d'abord remercier mes deux directrices de thèse, Françoise Médale et Mathilde Dupont-Nivet. Merci pour m'avoir accompagné pendant ces trois années, tout en me laissant la liberté dont j'avais besoin pour avancer. Merci pour vos conseils avisés, votre soutien et surtout votre patience. Vous m'avez énormément appris sur le plan scientifique mais pas seulement.

Merci à Sandrine Skiba-Cassy pour m'avoir accueilli au sein de Numéa, ainsi que tous les membres de l'unité avec qui j'ai eu la chance de travailler ou de discuter. Merci à Inge, Christine, Stéphane, Lucie, Sarah, Anne, Peyo, Laurence pour votre écoute et l'aide que vous m'avez apportée. Un très grand merci également à Marianne ! Merci pour tous les coups de main lors de ma pérégrination dans le monde de la biologie moléculaire, pour tes conseils magiques, mais aussi pour le soutien nutritionnel que tu m'as apporté avec notamment de délicieuses chouquettes !

Merci à l'ensemble de l'équipe Genaqua : Edwige, Mathilde, Francine, Nico, Catherine, Céline, Florence, Patricia et Delphine ! C'est une petite famille que j'ai trouvé en arrivant à Jouy et quelle joie d'avoir pu partager cette année et demie avec vous !

Un merci tout particulier à Inge et Delphine, avec qui j'ai eu la chance de partager mes bureaux à St-Pée et à Jouy. J'ai adoré tous les moments du quotidien partagés ensemble !

Je voudrais ensuite remercier les différents collaborateurs avec qui j'ai pu travailler. Merci à tous les membres de l'équipe de la Peima pour avoir pris soin de mes truites tout au long des expérimentations ! Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour leurs remarques constructives. Merci à Aurélie LeCam pour son accueil lors de mes séjours au LPGP. Merci également aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

De nombreuses rencontres ont également ponctué ces trois années de thèse à St-Pée comme à Jouy ! Merci à vous tous, et tout particulièrement Viviana, Marion, Sarah, Colin, Elorri, Luis, Weiwei, Ikram, Alex, Severine, Mathieu, Gabriel, Clémence, Jonathan, Bastien, toute l'équipe DocJ, pour les moments partagés autour d'un café, d'une bière ou d'une pizza, à discuter de science (ou non) !

Je voudrais également faire quelques remerciements spéciaux... Le premier va tout d'abord à Viviana car tu as été comme une maman d'adoption quand j'ai débarqué au Pays Basque.

Le deuxième remerciement “spécial” va à l’UMT et tout particulièrement à ses membres fondateurs : Sarah, Elorri, Colin et Tux. Vous le savez déjà, mais cette thèse (et la vie à St-Pée-sur-Nivelle) n’aurait pas été pareille sans vous ! Le fait que je n’ai jamais réussi à vous emmener jusqu’au sémaphore ne change rien à cela (mais je ne perds pas espoir...)

(PS : Elorri, je suis tellement heureuse d’avoir partagé le même bateau que toi, même s’il était un peu bancal.

PS2 : Évidemment, je ne peux pas terminer ce second remerciement “spécial” sans quelques mots pour mon hôte. Alors un immense merci pour m’avoir hébergé mais aussi un immense merci pour tout le reste, Colin...).

Finalement, le troisième remerciement spécial s’adresse à Clémence, Mathieu et Gabriel ! Merci de m’avoir recueilli à mon arrivée à Jouy, merci pour toutes les pauses passées ensemble (souvent des gouffres) et les parties de Molky au soleil... enfin bref, tous ces super moments avec vous (en espérant d’autres à venir) !

Merci à Alexia, Jess, Oliv, Mélissa, Thib, Pau, Agathe, Marine, Fanny, Bruno et Annick, Cathy et Jean, Marie, Chacha, Constance, Estelle, tous mes beaux-frères adorés et toutes mes nièces et neveux chéris pour vos petits mots de réconfort et vos encouragements tout au long de l’aventure, malgré la distance géographique ! Merci aussi pour tous les moments passés ensemble qui m’ont fait tellement de bien et qui m’ont permis de penser à autres choses qu’à mes truites !

And last but not least... Merci à toi, Yann Callet Gallice (Tu sais déjà tout, pas besoin d’en rajouter...)



■ ■ ■ Sommaire

<i>Liste des figures</i>	vii
<i>Liste des tableaux</i>	ix
<i>Liste des abréviations</i>	xi
<i>Avant-propos</i>	1

1 Introduction et état de l'art

1	Aquaculture et aliments	5
1.1	La production aquacole	5
1.1.1	Les captures de pêche	5
1.1.2	L'aquaculture	7
1.2	L'alimentation des salmonidés	10
1.2.1	Les besoins nutritionnels des salmonidés	10
1.2.2	L'évolution des formules des aliments aquacoles	12
2	Les aliments végétaux	17
2.1	Les matières premières	17
2.1.1	Les sources protéiques	17
2.1.2	Les sources lipidiques	20
2.2	La survie et la croissance	21
2.2.1	Substitution des huiles de poissons (HP)	21
2.2.2	Substitution des farines de poissons (FP)	21
2.2.3	Substitution conjointe des HP et des FP	21
2.2.4	Substitution totale conjointe des HP et des FP	22
2.2.5	Substitution au cours des phases précoces	22
2.3	La consommation d'aliment	22
2.3.1	L'effet du remplacement des HP et des FP par des produits végétaux	23
2.4	Digestion et Absorption	24
2.5	Le métabolisme	25
2.5.1	Métabolisme azoté	26
2.5.2	Métabolisme lipidique	26
2.5.3	Métabolisme des glucides	31
2.6	L'immunité	33

3	La sélection en aquaculture	37
3.1	La sélection génétique	37
3.1.1	La sélection chez les espèces piscicoles	37
3.2	Sélection en aquaculture et aliments végétaux	41
3.2.1	Existence d'une variabilité génétique au sein des populations de truite	41
3.2.2	Existence d'une interaction génotype×environnement	43
3.2.3	Sélection sur la croissance, avec de l'aliment V	44
3.2.4	Les fonctions impliquées	47

2 Le travail de thèse

4	Problématique	53
5	Matériels et méthodes	55
5.1	Les aliments expérimentaux	55
5.1.1	Les aliments M et V	55
5.1.2	L'aliment commercial C	57
5.1.3	Les deux autres aliments alternatifs, T et V _{alt}	57
5.2	Le matériel animal	59
5.2.1	Les trois lignées isogéniques	59
5.2.2	Les lignées, témoin et sélectionnée	60
5.3	Les protocoles expérimentaux	61
5.3.1	Partie 1 : Les lignées isogéniques	61
5.3.2	Partie 2 : Les lignées, sélectionnée et témoin	66
5.3.3	Analyses statistiques	70

3 Résultats

6	Les lignées isogéniques, à 5 semaines	73
6.1	Résultats préliminaires avant la première alimentation	74
6.2	Publication scientifique	75
6.3	Discussion	99
6.3.1	Rôle majeur de la consommation d'aliment à court terme	101
6.3.2	Rôle mineur du métabolisme à court terme	101
6.3.3	Implication de l'immunité	103
6.3.4	Comparaison des données d'expression aux différents temps	103
7	Les lignées isogéniques, après 6 mois	105
7.1	Publication scientifique	106
7.2	Résultats complémentaires	131

7.3	Discussion	131
7.3.1	Des différences globales	132
7.3.2	Des différences liées au métabolisme lipidique	133
7.3.3	Des différences de croissances liées à l'immunité	133
8	La lignée sélectionnée	137
8.1	Publication scientifique	138
8.2	Résultats complémentaires	161
8.2.1	Seconde génération de sélection	161
8.2.2	Quatrième génération de sélection	163
8.3	Discussion	164
8.3.1	Effet des aliments V et d'autres aliments alternatifs	164
8.3.2	Efficacité de la sélection	166
8.3.3	Fonctions impliquées	169
9	La lignée sélectionnée : expression de gènes	171
9.1	Expression de gènes liés à la consommation d'aliment	171
9.2	Expression de gènes liés à différentes voies du métabolisme	172
9.3	Expression de gènes liés à l'immunité	174

4 Discussion générale

10	Discussion générale	177
10.1	Intérêts et limites	178
10.1.1	Deux aliments expérimentaux extrêmes	178
10.1.2	Deux types de lignées originales	178
10.1.3	Différents stades étudiés	179
10.1.4	Approches avec ou sans <i>a priori</i>	180
10.2	Diversité des mécanismes	181
10.2.1	Rôle clef de la consommation d'aliment	183
10.2.2	Le rôle mineur de la digestion	184
10.2.3	Le métabolisme	185
10.2.4	Le rôle de la composante immunitaire	189
11	Conclusion générale et perspectives	193

Références bibliographiques	216
------------------------------------	------------

Valorisations	217
----------------------	------------

Annexes	219
----------------	------------

■ ■ ■ Liste des figures

1.1	Évolution des captures de pêche depuis 1950	6
1.2	Évolution de la production aquacole depuis 1950	8
1.3	Production de TAC en Europe et en France de 1950 à aujourd'hui	8
1.4	Volumes de production de TAC en Europe	9
1.5	Évolution de la production d'HP et de FP	13
1.6	Évolution des prix d'HP et de FP	14
2.1	Vue d'ensemble du métabolisme lipidique	27
2.2	Vue d'ensemble du métabolisme des glucides	32
3.1	Interactions génétique × environnement	43
3.2	Sélection aliment V : récapitulatif des gains génétiques obtenus	46
5.1	Principe d'obtention des lignées isogéniques	59
5.2	Protocole expérimental (Lignées isogéniques)	62
5.3	Stratégie d'analyse du transcriptome	65
5.4	Protocole expérimental (Lignée sélectionnée et lignée témoin)	67
6.1	Résultat de l'analyse d'enrichissement de GO à J0	74
6.2	Profil d'expression des gènes de la perception (Lignées isogéniques, 5 sem)	101
6.3	Profil d'expression des gènes de l'immunité (Lignées isogéniques, 5 sem)	103
7.1	Analyse transcriptomique (Lignée isogénique, intestin, 6 mois)	131
7.2	Analyse DAVID (Lignée isogénique, intestin, 6 mois)	132
8.1	Seconde génération de sélection : Taux de survie et de croissance	160
8.2	Quatrième génération de sélection : Taux de survie et de croissance	162
8.3	Lignée sélectionnée : Variation des performances entre génération	165
8.4	Gains génétiques pour la survie	167
8.5	Gains génétiques pour la croissance	167
8.6	Gains génétiques obtenus en RS4	168
10.1	Récapitulatif des résultats concernant la consommation d'aliment	182
10.2	Récapitulatif des résultats liés au métabolisme glucidique	188
10.3	Récapitulatif des résultats concernant l'immunité	190

■ ■ ■ Liste des tableaux

1.1	Principaux acides gras	11
2.1	Valeurs nutritionnelles de différentes sources protéiques	18
2.2	Principaux facteurs anti-nutritionnels	19
2.3	Valeurs nutritionnelles de différentes sources lipidiques	20
2.4	Récapitulatif des signaux contrôlant la prise alimentaire	23
3.1	Récapitulatif de l'héritabilité de différents caractères	42
3.2	Récapitulatif des interactions génétique × aliment	44
5.1	Ingrédients et composition des différents aliments V et M	56
5.2	Ingrédients et composition de l'aliment T	58
5.3	Ingrédients et composition de l'aliment V _{alt}	58
6.1	Liste des gènes de la perception (Lignées isogéniques, 5 sem)	100
6.2	Liste de gènes de l'immunité (Lignées isogéniques, 5 sem)	102
7.1	Liste des gènes de l'immunité (Lignées isogéniques, 6 mois)	134
9.1	Gènes de la perception (Lignée sélectionnée)	172
9.2	Gènes liés à la prise alimentaire (Lignée sélectionnée)	172
9.3	Gènes du métabolisme (Lignée sélectionnée)	173
9.4	Gènes de l'immunité (Lignée sélectionnée)	174
Annexe i	Liste des amorces utilisées	219
Annexe ii	Résultat de l'analyse d'enrichissement de GO à J0	221
Annexe iii	Avant le premier repas : gènes liés à la production d'énergie	222
Annexe iv	Avant le premier repas : gènes du métabolisme des glucides	223
Annexe v	Avant le premier repas : gènes du métabolisme azoté	224
Annexe vi	Avant le premier repas : gènes de l'immunité	225
Annexe vii	Résultat de l'analyse d'enrichissement de GO à 5 semaines	228
Annexe viii	Résultat de l'analyse d'enrichissement de GO (Foie à 6 mois)	229
Annexe ix	Liste des gènes liés à la production d'énergie (Foie, 6 mois)	238
Annexe x	Liste des gènes liés à la synthèse des protéines (Foie, 6 mois)	240
Annexe xi	Liste des gènes liés au métabolisme azoté (Foie, 6 mois)	242
Annexe xii	Liste des gènes liés au métabolisme des glucides (Foie, 6 mois)	244
Annexe xiii	Liste des gènes liés au métabolisme des lipides (Foie, 6 mois)	244
Annexe xiv	Liste des gènes liés à l'immunité (Foie, 6 mois)	246
Annexe xv	Résultat de l'analyse d'enrichissement de GO (Intestin à 6 mois)	248
Annexe xvi	Taux de survie lors de la RS2	250
Annexe xvii	Poids moyens lors de la RS2	251
Annexe xviii	Taux de survie lors de la RS4	252
Annexe xix	Poids moyens lors de la RS4	253

■ ■ ■ Liste des abréviations

AA	Acide aminé
AAI	Acide aminé indispensable
AANI	Acide aminé non indispensable
ACAT	Acetyl-CoA acetyltransferase
ACO	Acyl-CoA oxidase
AG	Acide gras
AGE	Acide gras essentiel
AGPI	Acide gras poly-insaturé
AGPI-LC	Acide gras poly-insaturé longue chaîne
AgRP	Agouti-related peptide
ALA	Acide α -linoléique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ARA	Acide arachidonique
Aliment M	Aliment formulé à base de matières premières d'origine marine
Aliment V	Aliment formulé à base de matières premières d'origine végétale
BW	Poids corporel (Body Weight)
C3 (1, 3 ou 4)	Complément C3 (1, 3 ou 4)
CART	Cocaine-and amphetamine-regulated transcript
CDO 1	Cysteine Dioxygenase Type 1
CFB 1 ou 2	Complement factor B
CFH	Complement factor H
CFI	Complement factor I
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CP	Concentré protéique
CPT I ou II	Carnitine palmitoyltransferase I ou II
CR2	Complement receptor type 2
CRF	Corticotropin-releasing factor
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CSAD	Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase
CTH	Cystathionine γ -Lyase
CUD	Coefficient d'utilisation digestive
CYP51A1	Lanosterol 14-alpha demethylase
CYP7A1	Cytochrome P450 7A1
Δ 6 ou 9	Desaturase Δ 6 ou 9
BHMT (1 et 2)	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1 et 2
DFI	Prise alimentaire journalière (Daily Feed Intake)
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHCR24	24-Dehydrocholesterol Reductase
DI	Quantité totale digérée
dpf	Nombre de jours depuis la fécondation

EBP	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase
EF1	Elongation factor 1
ELOVL (2,5 ou 6) ...	Elongase (2,5 ou 6)
EPA	Acide eicosapentaénoïque
FABP	Fatty acid binding protein
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FAS	Acide gras synthase
FATP	Fatty acid transport protein
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase
FC	Fold change
FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
FE	Efficacité alimentaire (Feed Efficiency)
FIFO	Fish In/Fish Out
FP	Farine de poisson
Fr	Taux de substitution de la farine de poisson
FXR	Farnesoid X receptor
Gαq	G protein α q subunit
G6PC	Glucose-6-phosphatase
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
G6pcb2.a	Glucose-6-phosphatase 1 b2.a
GEO	Gene Expression Omnibus (Base de données d'expression)
GHRL	Ghrelin
GNAT3	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit α -3
GO	Ontologie de gène
GOT 1 ou 2	Aspartate aminotransferase
GRM8	Metabotropic glutamate receptor 8
GRP/Bbs	Gastrin releasing peptide receptor/Bombesin
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HK	Hexokinases
HMGCR	Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
HMGCS	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
HOAD	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
HP	Huile de poisson
Hr	Taux de substitution de l'huile de poisson
IGE	Interaction génotype \times environnement
LA	Acide linoléique
LCII	Lysozyme
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LECT2	Leukocyte cell-derived chemotaxin-2
LPL	Lipoprotéine lipase
LSS	Lanosterol synthase
LXR	Liver X receptor

Mat1	S-Adenosylmethionine Synthase Isoform Type-1
MCH	Melanin concentrating hormone
MR	Marin restreint
MS	Matière sèche
MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase
n-3	Oméga 3
n-6	Oméga 6
NFKBIA	NF-kappa-B inhibitor alpha
NI	Quantité totale ingérée
NPI	Nécrose pancréatique infectieuse
NPY	Neuropeptide Y
PAT	Protéine animale transformée
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PFK-1	Phosphofruktokinase-1
PK	Pyruvate kinase
POMC (A ou B)	Pro-opiomelanocortin (A ou B)
POP	Polluants Organiques Persistants
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PPY	Pancreatic polypeptide
PROSPER	PRocédure Optimisée de Sélection individuelle Par Épreuves Répétées
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2
QTL	Quantitative trait locus
RDH12	Retinol dehydrogenase 12
Rlbp1	Retinaldehyde-binding protein 1
RS 1, 2, 3 ou 4	Expérimentation de réponse à la sélection après X génération
SARDH	Sarcosine dehydrogenase
sem	Semaine
SHMT	Serine hydroxymethyltransferase
SNC	Système nerveux central
SNP	Polymorphisme nucléotidique (Single Nucleotide Polymorphism)
SP	Identifiants "Swiss-Prot"
SREBP	Sterol Element Binding Protein
SU	SUAVE (Lignée sélectionnée)
SY	Synthétique (Lignée témoin)
TAC	Truite arc-en-ciel
Tapbp	Tapasin
TD	Tube digestif
TM7SF2	Delta(14)-sterol reductase
ugt2a1	UDP-glucuronosyltransferase 2A1
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

■ ■ ■ Avant-propos

Ma thèse a été réalisée dans le cadre du projet ANR Agreenfish "Adaptations aux transitions alimentaires en aquaculture : les caractériser et les favoriser". Son ambition est de contribuer à rendre l'aquaculture plus durable en faisant évoluer les régimes alimentaires et la sélection génétique aquacole afin de limiter le recours à des matières premières issues de la pêche pour nourrir les poissons d'élevage. L'objectif est de comprendre pourquoi certains génotypes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) arrivent mieux que d'autres à survivre et à grandir lorsque leur alimentation est exclusivement à base de produits végétaux. Le projet, qui allie nutrition et génétique, repose sur des ressources génétiques originales obtenues dans le cadre d'une collaboration entre les Unités Mixtes de recherche (UMR) Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI, INRA Jouy-en-Josas), et Nutrition, Métabolisme, Aquaculture (NuMeA, INRA Saint-Pée-sur-Nivelle). Il s'agit de trois lignées isogéniques et d'une lignée qui a été sélectionnée par l'INRA pour optimiser l'utilisation de l'aliment végétal.

Le premier objectif de ma thèse était d'identifier de potentiels marqueurs moléculaires liés à la capacité des truites des trois lignées isogéniques à survivre et grandir avec un aliment 100% végétal grâce à des analyses transcriptomiques. Mon second objectif était de confirmer l'efficacité de la sélection après trois générations et d'identifier les mécanismes d'adaptation mis en place chez la lignée sélectionnée, en étudiant, à la fois, différents caractères liés à la nutrition et l'expression de gènes, précédemment trouvés grâce aux analyses transcriptomiques.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de bénéficier de différentes structures expérimentales et de recherche de l'INRA. Les essais d'alimentation avec les différents génotypes ont été réalisés à la Pisciculture expérimentale INRA des Monts d'Arrée (PEIMA, Sizun). J'ai organisé et réalisé, avec l'aide de chercheurs et techniciens, les campagnes de prélèvements pour collecter le matériel biologique nécessaire pour répondre à mes objectifs. J'ai passé la première moitié de ma thèse dans l'UMR NuMeA où j'ai appris à réaliser des mesures de digestibilité et des bilans nutritionnels, et acquis des compétences en biologie moléculaire (transcriptomiques et qPCR) et analyses de données. J'ai réalisé les hybridations de microarrays sur la plateforme transcriptomique du laboratoire de Génomique et Physiologie des Poissons (LPGP) de l'INRA de Rennes.

La seconde partie de ma thèse s'est déroulée à l'INRA de Jouy-en-Josas dans l'équipe GenAqua de l'UMR GABI, où je me suis concentrée sur le second objectif de ma thèse. J'ai ainsi travaillé sur les différentes données obtenues chez les truites issues de la troisième génération de sélection. Afin de compléter les résultats, j'ai également eu l'opportunité d'analyser des données zootechniques issus de la seconde et quatrième générations de sélection.

Après une introduction présentant le contexte général et l'état des connaissances sur la nutrition et la sélection génétique des Salmonidés, les résultats de mes travaux sont présentés sous la forme de trois publications scientifiques complétées de résultats supplémentaires. Les caractéristiques trouvées pour les différents types de lignées étudiés sont confrontées dans la discussion générale de ce manuscrit.

1

Introduction et état de l'art

1	Aquaculture et aliments	5
1.1	La production aquacole	
1.2	L'alimentation des salmonidés	
2	Les aliments végétaux	17
2.1	Les matières premières	
2.2	La survie et la croissance	
2.3	La consommation d'aliment	
2.4	Digestion et Absorption	
2.5	Le métabolisme	
2.6	L'immunité	
3	La sélection en aquaculture	37
3.1	La sélection génétique	
3.2	Sélection en aquaculture et aliments végétaux	



1 Le développement de l'aquaculture et l'évolution des aliments aquacoles

La demande de poissons pour la consommation humaine n'a cessé de croître depuis les années 1970. D'une part, la consommation moyenne de poisson *per capita* a progressé dans différentes régions du monde, et alors que nous consommons en moyenne 9,9 kg de poisson par an et par habitant en 1960, nous en consommons aujourd'hui plus de 20 kg (soit 146 648 milliers de tonnes entre 2013 et 2015) (FAO, 2016). D'autre part, cette augmentation de la consommation moyenne de poissons par habitant est accompagnée de l'accroissement de la population mondiale (Department of Economic and Social Affairs of the United Nations, 2013). Les deux sources de production de poissons pour la consommation humaine, la pêche et l'aquaculture, ont évolué de façon importante ces dernières années afin de répondre à l'augmentation de la demande, tout en préservant les stocks naturels.

1.1 La production aquacole, d'hier à aujourd'hui

1.1.1 Les captures de pêche stabilisées depuis 30 ans

Parmi les captures de pêche, il faut distinguer celles destinées à la consommation humaine et la pêche minotière qui correspond aux captures de pêche de petits poissons pélagiques destinés à la production d'huile et de farine de poisson (HP et FP) (Encart 1.1).

La pêche a longtemps représenté la principale source de poissons destinés à la consommation humaine. En 1950, 95% des poissons consommés provenaient des captures de la pêche. Mais alors qu'on pensait que les océans représentaient une réserve inépuisable de poissons, la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) estimait que 50% des stocks de pêche étaient exploités à leur maximum et 10% sur-exploités en 1974 (Grainger et Garcia, 1996). L'instauration de quotas de pêche, afin de gérer les stocks de poissons et de limiter leur sur-exploitation, a bouleversé la pêche maritime à la fin du XX^e siècle.

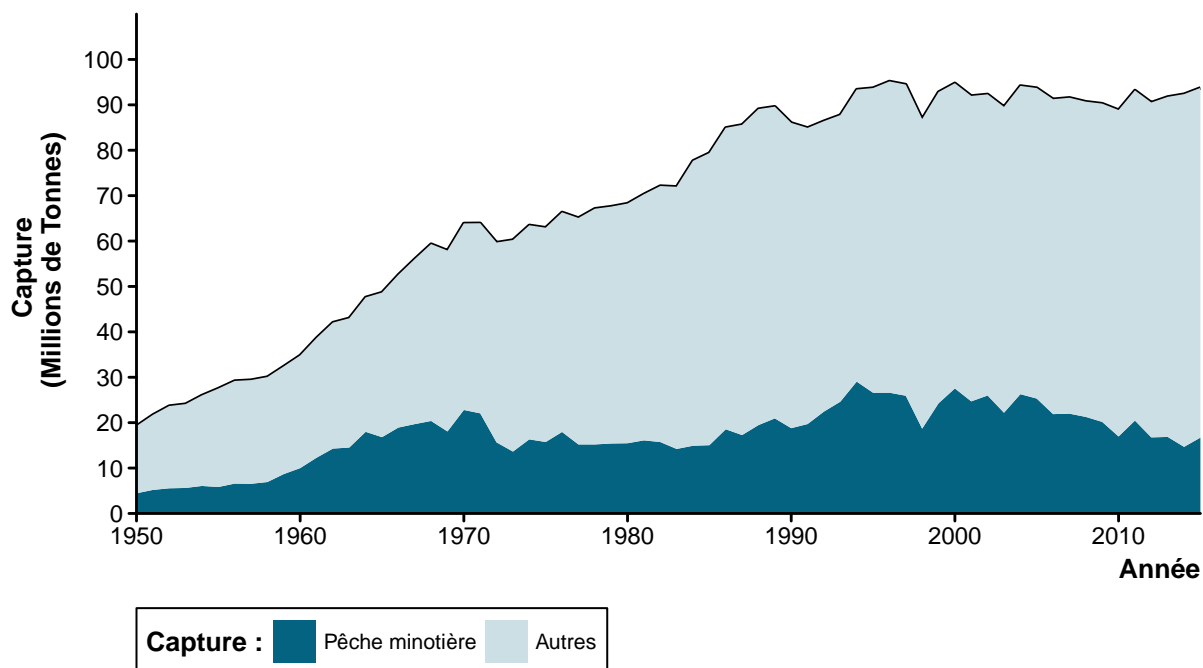


FIGURE 1.1 – Évolution des captures de pêche, notamment de la pêche minotière de 1950 à aujourd’hui (Données FAO, FishStatJ, version 3.03.2).

Encart 1.1: La pêche minotière et la production d’HP et de FP

La pêche minotière correspond à une pêche, industrielle et intensive, d’espèces fourragères (espèces de poissons pélagiques de petite/moyenne taille) destinées à la production d’huile (HP) et farine de poisson (FP). À l’échelle mondiale, les principales espèces ciblées par la pêche minotière sont les anchois du Pérou et du Chili (*Engraulis ringens*), le chinchard du Chili (*Trachurus murphyi*), la sardine (*Clupea bentincki*) et le menhaden (*Brevoortia patronus*). En Europe, ce sont principalement les lançons (*Ammodytes tobianus*), le sprat (*Sprattus sprattus*), le hareng (*Clupea harengus*), le capelan (*Mallotus villosus*), le tacaud (*Trisopterus esmarkii*) ou encore le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) qui sont pêchés.

Les principaux producteurs se trouvent en Amérique du Sud, avec le Pérou et le Chili qui restent les exportateurs les plus importants (25% des HP et des FP mondiale en 2015) (Seafish, 2016).

Production des HP et des FP : Les poissons issus de la pêche minotière, auxquels s’ajoutent aujourd’hui des restes de la transformation des poissons pour la consommation humaine, sont transformés en HP et en FP. Les poissons sont d’abord cuits afin de coaguler les protéines et d’extraire l’eau et l’huile. Une étape de pressage est ensuite réalisée pour séparer les différentes phases obtenues. L’HP est extraite *via* une étape de décantation et/ou de centrifugation. Les FP, co-produits de l’extraction de l’huile, sont obtenues après une étape de séchage puis de broyage afin d’obtenir une poudre. Les rendements dépendent des poissons utilisés mais s’établissent en moyenne autour de 20% pour la farine et de 8% pour l’huile en fonction de la teneur en protéine et lipide des poissons.

Les captures pour la consommation humaine

Selon la FAO, les captures de pêche pour la consommation humaine qui avaient augmenté jusque dans les années 1990 où 67 millions de tonnes de poissons avaient été capturés (hors pêche minotière), se seraient ensuite stabilisées (FAO, 2016). Vingt ans plus tard, les captures auraient légèrement ré-augmenté et un nouveau pic aurait été atteint avec 78,4 millions de tonnes de poissons pêchés en 2014 (FAO, 2016) (Figure 1.1).

Les données de la FAO sont, cependant, basées sur des déclarations volontaires. En ré-estimant ces données, le projet "Sea Around Us" estime que les captures de pêche au niveau mondial seraient nettement supérieures. Elles auraient connu un pic en 1996 avec 106 millions de tonnes de poissons capturés (hors pêche minotière), puis auraient diminué tous les ans pour atteindre aujourd'hui 95 millions de tonnes (Pauly et Zeller, 2016).

Bien que les données des captures de pêche varient en fonction des auteurs (FAO, Projet "Sea Around Us"), elles n'ont plus été suffisantes pour couvrir les besoins pour la consommation humaine depuis le milieu du XX^e siècle.

La pêche minotière

Comme pour le reste de la pêche, l'apparition de quotas a bouleversé l'évolution des captures de la pêche minotière. Les captures qui avaient augmenté de 2 millions de tonnes en 1950 à plus de 22 millions de tonnes en 1970, ont par la suite connu une relative stagnation. Depuis, la production de la pêche minotière oscille entre 20 et 30 millions de tonnes (Tacon *et al.*, 2011; Sea around us, 2016) (Figure 1.1).

1.1.2 L'aquaculture en forte expansion depuis les années 1950

Le terme "aquaculture" est un terme générique, qui regroupe une grande diversité de systèmes d'élevage, d'espèces différentes (plantes aquatiques, mollusques, crustacés ou poissons) produites dans des environnements variés (eau douce, eau de mer, eau saumâtre).

L'aquaculture est la seconde source d'approvisionnement en poissons pour la consommation humaine. Bien que son origine précise reste incertaine, elle serait apparue dans différentes régions du monde comme en Chine, quatre millénaires avant J.C. avec l'élevage de la carpe, en Égypte deux millénaires avant J.C. avec l'élevage du tilapia, ou encore à Hawaii (Rabanal, 1988; Stickney et Treece, 2012). Au fil des siècles, l'élevage des poissons s'est répandu à travers le monde, mais les pratiques d'élevage sont longtemps restées très rudimentaires, car la reproduction et l'alimentation des poissons étaient mal maîtrisées (Rabanal, 1988; Stickney et Treece, 2012). Pour ces raisons, la production aquacole est longtemps restée anecdotique en comparaison des captures de pêche. Dans les années 1950, la production piscicole représentait moins de 5% des poissons consommés (Source FishStatJ, version 3.03.2).

Ce n'est qu'au milieu du XX^e siècle que les pratiques de l'aquaculture se sont rationalisées avec l'amélioration des connaissances scientifiques, notamment en nutrition. La production totale de l'aquaculture (poissons, crustacés, algues) a atteint 106,0 millions de tonnes en 2015 (Source FishStatJ, version 3.03.2). Sur la période 2005-2014, la production aquacole a augmenté

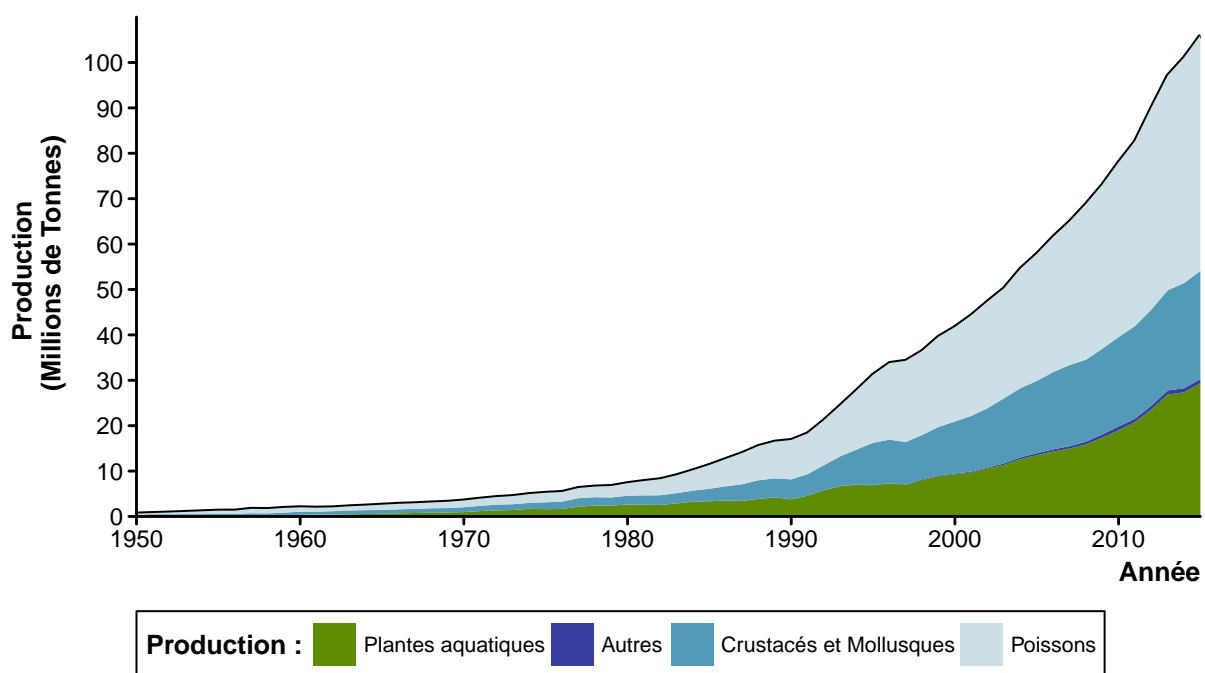


FIGURE 1.2 – Évolution de la production des différents secteurs de l’aquaculture (Données FAO, FishStatJ, version 3.03.2).

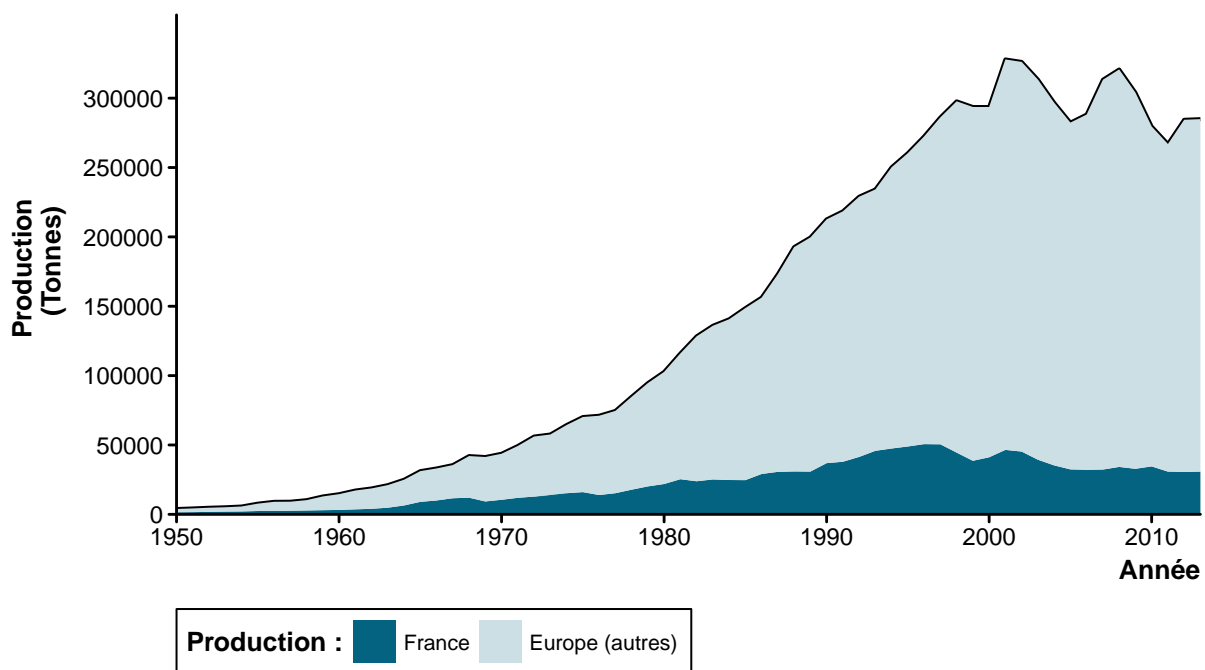


FIGURE 1.3 – Production de TAC en Europe et en France de 1950 à aujourd’hui (Source FishStatJ, version 3.03.2).

de 5,8% par an et représente le secteur agroalimentaire en plus forte progression actuellement dans le monde. Ce développement de l'aquaculture a ainsi permis de répondre à la demande en poissons pour la consommation humaine, mais également de diversifier l'offre de poissons. Aujourd'hui, plus de 580 espèces de poissons sont produites grâce à l'aquaculture à travers le monde, soit une énorme diversité en comparaison des espèces terrestres classiquement élevées. En considérant les poissons seulement, alors que la production atteignait 2,7 millions de tonnes en 1980, aujourd'hui 51,9 millions de tonnes sont issues de l'aquaculture (Figure 1.2). L'année 2014 restera une date clef puisque à partir de cette date, la moitié des poissons consommés dans le monde est issue de l'aquaculture (FAO, 2016).

Des disparités existent cependant entre les différentes régions du monde. Alors, qu'en Chine, plus de 80% des poissons consommés sont issus de l'aquaculture, la majorité des poissons consommés en France est issue de la pêche (Thon et Colin d'Alaska). L'aquaculture joue tout de même un rôle important avec notamment la production de truite arc-en-ciel (TAC) dont la consommation ne cesse d'augmenter (France Agrimer, 2016).

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) :

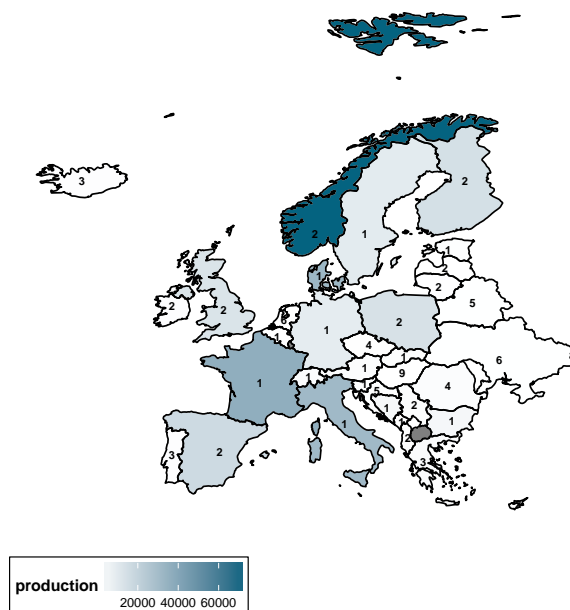


FIGURE 1.4 – Volumes de production (en tonnes) de TAC dans les différents pays Européens, avec le rang national de la production de TAC pour chaque pays (Source FishStatJ, version 3.03.2).

après le saumon. En France, c'est le poisson le plus élevé avec 36 500 tonnes produites en 2015 (Figure 1.4, Source FishStatJ, version 3.03.2).

La truite arc-en-ciel (TAC) fait partie de l'ordre des salmonidés (*Salmonidae*). Ce poisson, originaire des lacs et rivières de la côte ouest des Etats-Unis, a été importé en Europe à la fin du XIX^e siècle pour l'élevage, en raison de sa croissance rapide, de sa grande robustesse et de son importante plasticité vis-à-vis des conditions environnementales (Jalabert et Fostier, 2010). Dans son milieu naturel, ce poisson de haut niveau trophique se nourrit principalement d'insectes, de mollusques, de crustacés, d'œufs de poissons ou d'autres petits poissons.

Comme pour d'autres espèces de poissons, la TAC a connu un succès grandissant en aquaculture et sa production s'est fortement développée à partir des années 1960 en France et en Europe (Figure 1.3). Aujourd'hui, elle est le deuxième poisson le plus produit sur le continent (290 650 tonnes en 2015),

1.2 L'alimentation des salmonidés en aquaculture

1.2.1 Les besoins nutritionnels des salmonidés

Les protéines et leurs constituants, les acides aminés (AA), assurent de nombreux rôles dans l'organisme : rôle structural (formation des muscles et tissus), rôle dans la catalyse des réactions métaboliques (enzymes), rôle dans la signalisation et dans la régulation de l'expression des gènes. Parmi les AA, on distingue les acides aminés non indispensables (AANI) qui peuvent être synthétisés à partir de leurs précurseurs, des acides aminés indispensables (AAI) qui doivent être apportés par l'aliment car l'organisme n'est pas capable de les synthétiser.

Le pool d'AA libres est en équilibre constant entre leur synthèse *de novo*, par des réactions d'interconversion, la synthèse de protéines corporelles, la synthèse de différents composés azotés (hormone, neurotransmetteurs, ...) et leur catabolisme. Chez les poissons, plus de la moitié des AA absorbés (25 à 55%) est déposée sous forme de protéines et participe ainsi à leur croissance. Mais, contrairement aux autres vertébrés, chez les poissons, une part non négligeable des AA est catabolisée pour produire de l'énergie (Guillaume, 2001).

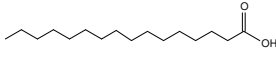
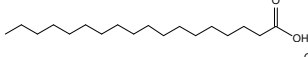
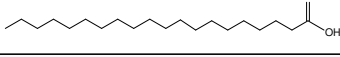
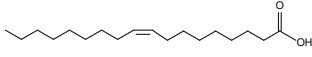
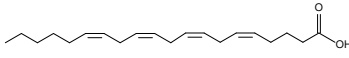

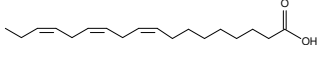
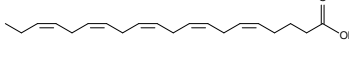
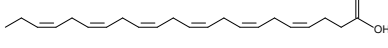
→ **Besoins protéiques** : Chez les salmonidés, les protéines apportées par l'aliment doivent donc couvrir à la fois les besoins azotés ainsi qu'une partie des besoins énergétiques. Les régimes doivent contenir entre 38 et 40 % de protéines digestibles, quantité bien supérieure à ce qui est nécessaire chez les autres vertébrés. Pour assurer une synthèse protéique optimale, l'aliment doit également comprendre les dix AAI et le profil en AA doit être équilibré entre AANI et AAI (Green et Hardy, 2002; NRC, 2011).

Les lipides peuvent être subdivisés en deux classes : les lipides simples qui ne contiennent pas d'acide gras (ex : cholestérol) ; et les lipides complexes qui contiennent un ou plusieurs acides gras (AG). Les AG sont classifiés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée et de la présence ou non de doubles liaisons dans cette chaîne. Ainsi, on distingue des AG saturés (sans double liaison), mono-insaturés (avec une double liaison) et poly-insaturés (avec plusieurs doubles liaisons), de la série n-9, n-6 ou n-3, en fonction de la position de la première double liaison (détails dans le tableau 1.1).

Les AG sont des pourvoyeurs d'énergie importants chez les poissons et sont dégradés *via* la β -oxydation (37 kJ/g). Les AG peuvent également être incorporés dans des triglycérides (lipides non polaires, trois molécules d'AG estérifiées avec une molécule de glycérol) qui jouent un rôle de stockage de l'énergie. Les AG incorporés dans les phospholipides (lipides polaires, formé d'une molécule de glycérol liée à deux AG et à un groupement phosphate) jouent des rôles essentiels dans la structure des membranes cellulaires et influencent ainsi leurs propriétés. Les AG jouent également des rôles de signalisation et permettent de réguler différentes voies du métabolisme. Finalement, les AG longs polyinsaturés (AGPI-LC) l'ARA (n-6), l'EPA et le DHA (n-3) sont précurseurs des eicosanoïdes, molécules essentielles dans la régulation de la réponse immunitaire.

Le cholestérol joue un rôle dans la structure des membranes cellulaires, mais il est également précurseur d'hormones stéroïdiennes et des acides biliaires.

Tableau 1.1 – Principaux acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés.

Nom d'usage		Structure
Acides gras saturés		
C16 :00	Acide palmitique	
C18 :0	Acide stéarique	
C20 :0	Acide arachidique	
Acides gras mono-insaturés		
C18 :1 n-9	Acide oléique	
Acides gras poly-insaturés longue chaîne (AGPI-LC)		
AGPI-LC n-6		
18 :2 n-6	Acide linoléique (LA)	
20 :4 n-6	Acide arachidonique (ARA)	
AGPI-LC n-3		
18 :3 n-3	Acide α-linolénique (ALA)	
20 :5 n-3	Acide eicosapentaénoïque (EPA)	
22 :6 n-3	Acide docosahexaénoïque (DHA)	

→ **Besoins lipidiques** : Les besoins en lipides des salmonidés varient en fonction du stade de vie et de la quantité de protéines et de glucides apportés par les aliments, qui peuvent eux-mêmes être utilisés comme sources d'énergie. Ils sont incorporés à hauteur de 28 à 35% dans les régimes. Outre l'apport d'énergie digestible, les lipides alimentaires doivent fournir un certain nombre d'AG, dits essentiels (AGE) car non synthétisés *de novo*. Chez la TAC, les AGE sont des AGPI-LC n-3 et n-6 : l'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) et l'acide α-linolénique (ALA, C18 :3 n-3). L'EPA, le DHA et l'ARA sont, eux, conditionnellement essentiels, car à l'inverse des poissons marins, la TAC est capable de synthétiser ces trois AG à partir de l'ALA et de LA. Leur apport par l'aliment est cependant plus efficace pour des croissances optimales. Le cholestérol n'est pas considéré comme un nutriment essentiel chez les salmonidés qui, comme les autres vertébrés, ont la capacité de le synthétiser *de novo* à partir de l'acétate.

Les glucides regroupent les sucres simples (mono ou disaccharides), les oligosaccharides (3 à 9 monosaccharides) et les polysaccharides. Parmi ces derniers, on peut distinguer l'amidon des polysaccharides non amylacés.

Dans leur milieu naturel, le régime des salmonidés est généralement pauvre en glucides, qui, à l'inverse des lipides et des protéines, sont peu utilisés comme sources énergétiques. Les TAC sont des utilisatrices peu efficaces des glucides. La capacité de digestion de l'amidon par les TAC est en effet limitée, en raison de la faible activité de l'α-amylase (Bergot et Breque, 1983). L'activité de l'α-amylase dépend cependant de plusieurs facteurs comme l'origine et la quantité d'amidon du régime, sa structure et notamment son degré de gélatinisation. Les processus de cuisson et d'extrusion qui modifient la structure de l'amidon permettent d'améliorer sa digestibilité.

En outre, le taux de glucose plasmatique augmente avec la teneur en glucide digestible du

Chapitre 1. Aquaculture et aliments

régime, jusqu'à une hyperglycémie postprandiale lorsque la teneur en amidon dépasse 20%. Les polysaccharides non amylacés ne sont pas digérés par les poissons, comme c'est le cas chez les autres monogastriques.

→ **Besoins glucidiques** : Aucun besoin en glucides n'a été identifié car les salmonidés sont capables de néosynthétiser le glucose à partir d'AA et de lipides.

Le régime doit également fournir des minéraux et des vitamines essentiels. Ils sont généralement apportés dans les aliments *via* l'ajout de mélanges de minéraux et de vitamines. Les besoins ont été établis à partir de régimes riches en matières premières d'origine marine et ils devront être réévalués dans le cadre des nouveaux aliments limitant le recours à ces ressources (Antony Jesu Prabhu *et al.*, 2016).

1.2.2 L'évolution des formules des aliments aquacoles

L'alimentation joue un rôle clef dans l'élevage, aussi bien pour des raisons environnementales que pour des raisons économiques car elle représente entre 60 et 80 % du coût final de production. Dans le but d'améliorer les performances zootechniques et la qualité nutritionnelle et organoleptique des poissons, tout en diminuant l'impact environnemental de l'élevage et en optimisant les coûts de production, les formules alimentaires aquacoles ont énormément évolué au fil du temps. Plusieurs étapes clefs ont permis d'aboutir à l'aliment utilisé aujourd'hui par les éleveurs.

Du début du XX^e siècle aux années 1990

Les premiers aliments utilisés ont été formulés pour imiter au mieux les compositions des proies consommées par les poissons dans leur milieu naturel. Au début du XX^e siècle, les aliments étaient distribués sous forme humide et étaient principalement constitués avec des rebuts de poissons.

L'apparition de granulés secs compressés dans les années 1960 a été une véritable révolution pour l'aquaculture. Ces granulés facilement produits, stockés et transportés, furent rapidement utilisés à travers le monde (Stickney et Treece, 2012) et ont facilité le développement et la rationalisation de la production aquacole.

Les premiers aliments, sous forme de granulés, étaient composés de **farines de poisson (FP)** issues de la transformation de petits poissons pélagiques (Détails dans l'encart 1.1), de **sous-produits de l'industrie et de l'élevage**, notamment de protéines animales transformées (PAT, comprenant foie, graisse, sang et plumes, etc) et de **farines végétales**.

À partir des années 1970, dans l'optique de diminuer à la fois les rejets azotés et la dépendance de l'aquaculture envers les FP, matières premières majoritaires, la proportion des protéines des aliments aquacoles a diminué. Les protéines ont progressivement été remplacées par des **huiles de poissons (HP)**, également issues de la pêche minotière (Détails dans l'encart 1.1), afin d'apporter des lipides, utilisés comme source énergétique.

Des sources de glucides, disponibles à un prix compétitif, ont également été progressivement ajoutées dans les aliments des salmonidés. L'apport d'amidon, en deçà de 20%, utilisé comme

source énergétique, permet l'épargne des protéines qui restent alors disponibles pour la croissance.

À la fin des années 1990, suite à la crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine (vache folle), l'utilisation des PAT a été interdite pour l'alimentation des poissons d'élevage en Europe. Pour remplacer ces matières premières, la proportion de farines végétales et de FP a alors été augmentée dans les aliments.

Années 1990 : Vers une diminution des matières premières d'origine marine

Augmentation de la demande

Avec l'augmentation de la production aquacole (Paragraphe 1.1) et le grand nombre d'espèces nécessitant un apport exogène de nourriture (70% des poissons et des crustacés, dont 68 % dépendent d'un aliment manufacturé), la demande en aliments a explosé depuis les années 1970 (Naylor *et al.*, 2000; Tacon et Metian, 2015).

Logiquement, la demande en FP et en HP a, elle aussi, progressé notamment pour l'élevage des salmonidés et des poissons marins. Par exemple, alors que les quantités d'aliments utilisées pour l'élevage de la TAC sont faibles (3% des aliments utilisés pour l'aquaculture seulement en 2012), 16,9% des HP et 5,9% des FP utilisées par l'aquaculture lui étaient destinées en 2012 (Tacon et Metian, 2015).

La production de FP et d'HP stable

Parallèlement, en raison de la stabilisation de la pêche minotière et de l'intensification des quotas (Paragraphe 1.1.1), la production de FP qui atteignait 6,8 millions de tonnes en 1988 a ensuite diminué et atteint 4,7 millions de tonnes en 2015 (Tacon *et al.*, 2011; Seafish, 2016). De la même façon, la production d'HP stagne et atteint aujourd'hui 0,8 millions de tonnes (Seafish, 2016) (Figure 1.5). Cela représente une diminution moyenne de la production de 1,7 et 2,6% par an pour les FP et pour les HP, respectivement (Tacon *et al.*, 2011).

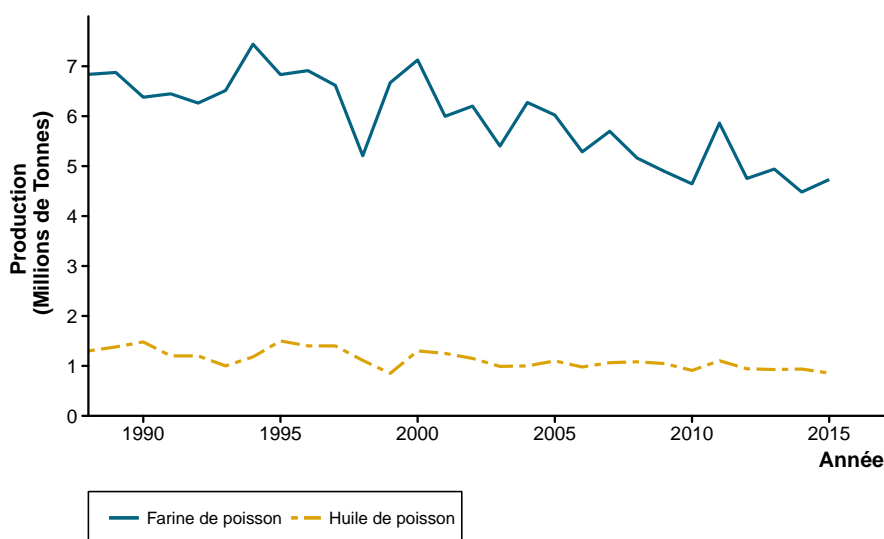


FIGURE 1.5 – Évolution de la production d'huiles et de farines de poisson de 1990 à aujourd'hui (Source Seafish).

Des produits de plus en plus chers, en concurrence avec d'autres secteurs

En raison de la stabilisation de la production et de l'augmentation de la demande, les prix des HP et des FP ont été très volatiles et ont globalement augmenté depuis les années 2000 (Figure 1.6). Les prix ont presque quadruplé en quelques années avec notamment un maximum en 2013, où ils ont atteint 2380 et 1919 US dollars/tonne pour les HP et les FP, respectivement.

L'aquaculture est en concurrence avec d'autres secteurs agroalimentaires pour l'utilisation des HP et des FP qui sont également incorporées dans l'alimentation des porcs et des volailles dans les pays extra européens. Alors que l'aquaculture utilisait 10% des FP produites en 1980 (Seafish, 2016), elle en utilise aujourd'hui plus de 60 % et plus de 80 % des HP produites dans le monde (Tacon *et al.*, 2011). De plus, certains poissons transformés en HP et en FP pourraient être directement utilisés pour la consommation humaine, contrairement à ce qui est fréquemment affirmé (Cashion *et al.*, 2017).

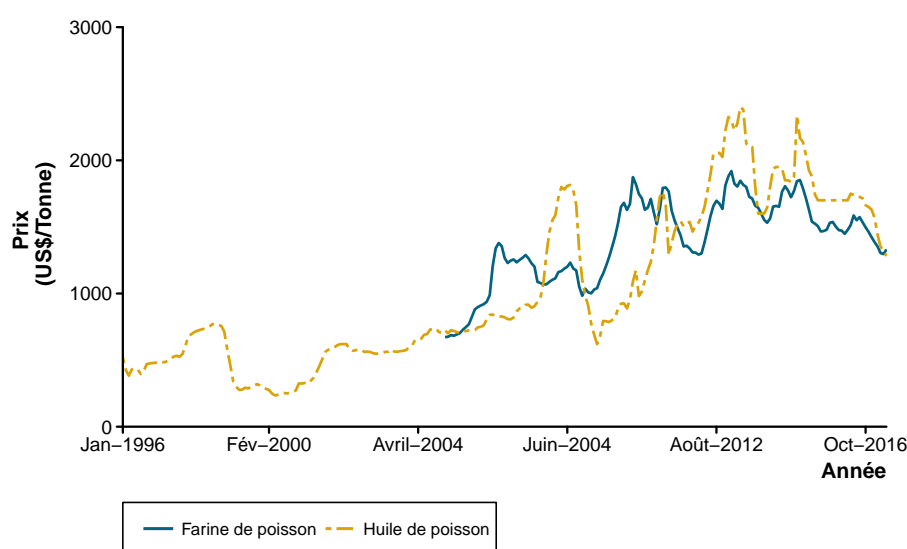


FIGURE 1.6 – Évolution des prix des huiles et des farines de poisson de 1996 à aujourd'hui (Source FAO, Gviews).

Les poissons pélagiques : des espèces clés dans les écosystèmes marins

Les poissons pélagiques, capturés puis transformés en HP et en FP, sont caractérisés par un cycle de vie court, une croissance rapide et des fluctuations importantes de leur biomasse dues à une grande sensibilité à l'environnement. Pour ces raisons, on a longtemps considéré que ces populations étaient très résilientes, notamment aux problèmes de sur-pêche (Pikitch *et al.*, 2012).

Ces espèces sont pourtant des maillons essentiels pour le transfert de l'énergie au sein des écosystèmes marins entre le plancton, les poissons et les mammifères marins (Cury *et al.*, 2000; Alder *et al.*, 2008). Aujourd'hui, il a été prouvé que la surexploitation de ces populations, en plus des conséquences directes sur leurs propres populations, pourrait avoir des conséquences importantes sur leurs différents prédateurs (Karpouzi *et al.*, 2007; Cury *et al.*, 2011; Kaschner *et al.*, 2006), et donc sur la diversité des écosystèmes marins. Cet impact est augmenté par des événements climatiques extrêmes de plus en plus fréquents (Essington *et al.*, 2015).

Utilisation de farines et d'huiles d'origine végétale

Afin de développer une aquaculture durable, tant sur le plan économique qu'environnemental,

il s'est avéré nécessaire de diminuer les proportions d'HP et de FP dans les aliments aquacoles, à partir des années 1990.

Des matières premières d'origine végétale ont été utilisées en raison de leur disponibilité et de leur prix relativement faible. Aujourd'hui, d'autres matières premières sont envisagées comme les farines d'insectes, les algues mais également les PAT (dont des changements de nature, de conditions de production et de législation permettent à nouveau leur utilisation). Leur incorporation dans les aliments aquacoles est toutefois restreinte en raison de fortes contraintes législatives, de limitations techniques, ainsi que de craintes pour l'image du produit (Henry *et al.*, 2015). De plus, ces matières premières ne sont pas encore disponibles en quantité suffisante pour satisfaire la demande. Pour ces différentes raisons, les huiles et les farines végétales restent encore aujourd'hui les matières premières les plus utilisées pour le remplacement des HP et des FP.

Dans la suite du manuscrit, le terme "aliment V" sera utilisé pour décrire des aliments riches en matière première d'origine végétale. Pour chaque étude citée, les taux de substitution seront indiqués pour les huiles et les farines de la façon suivante : (Fr%, Hr%)

avec Fr = sources protéiques d'origine végétale (g)/ sources protéiques totales de l'aliment (g) ;

et Hr = huiles végétales (g)/ huiles totales de l'aliment (g).

Le terme "aliment M" sera utilisé pour désigner les aliments formulés principalement à base d'huiles et farines de poissons.

■ ■ ■ Conclusion et résumé du chapitre 1

En raison du développement spectaculaire de la production aquacole pour répondre aux besoins en poissons pour l'alimentation humaine, la demande en farines et en huiles de poissons, matières premières traditionnellement incorporées dans les aliments pour salmonidés, n'a cessé d'augmenter au fil des années. Il a donc été nécessaire de diminuer leur proportion dans les aliments, notamment pour la TAC, poisson le plus produit par l'aquaculture française. En raison de leur disponibilité et de leur prix, les matières premières d'origine végétale ont été privilégiées comme substituts aux HP et FP.

Deux approches complémentaires ont alors été développées :

- Dès le début des années 1990, afin d'améliorer aux mieux les formules alimentaires, les recherches en nutrition ont étudié les effets de l'incorporation des matières premières d'origine végétale sur différents paramètres d'élevage et de production. Les résultats de ces recherches sont présentés dans le **second chapitre** de cette introduction.
- Suite à l'évolution des formules alimentaires, des recherches en génétique se sont également intéressées à la possibilité de sélectionner des poissons sur leurs performances zootechniques lorsque ceux-ci sont nourris avec des aliments riches en végétaux. Ces différents résultats sont présentés dans le **troisième chapitre**.



2

Les effets de l'aliment végétal chez les salmonidés

Le principe de la substitution repose sur le fait que ce sont les nutriments apportés par les matières premières d'origine marine (Farine et huile de poissons, FP et HP) qui sont indispensables et non les matières premières en elles-mêmes. Cependant, les compositions nutritionnelles des HP et des FP sont singulières et particulièrement bien adaptées à la couverture des besoins des salmonidés. C'est pour cette raison que leur substitution est complexe, d'autant plus que les caractéristiques nutritionnelles des matières premières d'origine marine et d'origine végétale diffèrent sur de nombreux points.

2.1 Les différences entre les matières premières d'origine marine et d'origine végétale

2.1.1 Les sources protéiques

Les principales sources protéiques végétales utilisées pour la substitution sont des farines de blé, de maïs, de protéagineux, d'oléagineux sous forme de tourteaux (co-produits de l'extraction de l'huile), de concentrés protéiques de soja et de colza, ou d'autres extraits protéiques. D'un point de vue nutritionnel, les sources protéiques végétales diffèrent des FP sur les points suivants :

- Les farines végétales sont en moyenne moins riches en protéines en comparaison des FP qui contiennent entre 66 et 72% de protéines et sont de ce fait particulièrement bien adaptées pour couvrir les besoins des salmonidés (Tableau 2.1). L'incorporation de concentrés protéiques, tels que les glutens de blé et de maïs ou les concentrés de soja et de colza, permet d'augmenter les taux protéiques des aliments, mais leurs coûts élevés limitent aujourd'hui leur utilisation.

Tableau 2.1 – Teneur en protéines, en lipides et en fibres (pourcentage de matière sèche) et teneur en AAI de différentes sources protéiques (Source NRC 2011).

	Farine d'an- chois	PAT			Farines végétales			Concentrés			Gluten			Tourteau		
		Plume	Sang	Soja	Blé	Pois	Lupin	Soja	Pois	Blé	Maïs	Soja	Blé	Maïs	Soja	
																83,3
Protéines (%)	65,4	83,3	88,6	44	11,7	25,3	30,4	63,6	55	80,7	63,7	35,2				
Lipides (%)	7,6	5,4	1,4	1,5	1,2	1,4	6,7	0,5	2,0	1,5	2,2	18				
Fibres (%)	1,0	1,2	1,0	7,3	1,3	6,9	1,1	4,5	0,5	1,5	5,0					
Arg	3,68	5,8	2,35	3,23	0,86	1,87	3,38	4,64	4,83	3,8	1,9	2,6				
His	1,56	0,70	5,00	1,17	0,39	0,54	0,77	1,58	1,3	2	1,2	0,96				
Isol	3,06	4,15	0,80	1,99	0,51	0,86	1,38	2,94	2,15	3,7	2,3	1,61				
Leu	5,00	6,94	10,3	3,42	0,92	1,51	2,43	4,92	3,75	6,3	9,4	2,75				
Lys	5,11	1,81	7,1	2,83	0,58	1,5	1,54	3,93	3,75	4,9	1,07	2,22				
Met	1,95	0,5	1	0,61	0,19	0,21	0,27	0,81	0,41	1,6	1,9	0,53				
Cys	0,61	3,84	1,4	0,7	0,26	0,31	0,51	0,89	0,62	-	1,1	0,55				
Phe	2,66	4,12	5,1	2,18	0,55	0,98	1,22	3,28	2,56	4,5	3,8	1,83				
Tyr	2,15	2,00	2,3	1,69	0,38	0,71	1,35	2,3	1,58	na	0,87	1,32				
Thr	2,82	3,85	3,8	1,73	0,46	0,78	1,20	2,47	1,85	1,6	2	1,41				
Trpt	0,76	0,55	1,00	0,61	0,25	0,19	0,26	0,84	0,49	1,05	0,3	0,48				
Val	3,51	4,55	5,2	2,4	0,69	0,98	1,29	3,06	2,35	4	2,7	1,68				

- Les profils en acides aminés des farines végétales diffèrent de celui des FP et sont limitants en lysine et méthionine par rapport aux besoins des poissons, notamment de la TAC (Tableau 2.1). L'ajout d'AA sous forme cristalline permet de pallier ce problème (Espe *et al.*, 2006).
- Alors que les FP contiennent une part non négligeable de lipides (AGPI-LC n-3, phospholipides, cholestérol), qui peut atteindre 12 % (Jackson, 2006; Schipp, 2008; Médale et Kaushik, 2009), les farines végétales en sont généralement pauvres. Toutes les farines végétales sont dépourvues d'EPA et de DHA et leur teneur en phospholipides est très faible, excepté pour le tourteau de soja non délipidé. Le cholestérol représente moins de 5% des stérols totaux chez les végétaux et les farines végétales contiennent majoritairement des phytostérols.
- La plupart des farines végétales est riche en glucides : amidon et polysaccharides non amylacés. Grâce à l'amélioration des procédés de fabrication de l'aliment (extrusion), l'amidon est gélatinisé et peut ainsi être digéré plus efficacement par les poissons (Bergot et Breque, 1983). Concernant les polysaccharides non amylacés, les poissons ne peuvent pas les digérer du fait de l'absence d'enzymes spécifiques et d'une flore microbienne adaptée.
- Les farines végétales contiennent également différents composants, dits facteurs anti-nutritionnels, pouvant avoir des effets délétères à différents niveaux : appétit, digestion, métabolisme, immunité (Francis *et al.*, 2001; Gatlin *et al.*, 2007; Krogdahl *et al.*, 2010). Les effets de ces principaux facteurs sont présentés dans le Tableau 2.2.
- Les farines végétales peuvent contenir des mycotoxines, issues des moisissures se développant sur les plantes, pouvant avoir des effets négatifs sur la croissance et sur la santé des poissons (Burel et Médale, 2014).

Tableau 2.2 – Principaux facteurs anti-nutritionnels présents dans les farines végétales et leurs effets sur les performances zootechniques des poissons (d'après Medale *et al.* 2013).

Facteurs	Matières premières				Effets
	Soja (Tourteau)	Colza (Tourteau)	Farine de Lupin	Pois dé-pelliculé	
Acide phytique	x	x		x	Digestion des protéines
Allergènes	x				Immunité
Alcaloïdes			x		Appétit
Antivitamines	x			x	Métabolisme
Glucosinolates		x			Appétit, hyperthyroïdie
Inhibiteurs enzymatiques	x	x	x	x	Digestion
Lectines	x			x	Absorption, Entérites
Phytoestrogènes	x		x		Reproduction
Saponines	x		x	x	Entérites, Digestion
Tannins		x		x	Digestion

Chapitre 2. Les aliments végétaux

2.1.2 Les sources lipidiques

Les principales huiles végétales utilisées pour le remplacement des HP sont les huiles de colza, de soja, de palme, de tournesol ou encore de lin (Corraze et Kaushik, 2009). À l'instar des sources protéiques, les propriétés nutritionnelles des huiles végétales et des HP diffèrent sur plusieurs aspects, notamment sur leur profil en acides gras (AG) (Tableau 2.3) :

- Les HP sont riches en phospholipides et en AG essentiels (AGE), notamment ceux de la série n-3 à longue chaîne, le DHA et l'EPA. Elles contiennent aussi des vitamines, comme la vitamine A et D (Jackson, 2006; Schipp, 2008).
- Les huiles végétales sont généralement riches en AG des séries n-6 et n-9, mais également en AG saturés. L'huile de lin fait, toutefois, exception avec un taux important d'ALA, AGPI-LC n-3 précurseur d'EPA et du DHA. Toutes les huiles végétales sont, quant à elles, dépourvues d'EPA et de DHA (Turchini *et al.*, 2009; Corraze et Kaushik, 2009; Medale *et al.*, 2013).
- Les huiles végétales sont moins concentrées en POP (Polluants Organiques Persistants), en comparaison des HP (Turchini *et al.*, 2009; Corraze et Kaushik, 2009; Medale *et al.*, 2013).

Tableau 2.3 – Valeur moyenne en AG de différentes sources lipidiques (d'après NRC 2011).

	Huile d'anchois	Colza	Lin	Palme	Lécithine de soja	Tournesol
Σ AG Saturés	34,6	7,4	9,4	51,6	15,1	10,6
Σ Mono-insaturés	24,9	62,3	20,2	37	23,2	19,5
Poly-insaturés n-6						
18 :2n-6	1,2	20,2	12,7	9,1	51	65,7
20 :4n-6	0,1	0	0	0	0	0
Poly-insaturés n-3						
18 :3n-3	0,8	12,0	53,3	0,2	6,8	0
18 :4n-3	3,0	0	0	0	0	0
20 :5n-3 (EPA)	17	0	0	0	0	0
22 :6n-3 (DHA)	8,8	0	0	0	0	0
n-3/n-6	24	0,6	4,2	0	0,1	0,1

Les recherches en nutrition se sont d'abord intéressées aux différents ingrédients un à un, pour en observer les effets et pour identifier leurs taux limites d'inclusion (Médale et Kaushik, 2009). Par la suite, afin d'améliorer les formules, les différentes matières premières ont été utilisées en mélange pour se rapprocher des compositions des aliments formulées à base d'HP (proportion des différentes classes d'AG) et de FP (taux protéique et profil en AA) pour limiter les effets négatifs de certains composants des produits végétaux (Médale et Kaushik, 2009; Medale *et al.*, 2013).

2.2 La survie et la croissance

La croissance est un paramètre clef pour l'élevage et de nombreuses études s'y sont donc intéressées. Les résultats de ces études dépendent de l'espèce étudiée, du taux de substitution, des matières premières utilisées, ainsi que du stade de vie à partir duquel l'aliment V est distribué.

2.2.1 Substitution des huiles de poissons (HP)

La substitution totale des HP par des huiles végétales (seule ou en mélange) est possible chez les salmonidés. Bien que les profils en AG de ces huiles diffèrent significativement (Tableau 2.3), la croissance des poissons n'est pas impactée dans la mesure où les besoins en AGPI-LC sont couverts (Torstensen *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2003, 2004; Richard *et al.*, 2006; Jordal *et al.*, 2006). L'utilisation de différentes huiles végétales en mélange permet de se rapprocher du profil en AG des HP, en terme de classes de lipides mais les teneurs en AGPI-LC n-3 restent plus faibles. De plus, l'incorporation de 40% de FP dans le régime permet de fournir environ 4% de lipides, dont 1 à 1,5 % de AGPI-LC n-3, qui sont suffisants pour couvrir les besoins nutritionnels de la TAC (NRC, 2011). Il faut cependant noter que les résultats obtenus chez les salmonidés diffèrent des résultats obtenus chez les espèces marines qui n'ont pas la capacité à synthétiser l'EPA et le DHA (Tocher, 2003).

2.2.2 Substitution des farines de poissons (FP)

En raison des différences de profils en AA, de la présence potentielle de différents facteurs anti-nutritionnels et de glucides dans les farines végétales, les résultats concernant le remplacement des FP sont moins favorables que ceux obtenus pour le remplacement des HP. Alors que les performances zootechniques des salmonidés ne sont pas impactées si les taux de remplacement sont inférieurs à 80 % (Gomes *et al.* 1995 : Fr = 33 et 66% ; Kaushik *et al.* 1995 : Fr = 33 à 100% ; Médale *et al.* 1998 : Fr = 75%), au-delà les taux de croissance sont négativement affectés chez la TAC (Kaushik *et al.*, 1995; Vilhelmsson *et al.*, 2004; De Francesco *et al.*, 2004; Santigosa *et al.*, 2008; Dupont-Nivet *et al.*, 2009), ou chez le saumon (Espe *et al.*, 2006; NRC, 2011).

2.2.3 Substitution conjointe des HP et des FP

Le remplacement conjoint des HP et des FP a été beaucoup moins étudié. Une étude chez le saumon a montré qu'un taux d'inclusion élevé d'huiles végétales (Hr = 70%) associé à un taux modéré de farines végétales (Fr = 40%) n'affecte pas les performances des poissons (Torstensen *et al.*, 2008). À l'inverse, leurs performances ont été diminuées lorsque le taux d'inclusion des farines végétales était élevé, quel que soit le taux d'huiles végétales (Hr = 35 ou 70 %) (Torstensen *et al.*, 2008).

L'interaction entre différents facteurs comme la modification du profil en AG, notamment le manque d'EPA et de DHA, la présence de certains composés dans les farines végétales (facteurs anti-nutritionnels, certains glucides), ainsi que l'absence d'autres composés normale-

ment apportés par la FP (vitamines et/ou minéraux), semblent être à l'origine des baisses de performances zootechniques lors du remplacement conjoint des HP et des FP.

2.2.4 Substitution totale conjointe des HP et des FP

La substitution totale et conjointe des HP et FP a été encore moins étudiée. Alors que le remplacement partiel a peu d'impact sur la croissance (Torstensen *et al.*, 2008), le remplacement conjoint et total affecte significativement les performances des poissons (Drew *et al.*, 2007; Panserat *et al.*, 2009).

2.2.5 Substitution au cours des phases précoces

Les besoins nutritionnels des poissons varient en fonction des stades de vie (NRC, 2011). Pourtant l'impact des aliments V a surtout été étudié chez les poissons en croissance (Drew *et al.*, 2007; Torstensen *et al.*, 2008; Panserat *et al.*, 2009) et très peu lors des phases précoces qui nécessitent que de faibles quantités d'aliments en raison de la petite taille des poissons. Chez la TAC, lors du remplacement conjoint et total des HP et des FP dès le premier repas, le remplacement affecte les taux de croissance (Le Boucher *et al.*, 2011, 2012; Lazzarotto *et al.*, 2015), mais également les taux de survie (Le Boucher *et al.*, 2011, 2012).

Les recherches en nutrition ont permis d'identifier certains verrous à l'utilisation d'aliments V qui peuvent expliquer les baisses de performances observées (survie et croissance) chez les salmonidés. Ces différents points sont détaillés dans la suite du chapitre.

2.3 La consommation d'aliment

La diminution de la consommation d'aliment est l'une des premières causes des baisses de performances zootechniques lorsque les salmonidés sont nourris avec des aliments V fortement substitués. Cependant, le comportement de prise alimentaire est complexe et sa régulation a été peu étudié à l'heure actuelle chez les poissons. Il est la résultante de facteurs externes, tels que la disponibilité de nourriture mais également la température, la photo-période, le stress ou encore des facteurs internes, tels que le statut énergétique et physiologique du poisson (Volkoff, 2016; Rønnestad *et al.*, 2017).

Les facteurs externes

Chez les TAC adultes, le comportement alimentaire est principalement déclenché par l'olfaction de différents composés azotés (AA libres, mais également nucléotides et nucléosides) et, dans une moindre mesure, par d'autres composés non azotés tels que le glucose, l'acide lactique et certains alcools (Hara, 2006). Des stimulus visuels semblent également intervenir (Valentinčič et Caprio, 1997). La gustation semble, quant-à-elle, ne jouer qu'un rôle secondaire (Hara, 2006).

Les facteurs internes

Des facteurs internes contrôlent précisément l'appétit et la consommation d'aliment chez les poissons. L'hypothalamus est la structure clef de ce contrôle en intégrant à la fois des signaux

issus du système nerveux central (SNC) et des signaux périphériques liés à l'ingestion et à la digestion des nutriments. Leurs effets peuvent être orexigènes (qui augmentent la prise alimentaire) ou anorexigènes (qui, à l'inverse, diminuent la prise alimentaire) (Volkoff, 2016; Rønnestad *et al.*, 2017). Les différents signaux connus à l'heure actuelle chez les poissons sont résumés dans le Tableau 2.4.

Tableau 2.4 – Récapitulatif des signaux contrôlant la prise alimentaire chez les poissons (d'après Volkoff 2016).

Nom	Nature	Effet
Signaux centraux		
NPY	Neuropeptide	Orexigénique
AgRP	Neuropeptide	Effet non démontré
Orexin	Deux Neuropeptides	Orexigénique
Galanin	Peptide du SNC et TD	Orexigénique
MCH	Neuropeptide	Orexigénique
CART	Neuropeptide	Anorexigénique
CRH	Neuropeptide	Anorexigénique
Signaux périphériques		
GHRL	Hormone digestive	Effet non démontré
GRP/Bbs	Peptide du TD	Anorexigénique
CCK	Peptide de l'intestin proximal	Anorexigénique
PYY	Peptide de l'intestin distal	Anorexigénique
Leptin	Hormone	Anorexigénique

2.3.1 L'effet du remplacement des HP et des FP par des produits végétaux

L'incorporation de farines végétales, dont les profils en AA diffèrent significativement de ceux des FP et qui peuvent contenir des facteurs anti-nutritionnels non éliminés lors de la fabrication des aliments, diminue dans certains cas la consommation d'aliment chez les salmonidés lorsqu'elles remplacent les FP (Gomes *et al.*, 1995; Espe *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2009). Les huiles, quant à elles, jouent un rôle mineur dans la palatabilité des aliments et le remplacement des HP n'a qu'un impact limité sur la consommation d'aliment (Turchini *et al.*, 2009). Les TAC sont, tout de même, capables de distinguer les huiles végétales des HP et montrent une préférence pour ces dernières (Geurden *et al.*, 2005, 2007). Les HP sont rarement pures et peuvent également contenir des composés azotés, ce qui pourrait expliquer ce résultat (Turchini *et al.*, 2009).

Finalement, une étude a montré qu'une alimentation précoce des alevins de TAC avec un aliment 100% V améliore de 30% l'acceptation et l'utilisation de ce même aliment lorsqu'il était distribué sept mois plus tard aux mêmes poissons (Geurden *et al.*, 2013).

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la diminution de la consommation d'aliment avec des aliments V (Geurden *et al.*, 2005). Premièrement, les différences de palatabilité entre des aliments M et V pourraient impacter l'appétence de ces derniers. En d'autres termes, les poissons pourraient avoir une aversion pour les aliments V et refuser de l'ingérer. La deuxième hypothèse repose sur la présence de composants présents dans les végétaux qui pourraient affecter la régulation de la prise alimentaire et avoir un rétro-contrôle négatif sur

celle-ci.

2.4 La digestion et l'absorption des nutriments : impact des facteurs anti-nutritionnels

En raison de la présence de facteurs anti-nutritionnels présents dans certains végétaux, l'inclusion de farines végétales dans l'aliment peut modifier la structure et le fonctionnement du TD et affecter ainsi directement ou indirectement les étapes de digestion et d'absorption des nutriments (Francis *et al.*, 2001; Gatlin *et al.*, 2007; Krogdahl *et al.*, 2010). Ces facteurs limitent alors la disponibilité des nutriments et donc de l'énergie, mais peuvent également impacter l'immunité des poissons et participer ainsi aux baisses de performances observées avec les aliments V.

Parmi ces facteurs, les fibres, les inhibiteurs enzymatiques, les saponines et les lectines ont été tout particulièrement étudiés.

Les fibres, qui ne sont pas digérées par les poissons, permettent de moduler le temps de transit lorsqu'elles sont apportées en petite quantité dans l'aliment. Mais au-delà de 10%, ces fibres diminuent la digestibilité et l'absorption des nutriments et sont donc considérées comme des facteurs anti-nutritionnels (Francis *et al.*, 2001; Gatlin *et al.*, 2007). **Les fibres solubles** (pectines, gommes et hémicellulose) augmentent la viscosité du bol digestif et se lient aux autres composés alimentaires, notamment aux lipides. Alors que ces fibres réduisent le temps de transit, **les fibres non solubles** (cellulose, hémicellulose) l'augmentent.

Des inhibiteurs enzymatiques sont retrouvés dans la majorité des plantes, notamment dans le soja. Parmi les plus communs, on retrouve des inhibiteurs de la trypsine ou encore de la chymotrypsine, peptidases impliquées dans la digestion des protéines (Santigosa *et al.*, 2008, 2011). Ces inhibiteurs enzymatiques peuvent également cibler l' α -amylase, enzyme responsable de la dégradation de l'amidon ou des lipases, responsables de la dégradation des gouttelettes lipidiques (Santigosa *et al.*, 2008, 2011). En se liant directement à l'enzyme, ces inhibiteurs réduisent son activité et affectent ainsi directement la digestibilité des nutriments. À court terme, pour compenser l'activité enzymatique, le pancréas est capable d'augmenter la sécrétion des enzymes ciblées (Santigosa *et al.*, 2008).

Les saponines jouent un rôle prépondérant dans l'apparition d'inflammations de l'intestin, ou entérites. Les saponines ne sont pas responsables de la formation de ces entérites *per se*, mais agissent en s'intercalant entre les molécules de cholestérol contenues dans les membranes cellulaires. La perméabilité des cellules de la muqueuse intestinale est modifiée et l'absorption de certaines substances est augmentée. Le TD ne peut plus assurer son rôle de protection contre divers agents pathogènes (Krogdahl *et al.*, 2015).

En cas d'exposition à un pathogène, une réponse inflammatoire se met en place et la muqueuse est alors envahie par différentes cellules inflammatoires. Les entérites induisent des modifications histologiques de l'intestin mais également fonctionnelles, avec notamment une réduction de l'activité de certaines enzymes digestives et une réduction de l'absorption des nutriments (Chikwati *et al.*, 2013). Les saumons sont particulièrement sujets à ces entérites quand ils sont nourris à base de farine de soja (Krogdahl *et al.*, 1994), mais les TAC peuvent également

développer ces entérites.

Les saponines impactent également le métabolisme du cholestérol. En se liant aux molécules de cholestérol présentes dans l'aliment, elles augmentent leur excrétion *via* les fèces. De plus, en raison de l'apparition d'entérites, le transport intestinal de la bile et du cholestérol est affecté, ce qui pourrait diminuer leur ré-absorption intestinale (Kortner *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2014).

Les lectines se lient de façon spécifique à certains glucides, *via* leurs récepteurs cellulaires glycosés, et activent ainsi le récepteur. Leurs effets dépendent donc des récepteurs auxquels elles se lient, mais peuvent notamment affecter le transport des nutriments, la régulation d'hormones intestinales, ou encore la prolifération de cellules à mucus. Les lectines peuvent notamment être à l'origine de sécrétions excessives de mucus, ce qui altère l'activité enzymatique mais également les capacités d'absorption des entérocytes. Chez la TAC, les lectines seules ne modifient pas l'intégrité du TD, mais leur action combinée avec d'autres facteurs comme les saponines pourraient participer à l'apparition d'entérites (Buttle *et al.*, 2001; Iwashita *et al.*, 2008).

La communauté microbienne présente dans le TD sécrète également de nombreuses enzymes et participe ainsi à la dégradation des protéines et des polysaccharides comme l'amidon. Des études récentes ont montré que les aliments à base de végétaux influencent la communauté microbienne du TD (Desai *et al.*, 2012). Ces changements, en interaction avec les facteurs anti-nutritionnels, pourraient également impacter négativement la digestion et l'absorption des nutriments.

L'identification des facteurs anti-nutritionnels, ainsi que leurs mécanismes d'action a permis de déterminer les taux limites d'inclusion de certains végétaux mais également de mettre au point différents processus afin de limiter l'impact de ces facteurs. Ainsi, les substances sensibles à la chaleur peuvent être éliminées par extrusion (Drew *et al.*, 2007; Hua et Bureau, 2012), et l'utilisation d'un mélange de farines végétales permet de diluer leurs effets individuels (Król *et al.*, 2016).

2.5 Le métabolisme

Une fois absorbés, les nutriments sont transportés vers les différents tissus de l'organisme où ils sont métabolisés. Grâce à des analyses sans *a priori* d'expression de gènes (transcriptome) dans le foie, organe clef dans la régulation du métabolisme, et d'études de données physiologiques et zootechniques, de nombreuses études ont démontré que le remplacement des FP et des HP par des matières premières d'origine végétale altère également différentes voies du métabolisme. Bien que les résultats diffèrent d'une étude à l'autre, en raison de nombreux facteurs comme l'espèce étudiée, ou le type et le taux de remplacement (huile et/ou farine), ces études ont permis d'identifier un certain nombre de gènes dont l'expression est affectée par les aliments V de façon générique.

2.5.1 Métabolisme azoté

Une contrainte importante de l'utilisation de farines végétales, même lorsqu'elles sont utilisées en mélange, est la couverture des besoins en AA, notamment en lysine et en méthionine. Or, une modification du profil en AA et un déséquilibre entre AAI/AANI peuvent induire une altération du métabolisme azoté, une augmentation du catabolisme et une diminution de la rétention protéique (Espe *et al.*, 2007; Médale et Kaushik, 2009).

Une étude transcriptomique chez la TAC, nourrie pendant 13 mois avec un régime dépourvu de FP, a montré des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la glutamine (Panserat *et al.* 2008 : Fr = 100%). De plus, cette étude ainsi qu'une autre étude basée sur des données protéomiques (Vilhelmsson *et al.* 2004 : Fr = 100%, 3 mois) montrent que le remplacement des FP induit une sur-expression des gènes codants pour des ubiquitines et des protéasomes et une augmentation de l'activité du protéasome dans le foie, dont le rôle est la dégradation des protéines (Vilhelmsson *et al.*, 2004; Overturf et Gaylord, 2009). L'activité du protéasome dans le foie étant négativement corrélée avec les taux de croissance (Dobly *et al.*, 2004), l'augmentation de celle-ci reflète la baisse de croissance observée avec les aliments V. Des résultats similaires ont été retrouvés dans le cas du remplacement conjoint et total des FP et des HP chez la TAC (Panserat *et al.*, 2009) mais également chez le bar (Geay *et al.*, 2011).

2.5.2 Métabolisme lipidique

En raison des différences de profil en AG, la diminution de la proportion d'HP altère les différentes voies du métabolisme lipidique, impactant ainsi les dépôts lipidiques et le taux de cholestérol plasmatique.

Le remplacement des HP induit une augmentation des lipides hépatiques et une diminution des lipides plasmatiques chez le saumon (Jordal *et al.*, 2007) et chez la TAC (Richard *et al.*, 2006). Le remplacement des FP, quant à lui, induit une augmentation des dépôts lipidiques dans les tissus péri-viscéraux chez la TAC (Medale *et al.*, 2013). Or, le développement excessif de ces dépôts diminue le rendement en carcasses et constitue, de ce fait, une perte préjudiciable pour les éleveurs et les transformateurs.

Les profils en AG des différents tissus sont également significativement modifiés et reflètent globalement le profil en AG des régimes (Torstensen *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2003, 2004; Torstensen *et al.*, 2005). L'EPA et le DHA, absents des farines végétales, ont des bénéfices importants pour la santé humaine et jouent notamment un rôle essentiel dans la protection contre des maladies cardiovasculaires, inflammatoires, et des troubles neurologiques (Calder et Yaqoob, 2009). Le remplacement des HP et des FP par des matières premières d'origine végétale diminue leurs proportions dans les filets et impacte la qualité nutritionnelle des produits (Sprague *et al.*, 2016).

Finalement, que ce soit pour un remplacement des FP (Kaushik *et al.*, 1995) ou des HP (Richard *et al.*, 2006), la teneur en cholestérol plasmatique est significativement diminuée, et cette baisse est d'autant plus importante que la proportion de FP et d'HP diminue.

Les différentes voies et gènes, affectés par les aliments V chez les salmonidés, sont présentés dans la Figure 2.1.

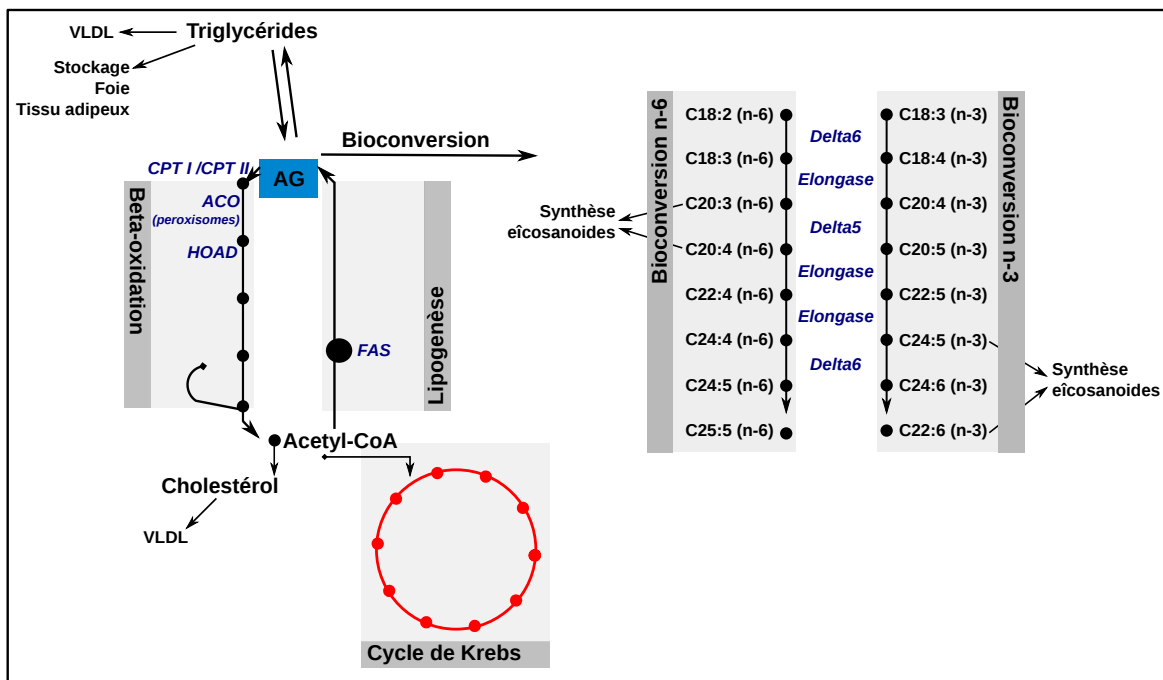


FIGURE 2.1 – Vue d'ensemble du métabolisme lipidique des poissons.

Régulation du métabolisme par les acides gras

Les AG et certaines molécules qui en dérivent jouent des rôles majeurs dans la régulation du métabolisme en activant ou inhibant certains facteurs de transcription, notamment les PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptor) et les SREBPs (Sterol Element Binding Protein) (Leaver *et al.*, 2008a).

SREBP1 donne naissance à deux protéines différentes, dont SREBP1c qui est activé par une baisse du cholestérol et induit sa biosynthèse et la synthèse de AGPI-LC en activant les enzymes impliquées dans leur désaturation et leur élongation (désaturases $\Delta 5$ et $\Delta 6$, et élongases) (Leaver *et al.*, 2008a). Le remplacement des HP induit une sur-expression de ce facteur (Morais *et al.* 2011a : Hr = 100%).

De la même façon, SREBP2 est activé en réponse au taux de cholestérol membranaire et active les gènes de la biosynthèse de cette molécule (Leaver *et al.*, 2008a). De façon similaire, ce facteur est sur-exprimé lorsque les HP sont remplacées par des huiles végétales (Leaver *et al.* 2008b : Hr = 100% ; Morais *et al.* 2011b : Hr = 100%).

Le rôle des PPAR est encore peu connu chez les poissons. Mais différentes études chez les mammifères ont montré qu'ils sont activés par certains AG et permettent l'activation ou l'inhibition de certaines voies comme la β -oxydation, le stockage des AG ou encore des voies du métabolisme des AA et des glucides (Leaver *et al.*, 2008a). L'expression de PPAR α et PPAR γ est, quant à elle, diminuée par l'aliment V (Jordal *et al.* 2005 : Hr = 75 % ; Morais *et al.* 2011a : Hr = 100%).

En raison de ce rôle de signalisation des AG, la modification du profil en AG de l'aliment peut être à l'origine des différentes altérations du métabolisme lipidique détaillés ci-dessous.

Le transport et le captage des AG

Les AG apportés par l'alimentation sont transportés via différentes lipoprotéines, formées d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et une ou plusieurs molécules protéiques appelées apolipoprotéines :

- *Les chylomicrons et les VLDL sont formés dans l'intestin et permettent le transport des AG dans l'organisme. Ils sont captés par les différents tissus grâce à l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme lipolytique ancrée à l'endothélium des capillaires sanguins des tissus. La régulation de cette enzyme, activée par l'insuline dans les tissus adipeux (stockage), et inhibée par cette dernière dans le muscle (oxydation), permet la régulation entre le stockage et le catabolisme des AG.*
- *Les LDL, lipoprotéines appauvries en triglycérides, mais riches en cholestérol, sont générées grâce à l'action de la LPL sur les chylomicrons et les VLDL. Ces lipoprotéines seront ensuite captées par le foie ou d'autres tissus, via des récepteurs (R-LDL).*
- *Les HDL permettent le transport du cholestérol des tissus périphériques, notamment de l'intestin, vers le foie.*

Le transport des AG dans les cellules peut se faire par diffusion ou grâce à des transporteurs impliquant les protéines FAT/ CD36 ou FATP. Le transport intracellulaire des AG est pris en charge par les protéines de transport FABP.

Le remplacement des FP impacte les différentes composantes du transport des lipides au niveau de l'intestin. Les voies d'export des lipides semblent, en effet, stimulées avec notamment l'augmentation de l'expression des gènes liés à la synthèse des phospholipides, à l'estérification du cholestérol (ACAT), ou encore des gènes codant pour différentes apolipoprotéines dans l'intestin (Tacchi *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2014). Ces changements peuvent apparaître en réponse à l'altération de la structure et du fonctionnement du TD en raison de la présence de facteurs anti-nutritionnels.

Au niveau hépatique, les gènes codant pour différentes apolipoprotéines ont également été trouvés sur-exprimés dans différentes études du transcriptome lors du remplacement des HP (Jordal *et al.*, 2005; Leaver *et al.*, 2008b; Morais *et al.*, 2011a), lors du remplacement des FP (Tacchi *et al.*, 2012) ou lors du remplacement conjoint (Panserat *et al.*, 2009; Geay *et al.*, 2011). De plus, le captage des AG dans les tissus périphériques est également modifié lors du remplacement des HP, avec notamment une diminution de la transcription des gènes du récepteur à la LDL chez la TAC (Richard *et al.*, 2006). Dans les tissus adipeux, l'expression de FABP11 a été diminuée, indiquant ainsi une diminution de l'efflux des AG du tissu adipeux lors du remplacement des HP (Torstensen *et al.* 2009 : Hr = 100%). Dans le tissu musculaire, une diminution de l'expression des gènes, FABP11, FABP3, cd36 et FATP, a été observée lors du remplacement des HP par des huiles végétales et pourrait être associée à une baisse du captage et du transport des AG dans ce tissu (Torstensen *et al.* 2009 : Hr = 100%).

La lipogénèse

La lipogénèse, voie de synthèse des AG, se déroule principalement dans le foie chez les salmonidés et également un peu dans le tissu adipeux. L'activation de l'acide gras synthase (FAS), complexe multi-enzymatique cytosolique, représente une étape clef de la régulation

de la lipogénèse.

La voie de la lipogénèse est dépendante de la présence de NADPH et est liée à la voie des pentoses phosphate et à l'enzyme malique qui produisent ce cofacteur.

Remplacement des huiles de poisson

Les effets du remplacement total des HP sur la lipogénèse diffèrent en fonction des études. Alors que certaines études ont montré une diminution de la transcription du gène FAS et de son activité (Jordal *et al.* 2007 : saumon, Hr = 100%, après 16 mois ; Panserat *et al.* 2008 : TAC, Hr = 100%, 13 mois), d'autres études ont montré que son expression n'est pas modifiée par le remplacement (Richard *et al.* 2006, TAC, Hr = 100%, 8 mois, Jordal *et al.* 2007 : saumon, Hr = 100%, après 6,9,14 et 22 mois).

Finalement, une étude transcriptomique a montré une augmentation de la transcription de FAS (Morais *et al.* 2011a : saumon, Hr = 100%, 13 mois). Ce dernier résultat est en accord avec deux autres études ayant montré que le remplacement des HP stimulent la voie des pentoses phosphate avec notamment une forte augmentation de l'expression de G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase), gène codant pour la première enzyme de cette voie, dans le foie des saumons (Menoyo *et al.* 2005 : Hr = 50, 75 et 100% ; Leaver *et al.* 2008b : Hr = 100%)

Remplacement des farines de poisson

Les AA jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme, notamment la méthionine et la lysine qui peuvent activer ou inhiber des voies liées au métabolisme des glucides et des lipides, dont la lipogénèse (Lansard *et al.*, 2010, 2011; Seiliez *et al.*, 2011). Des études s'étant intéressées à la méthionine ont démontré qu'un déficit ou un excès de méthionine induit une augmentation des lipides dans le foie chez le saumon, ainsi qu'une augmentation de la transcription et de l'activité de FAS (Espe *et al.*, 2008; Skiba-Cassy *et al.*, 2016).

Une étude protéomique montre également une augmentation de l'abondance et de l'activité de l'enzyme malique chez des TAC nourries avec un aliment dépourvu de FP (Vilhelmsson *et al.* 2004 : Fr = 100%, 4 mois). Ces différents résultats pourraient être la cause métabolique de l'augmentation des dépôts lipidiques periviscéraux observés chez la TAC lors du remplacement des farines végétales (Medale *et al.*, 2013).

Plus récemment, des études se sont intéressées à l'effet d'un déficit en taurine, AA synthétisé à partir de la méthionine, sur les voies du métabolisme des lipides mais des conclusions définitives sont cependant difficiles à tirer. En effet, alors qu'une étude chez la TAC a montré qu'une supplémentation en taurine a amélioré la croissance mais n'a pas eu d'effet sur le stockage des lipides (Gaylord *et al.*, 2007), une autre étude chez le saumon a montré une croissance similaire mais une réduction du ratio lipide :protéine dans les poissons entiers (Espe *et al.*, 2012).

Remplacement conjoint

Lors du remplacement conjoint et total des FP et des HP, le gène codant pour la glycérol kinase, enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides, a été sur-exprimé dans le foie de la TAC (Panserat *et al.*, 2009), ainsi que les gènes impliqués dans la synthèse de NADPH chez le bar (Geay *et al.*, 2011). Cependant, dans aucune de ces études transcriptomiques, l'expression de FAS n'était significativement augmentée.

Bioconversion

À partir des AG C16 :0 et C18 :0 synthétisés via la lipogénèse, les poissons ont la capacité de produire des AG mono-insaturés de la série n-9 grâce à la présence de l'enzyme désaturase $\Delta 9$. Comme tous les vertébrés, les poissons n'ont pas les enzymes nécessaires (désaturase $\Delta 12$ et $\Delta 15$) pour synthétiser l'ALA et LA à partir de 18 :1n-9.

Les TAC, comme les autres poissons d'eau douce, ont la capacité de synthétiser l'ARA, l'EPA et le DHA à partir d'ALA et de LA, par des séries d'élongation et de désaturation via des élongases et des désaturases ($\Delta 5$ et $\Delta 6$).

L'expression des gènes impliqués dans la voie de bioconversion des AG (élongases, désaturases $\Delta 5$ et $\Delta 6$) est systématiquement stimulée que ce soit lors du remplacement des HP (Jordal *et al.*, 2005; Leaver *et al.*, 2008b; Panserat *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2011a), des FP (Tacchi *et al.*, 2012) ou du remplacement conjoint des HP et des FP (Panserat *et al.*, 2009; Geay *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2015). Cependant l'activation de cette voie métabolique permettant de synthétiser des AGPI-LC, dont les teneurs sont plus faibles dans les aliments V (voir absents des aliments 100% V), reste insuffisante pour prévenir la modification du profil en AG, qui est significativement affecté par l'aliment (Torstensen *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2003, 2004; Torstensen *et al.*, 2005).

La β -oxydation

La β -oxydation se produit dans les mitochondries et dans les peroxisomes.

- Les AG sont activés et transportés dans la mitochondrie grâce à la navette de la carnitine qui fait intervenir trois enzymes (CPTI, Translocase et CTPII). Une fois dans la mitochondrie, la dégradation des AG a lieu avec la répétition d'une série de quatre réactions jusqu'à l'obtention d'un acétyl-CoA.

- Dans les peroxisomes, l'entrée des AG se fait grâce à un transporteur spécialisé. La première étape est réalisée par une enzyme spécifique, l'acyl-CoA oxydase (ACO). La seconde et la troisième étape sont réalisées grâce à un complexe enzymatique multifonctionnel.

Ni le remplacement des HP, ni le remplacement des FP par des produits végétaux n'affectent significativement la β -oxydation dans le foie, excepté chez le saumon lors de la smoltification où une légère augmentation de l'activité de cette voie a été observée lors du remplacement complet des HP par des huiles végétales (Stubhaug *et al.*, 2006). À l'inverse, dans le tissu musculaire, une baisse de la β -oxydation, associée à une diminution de l'expression des deux gènes clefs, CPTII et ACO, a été observée lors du remplacement complet des HP (Stubhaug *et al.*, 2006; Torstensen *et al.*, 2009).

Cependant, lors du remplacement des HP, les substrats utilisés par la β -oxydation sont modifiés. Deux études chez la TAC ont montré que l'ALA qui est préférentiellement utilisé pour la β -oxydation lorsque les poissons sont nourris avec un aliment M, est conservé et bioconverti en EPA et DHA avec les aliments V. De façon similaire, une part non négligeable d'EPA utilisée pour la β -oxydation lorsque les poissons sont nourris avec un aliment M, est déposée dans les tissus ou convertie en DHA avec l'aliment V. Le DHA, faiblement utilisé par la β -oxydation, est conservé pour rejoindre les membranes (Turchini et Francis, 2009; Thanuthong *et al.*, 2011).

Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est synthétisé de novo à partir d'acetyl-CoA par une suite de réactions dans le foie principalement. Sa synthèse est régulée grâce à plusieurs facteurs de transcriptions : SREBP2, LXR et FXR.

En cas d'absence de cholestérol, SREBP2 est transporté jusqu'au noyau où il stimule la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol.

Le cholestérol ainsi synthétisé peut être utilisé pour la synthèse de la bile. L'enzyme cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) est une étape clef de la formation de bile, dont l'expression est régulée par deux facteurs de transcription, LXR et FXR. LXR est également activé par la présence de cholestérol et induit l'excrétion de cholestérol et la synthèse d'acide biliaire. À l'inverse, FXR, activé par la présence de bile, réprime la synthèse de bile (inhibe CYP7A1) et stimule son excrétion (Kortner et al., 2013).

Le remplacement des HP et des FP par des huiles et des farines végétales pauvres en cholestérol stimule sa synthèse. Les analyses transcriptomiques hépatiques ont montré une augmentation de l'expression des facteurs de transcription SREBP2 et SREBP1c, et des différentes enzymes impliquées dans sa synthèse lors du remplacement complet des HP (Leaver *et al.*, 2008b; Panserat *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2011a).

Des effets similaires ont été observés lors de l'inclusion de farines végétales dans l'aliment en remplacement des FP, tout particulièrement de farine de soja, et ce en raison de l'absence de cholestérol et de la présence de phytostérols dans les farines végétales (Kortner *et al.*, 2013, 2014; Gu *et al.*, 2014). La voie de synthèse de la bile est également affectée par le remplacement des FP avec une augmentation de l'expression de FXR et de LXR dans le foie chez le saumon (Kortner *et al.* 2013 : soja = 20%, Gu *et al.* 2014 : saponines de soja = 10%). De plus, des études ont montré que les voies de ré-absorption du cholestérol et de la bile dans les entérocytes sont altérées lors du remplacement des FP par des farines végétales.

Le remplacement complet et conjoint des HP et des FP a des effets similaires chez la TAC (Panserat *et al.*, 2009) et chez le bar (Geay *et al.*, 2011). Cependant, la synthèse endogène de cholestérol ne suffit pas à compenser la diminution de l'apport. L'hypocholestérolémie observée chez les poissons nourris avec un aliment V est d'autant plus importante que la proportion de matières premières d'origine végétale est élevée (Richard *et al.*, 2006).

2.5.3 Métabolisme des glucides

Le métabolisme des glucides comprend plusieurs voies (Figure 2.2) dont :

- *La néoglucogenèse permet de synthétiser du glucose et est très fonctionnelle chez les poissons. Sa régulation dépend de trois enzymes clefs : la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK), la fructose 1,6-biphosphatase (FBP) et la glucose-6-phosphatase (G6PC).*
- *La glycolyse, voie inverse de la néoglucogenèse, permet de cataboliser le glucose et fournit 2 molécules de pyruvate. Cette voie est régulée par 3 enzymes clefs : l'hexokinases (HK), la phosphofructokinase-1 (PFK-1) et la pyruvate kinase (PK).*

L'apport de farines végétales riches en amidon est associé à une hyperglycémie prolongée et à des perturbations métaboliques, participant ainsi à la diminution du taux de croissance observé avec des aliments V (Enes *et al.*, 2009).

Chapitre 2. Les aliments végétaux

Outre les gènes codant pour des enzymes de la voie des pentoses phosphates (Paragraphe 2.5.2), des gènes impliqués dans la glycolyse, dans la néoglucogénèse et dans le métabolisme du glycogène ont également été retrouvés différemment exprimés dans le foie lorsque les FP sont remplacées par des farines végétales (Panserat *et al.*, 2009; Geay *et al.*, 2011; Tacchi *et al.*, 2012). Il est cependant difficile d'interpréter ces résultats, car la majorité des gènes de la néoglucogénèse et de la glycolyse codent pour des enzymes utilisées par ces deux voies. De plus, l'activité de ces enzymes est connue pour être régulée de manière post-transcriptionnelle (phosphorylation, allostérie) (Panserat *et al.*, 2009).

Une étude récente portant sur la présence de glucose dans l'aliment a toutefois montré qu'une copie du gène G6PC était sur-exprimée en présence de glucose, à l'inverse de ce qui était attendu (Marandel *et al.*, 2015). Une altération de la régulation des voies du métabolisme glucidique, notamment un manque d'inhibition de la néoglucogénèse en présence de glucose, pourrait donc expliquer l'hyperglycémie prolongée observée chez les poissons après un repas riche en glucides.

D'autres hypothèses, comme l'importance du rôle de la somatostatine qui pourrait limiter l'action de l'insuline, le faible nombre de récepteurs à l'insuline retrouvés sur le muscle et sur le tissu adipeux ont également été proposées pour expliquer ce phénomène (Moon, 2001; Polakof *et al.*, 2012; Polakof et Panserat, 2016; Kamalam *et al.*, 2016).

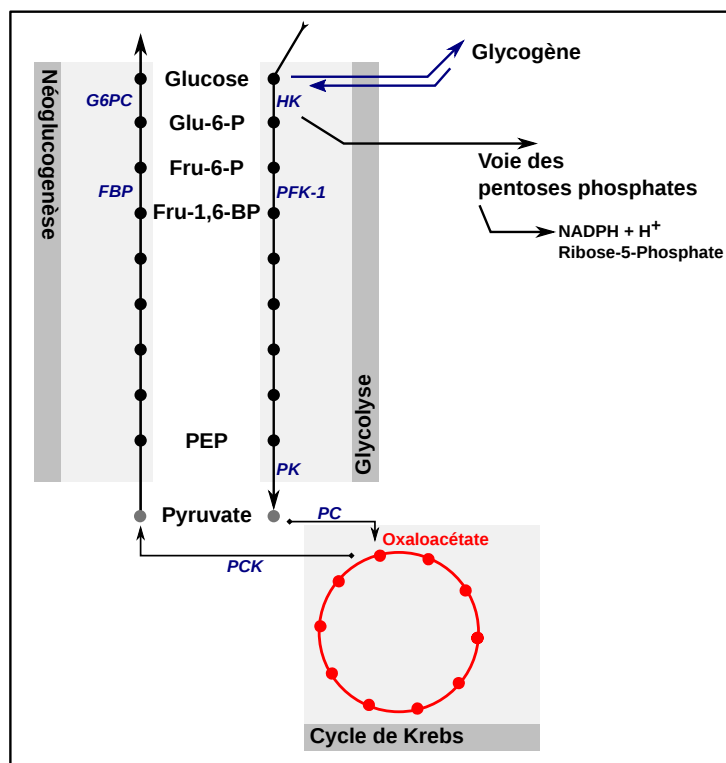


FIGURE 2.2 – Vue d'ensemble du métabolisme des glucides

2.6 L'immunité

Des modifications de l'expression de gènes de l'immunité sont retrouvées dans les études transcriptomiques du foie et de l'intestin, que ce soit avec un remplacement des HP et/ou des FP (Leaver *et al.*, 2008b; Panserat *et al.*, 2008; Geay *et al.*, 2011; Morais *et al.*, 2011a; Panserat *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2015; De Santis *et al.*, 2015; Król *et al.*, 2016). Une altération du système immunitaire causée par des aliments V est donc une autre hypothèse proposée pour expliquer les baisses de performances observées.

Remplacement des huiles de poissons

De nombreux travaux ont montré que le remplacement des HP module différents paramètres immunitaires (Montero et Izquierdo, 2010) : l'activité de la phagocytose chez la daurade (Montero *et al.* 2003 : Hr = 80%), le nombre de leucocytes circulants chez le bar (Mourente *et al.* 2005 : Hr = 70% ; Mourente *et al.* 2007 : Hr = 70%) et chez le saumon (Petropoulos *et al.* 2009 : Hr = 100%), l'activité du complément chez la daurade (Montero *et al.* 2003 : Hr = 80%), ou encore la production d'anticorps chez la TAC (Kiron *et al.*, 1995). L'impact des AG sur l'immunité peut se faire par différentes voies :

- Le DHA et l'ARA, composants des membranes cellulaires, influencent de façon importante leurs propriétés (Tocher, 2003). Des modifications de leurs proportions influent sur la fluidité des membranes, fragilisent les cellules et peuvent moduler le fonctionnement des cellules de l'immunité (Montero et Izquierdo, 2010). Chez le saumon nourri avec un mélange d'huiles végétales, le rapport des AG n-3/n-6 des leucocytes est notamment réduit (Petropoulos *et al.* 2009 : Hr = 100%).
- L'ARA, l'EPA et le DHA, sont également des précurseurs d'eicosanoïdes, molécules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire (Calder, 2009). Les eicosanoïdes produits à partir de l'ARA sont majoritairement pro-inflammatoires, alors que ceux dérivés de l'EPA ont majoritairement des effets anti-inflammatoires. Chez le saumon, des régimes riches en LA ou ALA modifient significativement la production de ces différents eicosanoïdes (Bell *et al.* 1993 : Hr = 100% ; Gjøen *et al.* 2004 : Hr = 100%), ce qui peut conduire à une modification des activités pro et anti-inflammatoires.
- L'EPA joue un rôle dans l'inhibition du facteur de transcription NFκB chez les mammifères. Or, ce facteur de transcription est impliqué dans diverses voies de signalisation inflammatoire (Schmitz et Ecker, 2008). Des mécanismes similaires pourraient également exister chez les poissons.

Remplacement des farines de poissons

Les facteurs anti-nutritionnels, présents dans les farines végétales et notamment dans la farine de soja, affectent l'intégrité du TD, se traduisant par une inflammation de celui-ci (Détails dans la Partie 2.4).

Différentes études ont analysé l'expression des gènes spécifiquement durant la formation d'entérites chez le saumon, lors des phases précoces d'exposition (Marjara *et al.*, 2012; Sahlmann *et al.*, 2013) ou à plus long terme dans l'intestin (Skugor *et al.*, 2011; Kortner *et al.*, 2012; De Santis *et al.*, 2015; Krogdahl *et al.*, 2015; Król *et al.*, 2016), mais également dans le foie (Kortner *et al.*, 2012; De Santis *et al.*, 2015). Alors que les modifications histologiques caracté-

ristiques de l'intestin n'apparaissent qu'après une semaine (Baeverfjord et Krogdahl, 1996), des modifications de l'expression de gènes apparaissent dès le troisième jour d'exposition (Sahlmann *et al.*, 2013).

Ces changements impliquent une augmentation de l'expression de gènes liés à la régulation et la modulation de la réponse des lymphocytes T et des lymphocytes B, à la régulation de l'apoptose, et au maintien de réponse inflammatoire *via* différents facteurs de transcription dont le NFκB. De plus, des modifications de l'expression des gènes liés à la réparation et au remodelage de la barrière épithéliale du TD ont également été retrouvées à court terme.

De nombreux progrès ont été réalisés pour améliorer la qualité des aliments pour poissons en diminuant l'impact des facteurs anti-nutritionnels. La substitution partielle des FP est possible sans impacter ni l'intégrité du TD, ni l'utilisation des nutriments, ni la croissance. Pourtant des modifications de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (prolifération cellulaire, apoptose) ont tout de même été détectées *via* des analyses du transcriptome intestinal chez le saumon, révélant ainsi la grande sensibilité de ce tissu aux facteurs anti-nutritionnels (Tacchi *et al.* 2012 : Fr = 50%).

Remplacement conjoint

L'effet du remplacement conjoint des HP et des FP sur les différentes composantes du système immunitaire n'a été que très peu étudié jusqu'à maintenant (Oxley *et al.*, 2010). Pourtant les études du transcriptome s'intéressant au remplacement conjoint révèlent des modifications de l'expression de gènes de l'immunité (Panserat *et al.*, 2009; Geay *et al.*, 2011). L'interprétation de ces résultats est toutefois complexe en raison de la multitude de facteurs nutritionnels pouvant impacter et interagir sur différents acteurs du système immunitaire.

En outre, d'autres facteurs, moins étudiés à l'heure actuelle, peuvent également moduler le système immunitaire des poissons, comme le microbiote intestinal qui joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes (Gómez et Balcázar, 2007). La bile, dont le métabolisme est altéré avec des aliments V (Paragraphe 2.5.2), peut également affecter l'immunité *via* ses propriétés anti-inflammatoires et anti-microbiennes (Bakke *et al.*, 2014).

■ ■ ■ Conclusion et résumé du chapitre 2

Bien que les matières premières d'origine marine et végétale diffèrent de façon importante sur un plan nutritionnel, les recherches en nutrition ont permis de progressivement augmenter les taux d'inclusion de matières premières d'origine végétale dans les aliments pour salmonidés en aquaculture. Si les résultats de ces recherches ont aussi permis d'identifier différents points bloquants (diminution de la consommation d'aliment, altération de l'intégrité du TD, modification du métabolisme, immunité), la suppression complète d'HP et de FP dans l'aliment impacte négativement les performances zootechniques des poissons, notamment lors des phases précoces.

À l'heure actuelle, l'utilisation d'aliments avec des taux de substitution supérieurs à 80 % n'est donc pas appliquée par les professionnels du secteur.



3

La sélection en aquaculture

3.1 La sélection génétique

La sélection est un processus ancestral qui consiste à choisir un certain nombre de reproducteurs dans une population pour créer la génération suivante avec l'objectif de faire évoluer les caractéristiques de la population en fonction des caractéristiques des reproducteurs choisis. Pour cela, différentes conditions sont nécessaires : le caractère à sélectionner doit être mesurable, c'est-à-dire qu'on peut estimer la valeur d'un individu ; une variabilité génétique doit exister au sein des populations et le caractère doit être héritable, c'est-à-dire transmissible à la descendance.

Au cours de l'histoire de l'élevage, l'homme a utilisé la sélection à son profit et a ainsi sélectionné des animaux en fonction de ses besoins pour améliorer différents caractères. Bien que la sélection ait été pratiquée dès le début de l'élevage, les objectifs de sélection ont évolué au cours du temps, en fonction de l'évolution de la société et de ses besoins. Aujourd'hui avec l'avancée des connaissances, différentes méthodes de sélection existent : la sélection individuelle, la sélection généalogique, la sélection assistée par marqueurs et maintenant la sélection génomique (Détail dans l'encart 3.1).

3.1.1 La sélection chez les espèces piscicoles

La sélection génétique en aquaculture : les caractéristiques

La sélection en aquaculture, secteur de production relativement jeune, est récente en comparaison de ce qui a été fait chez d'autres espèces d'élevage terrestre, puisque les premiers travaux datent seulement des années 1970.

La sélection d'espèces piscicoles doit, en plus, faire face à un certain nombre de spécificités. Premièrement, les manipulations des animaux sont plus contraignantes en raison de la sortie de l'eau, qui nécessite des anesthésies et engendre un stress supplémentaire chez les individus.

Encart 3.1: Les méthodes de sélection en élevage

- **La sélection individuelle** : Méthode la plus simple à mettre en œuvre, elle consiste à choisir les reproducteurs ayant les meilleures performances pour le caractère à sélectionner. Cette méthode est pertinente pour les caractères facilement mesurables et particulièrement efficace lorsqu'ils sont fortement héréditaires. Elle est également peu coûteuse à mettre en place, mais le gain génétique peut cependant être réduit à long terme en raison d'une trop forte consanguinité.
- **La sélection généalogique** : Méthode qui consiste à choisir un reproducteur sur la base de la valeur de ses parents (sélection sur ascendance), de ses descendants (sélection sur descendance) ou de l'ensemble de ses apparentés connus. Méthodes longues et coûteuses (moyens humains, organisationnels et financiers) qui nécessitent de recueillir les généalogies et les phénotypes. Ces méthodes permettent de contrôler les problèmes de consanguinité qui peuvent apparaître à long terme avec les méthodes de sélection individuelle.
- **La sélection assistée par marqueurs** : Méthode plus récente, développée grâce aux avancées dans le domaine de la génomique et de la biologie moléculaire qui ont permis d'accéder aux informations portées par les génomes et d'en identifier les zones du génome, voire les gènes liés aux différences de performance. Cette méthode consiste à repérer, à l'aide de marqueurs génétiques les régions chromosomiques, appelées QTL (quantitative trait loci), qui sont liées aux différences de performance des individus et à sélectionner les allèles intéressants à l'aide des marqueurs génétiques liés à ces QTL.
- **La sélection génomique** : Méthode qui utilise les propriétés des SNPs : marqueurs très nombreux couvrant l'ensemble du génome. Cette méthode repose sur l'établissement d'équations de prédiction, reliant les génotypes aux phénotypes, dans une population dite de référence pour laquelle on dispose à la fois des phénotypes et des génotypes. Les candidats à la sélection sont évalués, dans un second temps, sur la base de leur génotype. Ce type de sélection nécessite de disposer d'outils de génotypage haut débit et s'est donc développé récemment. Déjà appliquée chez les bovins, elle est en cours de développement pour les autres espèces d'élevage. Grâce à cette méthode, la valeur d'un individu peut être prédite précisément dès sa naissance et même sur des caractères difficiles ou coûteux à mesurer.

Certains caractères, comme la consommation d'aliment, sont difficiles à mesurer chez les poissons en raison de leur mode de vie en groupe. Deuxièmement, du fait de la petite taille des œufs et des alevins, il est impossible de marquer les individus lors des phases précoces et donc d'accéder aux généalogies, à moins de garder les différentes familles dans des bassins séparés. Dans les années 1990, le développement de marqueurs génétiques polymorphes (microsatellites puis SNPs) a permis de reconstituer les généalogies, rendant ainsi possible l'élevage de familles mélangées dans un même bassin. Ces techniques ont ainsi permis de s'affranchir des effets d'environnement classiquement obtenus lorsque chaque famille est élevée dans un bassin séparément des autres.

Malgré ces contraintes, les gains génétiques (détails dans l'encart 3.2) obtenus sont souvent plus importants que ceux obtenus pour les espèces terrestres car les poissons ont été domestiqués récemment et une forte variabilité génétique existe donc dans les populations de base (Gjedrem et Rye, 2016). De plus, la fertilité importante des poissons et leur petite taille permet de disposer d'un grand nombre de poissons et autorise l'application de fortes pressions de sélection.

La sélection génétique en aquaculture : de la recherche aux programmes de sélection

La sélection génétique des poissons, en améliorant un certain nombre de caractères essentiels pour l'élevage, a participé au développement de l'aquaculture. A l'heure actuelle, les méthodes basées sur l'information familiale et la sélection individuelle restent les plus fréquemment utilisées, mais les méthodes de sélection assistée par marqueurs et de sélection génomique commencent à être mises en place (Chavanne *et al.*, 2016).

La croissance

Le poids et la longueur des poissons ont été les premiers caractères sélectionnés (Kincaid *et al.*, 1977) et restent les plus sélectionnés aujourd'hui (Chavanne *et al.*, 2016). De manière générale, ces caractères peuvent être facilement améliorés grâce à la sélection car les héritabilités estimées chez le poisson, comme chez d'autres espèces d'élevage, sont moyennes à élevées (Le Boucher *et al.*, 2013).

Dès la fin des années 1960, des sélections expérimentales sur la croissance ont été effectuées chez la TAC (Kincaid *et al.*, 1977; Gjerde, 1986; Kause *et al.*, 2005; Janhunen *et al.*, 2012; Leeds *et al.*, 2016). En France, le programme PROSPER (PRocédure Optimisée de Sélection individuelle Par Épreuves Répétées) a permis des progrès génétiques d'environ 21,5 % par génération pour le poids chez la truite commune en constituant une population de base avec une large variabilité génétique et en contrôlant les problèmes d'interactions sociales et les effets maternels (Chevassus *et al.*, 2004).

La qualité des produits

Les caractères liés à la qualité des produits (la morphologie comme critère indirect du rendement, les taux de lipides corporels, la couleur de la chair, ou encore les rendements en carcasses et en filets) ont fait l'objet de divers programmes de recherches génétiques puis ont été largement introduits dans les programmes de sélection (Chavanne *et al.*, 2016), en raison de leur intérêt, à la fois pour les éleveurs et les consommateurs.

Encart 3.2: La sélection génétique

La valeur phénotypique de chaque caractère peut être décomposée en une composante génétique, une composante non génétique (composante environnementale) et une interaction entre la composante génétique et la composante environnementale.

$$P = G + E + G \times E$$

La composante génétique G peut être encore divisée en plusieurs composantes : une composante génétique additive (A), une composante génétique de dominance (D) et une composante d'épistasie (I). On a donc :

$$P = A + D + I + E$$

La sélection génétique s'appuie sur la valeur génétique (A), car elle est transmissible entre parents et descendants, à l'inverse de (D) et (I) qui correspondent aux effets d'interactions entre les allèles et aux effets d'interactions entre les gènes, respectivement. L'héritabilité correspond à la part de la variabilité d'origine génétique dans la variabilité totale du caractère et elle détermine donc en partie l'efficacité que pourrait avoir la sélection.

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

L'héritabilité est comprise entre 0 et 1. Plus la composante génétique est importante, plus l'héritabilité sera élevée et plus le caractère sera facile à sélectionner. Généralement, on considère que les héritabilités faibles sont inférieures à 0.2, les héritabilités moyennes sont comprises entre 0.2 et 0.4 et les héritabilités fortes dépassent 0.4.

Les résultats obtenus au cours du temps grâce à la sélection individuelle se calculent grâce aux gains génétiques.

$$\Delta G = i \times h^2 \times \sigma_P^2$$

Les gains génétiques, calculés en unité du caractère étudié, dépendent donc de l'héritabilité des caractères h^2 , de la pression de sélection (i) et de l'écart-type phénotypique du caractère σ_P^2 .

La résistance à différents pathogènes

La résistance à différents pathogènes a fait l'objet de multiples travaux de recherches. La résistance à certains virus est héritable (Quillet *et al.*, 2007). La recherche de QTL s'est révélée comme une méthode adéquate pour étudier la résistance aux maladies (Nichols *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004), pour ensuite mettre en place la sélection. Depuis peu, des TAC sont sélectionnées pour la résistance à une maladie virale, la NPI (Nécrose pancréatique infectieuse) (Source : Société Aquagen).

L'efficacité alimentaire est le ratio entre le gain de poids d'un individu et la quantité d'aliment ingérée. Plus ce ratio est élevé, plus le poisson retient et transforme l'aliment. Sélectionner ce caractère permettrait donc d'augmenter la rentabilité des élevages, tout en maîtrisant l'impact environnemental (Besson *et al.*, 2017). Malheureusement, à l'inverse des animaux terrestres, il est aujourd'hui très difficile d'estimer l'efficacité alimentaire individuelle des poissons élevés en groupe (Paragraphe 3.1.1). La sélection sur ce caractère n'est possible à l'heure actuelle qu'en utilisant des critères indirects et seulement deux programmes de sélection en Europe les intègrent chez la TAC (Chavanne *et al.*, 2016).

3.2 La sélection génétique en aquaculture et les aliments à base de végétaux

Depuis les années 1990, les formules des aliments aquacoles, notamment pour les salmonidés, ont connu une évolution importante avec la diminution progressive des proportions d'huiles et des farines de poissons (HP et FP, respectivement), remplacées par des matières premières végétales (Chapitre 1).

Dans ce contexte, les recherches se sont focalisées sur la possibilité de sélectionner des poissons sur leur capacité à utiliser ces nouveaux aliments et ont donc cherché à répondre à différentes questions :

- Existe-t-il, au sein des populations de TAC, des génotypes avec de meilleures capacités à survivre et à grandir lorsqu'ils sont nourris avec des aliments V ? Si oui, la variabilité génétique associée à ces différences de performance est-elle sélectionnable ?
- Quel est l'impact de l'évolution des formules alimentaires sur les progrès génétiques obtenus par la sélection ? En d'autres termes, les individus sélectionnés avec des aliments classiques (contenant des proportions importantes de HP et de FP) sont-ils aussi les individus les plus performants lorsqu'ils sont nourris avec un aliment riche en matières premières d'origine végétale (*i.e.* interactions génétique \times aliment) ?

3.2.1 Existence d'une variabilité génétique au sein des populations de truite

Chez la TAC, l'existence d'une variabilité génétique pour la capacité à survivre et grandir avec des aliments V a été démontrée en comparant les performances de différentes familles nourries avec ces aliments (Blanc 2002, Dupont-Nivet *et al.* 2009, Projet VEGEAQUA). Par la suite, les héritabilités ont été estimées pour la survie, la croissance, la consommation

Tableau 3.1 – Héritabilité de différents caractères zootechniques chez différentes espèces de salmonidés nourris avec des aliments témoins (Aliment M) ou des aliments formulés avec des matières premières d'origine végétale (Aliment V) (Source (Le Boucher *et al.*, 2013))

Espèce	Taux de substitution	Période suivie	Caractère	Héritabilité		Référence
				Aliment M	Aliment V	
TAC	Huile = 62,7% / Farine = 93,7%	1 ^{er} repas - 600g	Poids	0,32±0,07	0,31±0,07	Pierce <i>et al.</i> 2008
			Poids	0,61±0,12	0,67±0,12	
	Huile = 100% et / Farine = 100%	1 ^{er} repas - 400g	Longueur	0,55±0,11	0,59±0,12	
			Taux de croissance	0,46±0,10	0,65±0,12	Le Boucher <i>et al.</i> 2011
Corégone	Huile = 0% et / Farine = 100%	40 - 130g	Rendement carcasse (%)	0,48±0,11	0,49±0,11	
			Rendement filet (%)	0,21±0,18	0,23±0,07	
			Gain journalier	0,26±0,18	0,20±0,15	Quinton <i>et al.</i> 2007a
			Ingéré	0,23±0,15	0,17±0,15	
			Taux de lipides	0,21±0,06	0,18±0,06	Quinton <i>et al.</i> 2007b
			Taux de protéines	0,07±0,04	0,06±0,04	

d'aliment et l'efficacité alimentaire, principaux caractères d'intérêt pour l'élevage. Les résultats des différentes études sont résumés dans le Tableau 3.1. Pour la plupart des cas étudiés, des valeurs d'héritabilité moyennes à élevées ont été trouvées avec des aliments V, notamment pour la TAC. Ces résultats prouvent l'existence d'une variabilité génétique au sein des populations de salmonidés nourris avec de l'aliment V, qui pourrait donc être sélectionnée.

3.2.2 Existence d'une interaction génotype \times environnement

La question de l'existence d'interactions génétique \times environnement (IGE), notamment des interactions génétique \times aliment, est essentielle en sélection et particulièrement dans le contexte actuel où les formules alimentaires évoluent rapidement. En effet, en cas d'interactions, les individus sélectionnés lorsqu'ils sont nourris avec un **aliment -A-** ne seront pas forcément ceux avec les meilleures performances lorsqu'ils le seront avec un **aliment -B-** et les gains génétiques pourraient être inférieurs à ceux attendus. Plusieurs cas sont possibles (Figure 3.1) :

- Dans le premier cas, les performances des différents individus sont influencées par l'environnement (l'aliment dans notre cas), mais l'écart entre les performances et les classements reste inchangé quel que soit l'environnement. Dans ce cas, l'interaction est nulle et le progrès génétique n'est pas affecté.
- Dans le second cas, les performances des différents individus sont influencées par l'environnement. Bien que le classement des individus reste inchangé, l'IGE est significative et les progrès génétiques dans le second environnement pourraient être modifiés. On parle d'interaction d'échelle.
- Dans le dernier cas, les performances sont influencées et les classements des individus sont modifiés. Ce dernier cas, où l'IGE est significative, est particulièrement problématique car les individus sélectionnés dans l'environnement 1 (avec l'**aliment -A-**) ne sont pas les plus performants dans l'environnement 2 (avec l'**aliment -B-**). Les gains génétiques attendus seront donc surestimés. Plus les reclassements sont importants, plus il est nécessaire de repenser les schémas de sélection et prendre en compte les performances des poissons dans les différents environnements.

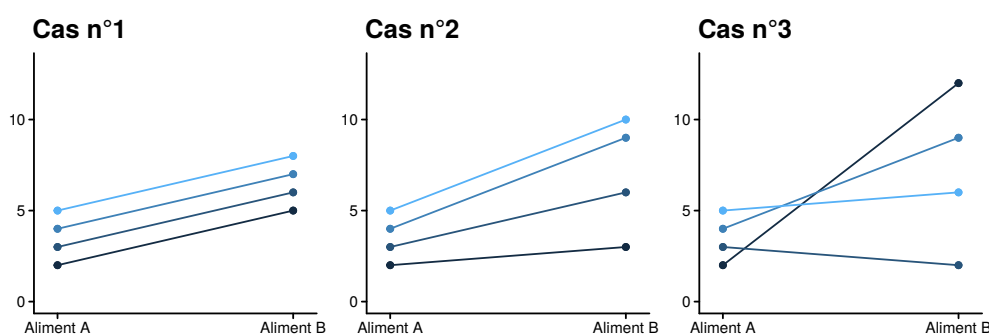


FIGURE 3.1 – Différents cas possibles pour les interactions génétique \times environnement

En ce qui concerne les aliments V, les IGE ont été estimées dans plusieurs études chez les salmonidés (Blanc, 2002; Palti *et al.*, 2006; Quinton *et al.*, 2007b,a; Pierce *et al.*, 2008;

Chapitre 3. La sélection en aquaculture

Dupont-Nivet *et al.*, 2009; Le Boucher *et al.*, 2011). Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.2.

Les résultats varient de façon importante entre les différentes études, notamment en fonction des formules des aliments utilisés et également des stades de croissance étudiés. Alors que les résultats ne montrent pas d'IGE significatifs pour le corégone (Quinton *et al.*, 2007a,b), plusieurs études ont montré des interactions significatives pour la TAC (Dupont-Nivet *et al.*, 2009; Le Boucher *et al.*, 2011). Bien que faibles, ces interactions sont d'autant plus importantes que les taux de remplacement sont élevés et lors des stades précoces où la croissance est intense (Le Boucher *et al.*, 2011).

Tableau 3.2 – Résultats de différentes études portant sur l'évaluation des interactions génétique × aliment chez différentes espèces de salmonidés (Source Le Boucher *et al.* 2013).

Espèce	Taux de substitution		Période	Caractère	IGE	Référence
	Hr	Fr				
TAC	0%	47.6%	1 ^{er} repas - 5g	Poids	oui	Blanc 2002
	0%	87%	1 ^{er} repas - 380g	Poids, Longueur	non	Palti <i>et al.</i> 2006
	62.7%	93.7%	1 ^{er} repas - 600g	Poids	oui	Pierce <i>et al.</i> 2008
	0%	100%	1,2 - 4,2g	Poids	oui	Dupont-Nivet <i>et al.</i> 2009
				Longueur	oui	
				Efficacité alimentaire	oui	
	100%	100%	1 ^{er} repas - 400g	Poids	oui	Le Boucher <i>et al.</i> 2011
				Longueur	oui	
				Taux de croissance	oui	
				Rendement carcasse (%)	oui	
Corégone	0%	100%	40 - 130g	Gain journalier	non	Quinton <i>et al.</i> 2007a
				Ingéré	non	
				Taux de lipides	non	Quinton <i>et al.</i> 2007b
				Taux de protéines	non	

3.2.3 Sélection sur la croissance des poissons nourris avec de l'aliment végétal

Au vu des résultats obtenus sur les questions de l'existence de variabilité génétique et d'IGE significatives, sélectionner des individus sur leur capacité à grandir avec des aliments V apparaît comme une possibilité pour continuer de développer la filière piscicole. Pourtant, seulement trois programmes de recherche se sont attachés à cette question, à ce jour :

- Une lignée de Saumon masou (*Oncorhynchus masou ishikawae*) a été sélectionnée sur sa capacité à grandir avec un aliment V pauvre en FP (Fr = 95%, Hr = 0%) mais contenant des HP pendant 3 générations. Des saumons ($10,3 \pm 1,8$ g) ont ainsi été nourris avec l'aliment pauvre en FP pendant 3 mois. À la fin de ces 3 mois, les saumons ont été triés sur leur taille et 16% des poissons ont été conservés pour la génération suivante (Yamamoto *et al.*, 2014).
- Une lignée de TAC Américaine (H-ARS) a été sélectionnée sur sa capacité à grandir

avec un aliment V dépourvu de FP contenant des HP (Fr = 100%, Hr = 0%), pendant 4 générations (Overturf *et al.*, 2013a; Abernathy *et al.*, 2017). La population de base a été créée à partir de poissons de 8 lignées différentes (HSC, R9, Kamloops, Fish Lake (FL), Shasta, and Arlee et Donaldson strain). Les poissons ont été triés sur leur poids, avec une pression de sélection de 15%.

- L'INRA a sélectionné une lignée de TAC (Lignée SU) sur sa capacité à survivre et grandir avec un aliment V totalement dépourvu à la fois de FP et d'HP (Fr = 100% ; Hr = 100%), dès le premier repas. Pour la 1^{re} génération de sélection, des alevins issus d'un croisement factoriel de 44 mâles et 32 femelles d'une lignée maintenue avec une grande variabilité génétique (Lignée SY) ont été produits. Dès leur premier repas, les alevins ont été nourris avec un aliment 100% V. Les poissons ont été sélectionnés sur leur survie et sur leur croissance (longueur). Quatre tris successifs ont été effectués entre le deuxième mois et le treizième mois et 3,9% des poissons ont été conservés (Le Boucher *et al.*, 2012).

Efficacité de la sélection

Pour les trois études citées ci-dessus, l'efficacité de la sélection a été testée pour les différents caractères sélectionnés (survie et croissance). Un résumé des gains génétiques obtenus est présenté dans la Figure 3.2.

Saumon masou

L'efficacité de la sélection a été testée après une, deux et trois générations de sélection (Yamamoto *et al.*, 2014, 2015, 2016). Des poissons de la lignée sélectionnée et des poissons de la lignée témoin, non sélectionnée (~5 g) ont été nourris avec un aliment traditionnel ou un aliment V (Fr = 95%, Hr = 0%) pendant 10 semaines.

Alors que l'efficacité de la sélection était limitée en première génération de sélection, les poissons sélectionnés étaient 53,1% et 54,3% plus gros que les poissons témoins lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V, après deux et trois générations de sélection, respectivement. Les taux de croissance lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V, ont été, eux aussi, significativement améliorés après deux et trois générations de sélection (+53,8 et +46,7%). Les poissons sélectionnés nourris avec un aliment à base de protéines végétales ont atteint le même poids que les poissons témoins nourris avec un aliment riche en FP, après 3 générations de sélection, confirmant ainsi l'efficacité de la sélection.

Bien que les performances des poissons sélectionnés nourris avec un aliment M aient également été améliorés après deux et trois générations de sélection, les gains génétiques obtenus avec l'aliment V étaient supérieurs, confirmant une certaine spécificité de la sélection pour cet aliment.

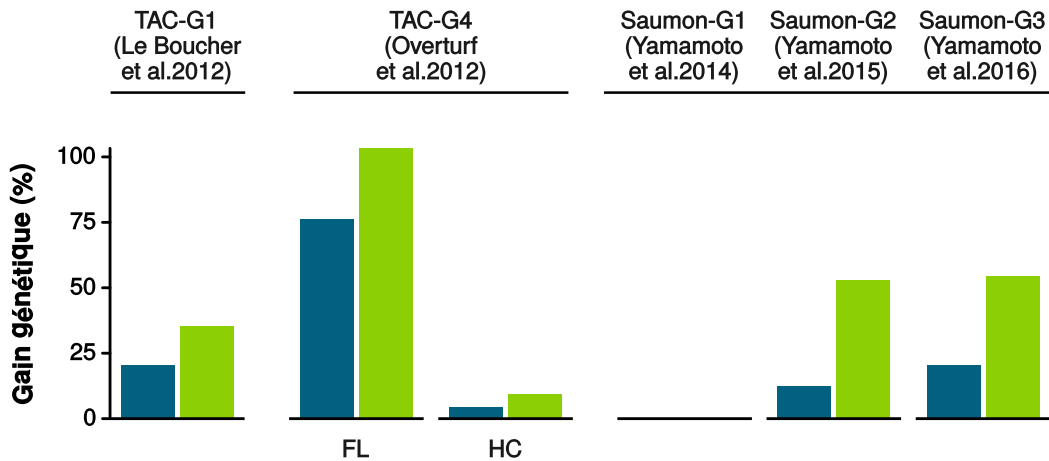
TAC H-ARS Américaine

L'efficacité de la sélection a été testée lors d'une expérimentation de 12 semaines, où des poissons de la lignée sélectionnée (H-ARS) et des poissons de deux lignées parentales, FL et HSC (30±1,6 g) ont été nourris avec un aliment traditionnel ou l'aliment V (Fr = 100%, Hr = 0%).

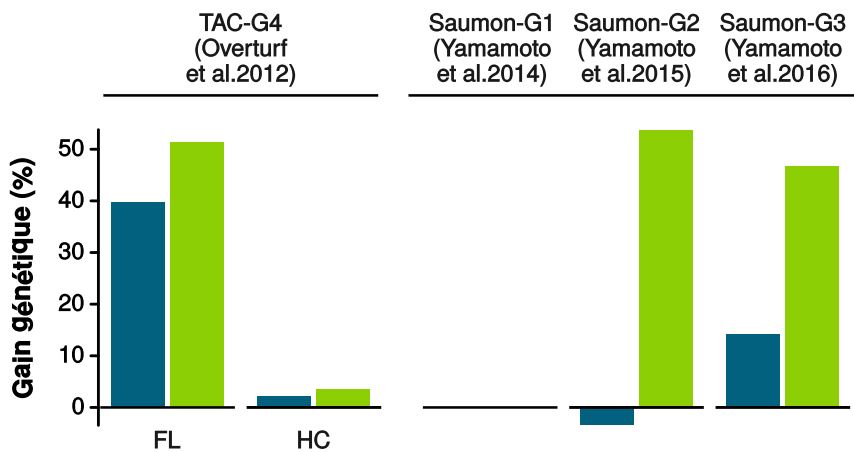
Les résultats obtenus après 4 générations de sélection semblaient mitigés, l'expérimentation

Chapitre 3. La sélection en aquaculture

Poids



SGR



Survie

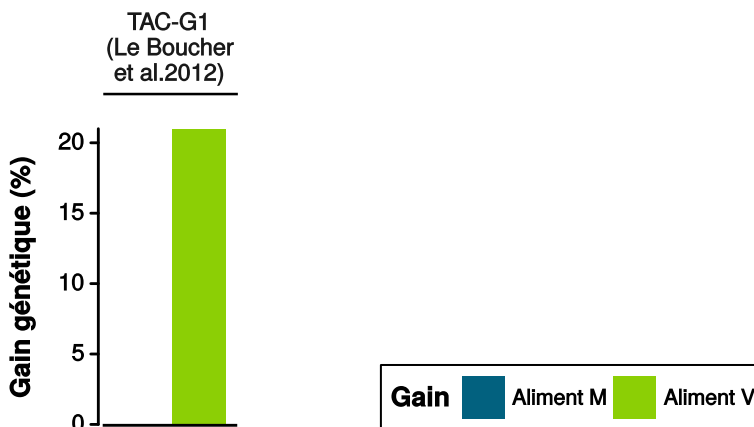


FIGURE 3.2 – Résumé des gains génétiques obtenus pour le poids, la croissance (SGR) et la survie pour les trois sélections expérimentales. Les gains obtenus avec l'aliment V et l'aliment M sont calculés comme $\text{Gain V} = 100 \times \frac{X_{S-V} - X_{T-V}}{X_{T-V}}$ et $\text{Gain M} = 100 \times \frac{X_{S-M} - X_{T-M}}{X_{T-M}}$, avec X_S et X_T , les performances des poissons sélectionnés et témoin, respectivement. Pour la lignée de TAC Américaine (Overturf *et al.*, 2013a), les populations témoins sont deux des populations fondatrices, FL et HC.

manquant d'une lignée témoin non sélectionnée.

D'un côté, la sélection a amélioré les performances de la lignée sélectionnée (H-ARS) puisque les poissons sélectionnés étaient 103,3% plus gros et avaient un taux de croissance 51,7% plus important que celui des poissons de la lignée FL, lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V. D'un autre côté, lorsque les performances des poissons ont été comparées à celles de l'autre lignée, HSC, les gains génétiques étaient très faibles (+9,2% et 3,7% pour le poids et le taux de croissance, respectivement). Cette dernière lignée est une souche sélectionnée pour la croissance depuis plusieurs générations et ces performances lorsque les poissons sont nourris avec un aliment à base de protéines végétales sont déjà excellentes. Les gains après 4 générations de sélection semblaient donc très limités.

TAC de l'INRA

Afin de tester l'efficacité de la sélection, les poissons de la lignée sélectionnée (SU) et de la lignée témoin (SY) ont été nourris dès leur premier repas avec un aliment V (Fr = 100% ; Hr = 100 %), ou avec un aliment M, pendant 350 jours. Le poids et la survie des poissons ont été suivis tout au long de l'expérimentation.

Après une génération seulement, la sélection a significativement amélioré la survie (+15,1%) et la croissance (+35,3%) des poissons sélectionnés lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V, confirmant ainsi l'efficacité de la sélection. Le poids des poissons a été également amélioré lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M, mais les gains obtenus étaient moindres. La sélection était donc en partie spécifique de l'aliment V.

3.2.4 Fonctions impliquées dans la capacité des salmonidés à survivre et grandir avec des aliments végétaux ?

Grâce aux différentes études menées jusqu'à aujourd'hui, il est maintenant démontré qu'il existe au sein des populations de salmonidés, des individus ayant de meilleures capacités pour survivre et pour grandir avec des aliments V et que cette variabilité a une base génétique. Bien que plusieurs points bloquants aient été identifiés pour l'utilisation d'aliments V hautement substitués (consommation d'aliment, digestion et absorption des nutriments, altération du métabolisme et de l'immunité), les mécanismes à l'origine des différences de croissance entre les génotypes lorsque les poissons ont été nourris avec des aliments V n'ont été que très peu étudiés à l'heure actuelle.

Consommation d'aliment

La consommation d'aliment est l'un des premiers points limitants pour le remplacement des FP (Paragraphe 2.3). Or, il existe une variabilité génétique dans les populations de TAC pour la consommation d'aliment lorsque les poissons ont été nourris avec des aliments V (Dupont-Nivet *et al.* 2009, Fr = 100%).

La sélection génétique a permis d'améliorer la consommation d'aliment des poissons nourris avec des aliments contenant de faible proportion de FP. Chez le saumon masou, les poissons sélectionnés avaient une consommation d'aliment 17,5 et 20,1% supérieure à celle des poissons non sélectionnés après deux et trois générations de sélection, respectivement (Yamamoto *et al.*, 2015, 2016). De même, les TAC Américaines sélectionnées sur leur capacité à utiliser un

Chapitre 3. La sélection en aquaculture

aliment sans FP, avaient également une consommation d'aliment significativement améliorée en comparaison de la lignée témoin FL (+26,1%, Overturf *et al.* 2013a). Chez la lignée de TAC sélectionnée par l'INRA, aucune différence de consommation d'aliment n'a été détectée après une génération de sélection.

Digestion et absorption des nutriments

Le deuxième point potentiellement bloquant pour le remplacement complet des HP et des FP est la digestion et l'absorption des nutriments (Paragraphe 2.4), en raison de la présence potentielle de différents facteurs anti-nutritionnels dans les farines végétales (Krogdahl *et al.*, 2010).

Chez la lignée de TAC Américaine H-ARS, la sélection a permis d'améliorer de façon significative l'état du TD, avec notamment une moindre prolifération des cellules intestinales en comparaison de la lignée témoin (Venold *et al.*, 2012). Cette amélioration de la structure du TD explique, en partie, l'amélioration de l'efficacité alimentaire et de la rétention des protéines observées chez cette lignée (Overturf *et al.*, 2013a; Venold *et al.*, 2012).

Chez le saumon masou, bien que la sélection ait permis d'améliorer la proportion d'acides biliaires conjugués dans le foie lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V, l'effet de cet aliment sur l'état du TD était toujours important chez les poissons sélectionnés issus de la troisième génération de sélection (Yamamoto *et al.*, 2016).

Métabolisme

Une altération du métabolisme est communément observée avec l'augmentation des proportions de matières premières d'origine végétale dans les aliments en remplacement des ressources d'origine marine (HP et FP).

La comparaison des transcriptomes hépatiques de deux familles de bar (~192g), ayant des performances de croissance contrastées lorsque les poissons sont nourris avec un aliment 100% V, a permis d'identifier 199 gènes différentiellement exprimés entre ces deux familles et qui pourraient être à l'origine des différences de croissance observées. Ce nombre de gènes est faible en comparaison des gènes dont l'expression avait été influencée par le régime (199 *versus* 582 gènes). Parmi ces gènes, certains impliqués dans la synthèse protéique étaient plus exprimés chez la famille avec la meilleure croissance, révélant un taux de renouvellement protéique plus élevé. Des gènes impliqués dans la synthèse d'ATP étaient également plus exprimés chez cette même famille, permettant ainsi de produire l'énergie nécessaire pour la synthèse protéique (Geay *et al.*, 2011). Aucun gène lié au métabolisme du cholestérol ou des lipides n'a pas été trouvé différentiellement exprimé entre ces deux familles (Geay *et al.*, 2011).

Le métabolisme des lipides

Les voies du métabolisme lipidique sont particulièrement altérées par l'aliment V. De plus, des modifications de la localisation des dépôts lipidiques des poissons, ainsi que les teneurs en AGPI-LC n-3 de leur chair sont constatées avec l'alimentation à base de végétaux (Paragraphe 2.5.2). Pour ces deux raisons, le métabolisme lipidique a été particulièrement étudié et ces études ont permis de prouver l'existence d'une variabilité génétique pour l'expression d'un certain nombre de gènes.

Des études récentes ont démontré l'existence d'une variabilité pour la synthèse et la rétention de l'EPA et du DHA chez différents génotypes de TAC (Overturf *et al.*, 2013b) et chez le saumon (Leaver *et al.*, 2011).

L'étude du transcriptome hépatique de deux lignées, grasse et maigre, de saumon ayant des profils en AGPI-LC contrastés (Morais *et al.*, 2011a), a permis de révéler un certain nombre de gènes différentiellement exprimés entre ces lignées quand elles sont nourries avec un aliment V (Hr = 100%). Parmi ces gènes, certains facteurs de transcription (PPAR et SREBP), des gènes de la bioconversion des AG (elongase, desaturase $\Delta 5$ et $\Delta 6$), des gènes impliqués dans le transport des AG (apolipoprotéines) et dans le métabolisme du cholestérol, sont différentiellement exprimés entre ces deux lignées de saumons (Morais *et al.*, 2011a).

Le contenu en AGPI-LC n-3 de leur chair semblait lié à des différences d'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, du métabolisme des lipoprotéines, du transport des lipides et de la production d'eicosanoïdes (Morais *et al.*, 2011a,b).

Immunité

Les différentes études citées précédemment ont identifié un grand nombre de gènes liés à la réponse immunitaire et plus particulièrement au complément et à la réponse inflammatoire, différentiellement exprimés entre les familles de bar (Geay *et al.*, 2011) et les lignées grasse et maigre de saumon (Morais *et al.*, 2011a). Des résultats similaires ont été retrouvés chez la TAC où la majorité des gènes différenciant des familles ayant des croissances contrastées avec un aliment V était liée à l'immunité (Overturf *et al.*, 2012).

■ ■ ■ Conclusion et résumé du chapitre 3

Bien que la sélection génétique en aquaculture soit récente, elle a permis d'améliorer un certain nombre de caractères au fil des années. Dans le contexte actuel où les formules des aliments aquacoles doivent évoluer rapidement mais où l'introduction des matières premières d'origine végétale affecte négativement les performances des poissons (Chapitre 2), la confirmation de l'existence d'une variabilité génétique au sein des populations pour l'utilisation des aliments formulés à base de végétaux souligne l'intérêt d'utiliser la sélection génétique pour continuer le développement durable du secteur aquacole.

Les résultats obtenus lors des premières études de sélection chez les salmonidés sont très prometteurs. Cependant les modifications génétiques et génomiques liées à la capacité des poissons à survivre et à grandir avec des aliments V fortement substitués ne sont pas bien connus à l'heure actuelle.

2

Le travail de thèse

4	Problématique	53
5	Matériels et méthodes	55
5.1	Les aliments expérimentaux	
5.2	Le matériel animal	
5.3	Les protocoles expérimentaux	

Pour assurer son développement durable, l'aquaculture doit diminuer sa dépendance vis-à-vis des HP et des FP.

Les recherches en nutrition réalisées depuis les années 1990 ont permis d'améliorer les formulations alimentaires pour la TAC, et aujourd'hui les HP et les FP peuvent être remplacées à hauteur d'environ 80% par des matières premières d'origine végétale (Medale *et al.*, 2013). Avec cette progression, le ratio "Fish In/Fish Out" (FIFO), qui permet d'estimer la quantité de poisson nécessaire (en kg) pour produire 1kg de poisson d'élevage¹, a significativement diminué, au cours de ces 15 dernières années. Tacon et Metian ont ainsi estimé que ce ratio était passé de 6,0 à 3,4 pour l'élevage de la TAC entre 1995 et 2006 (Tacon et Metian, 2008). Pourtant, bien que les proportions d'HP et de FP dans les aliments aient diminué au fil du temps, passant de 60% en 1995 à environ 30% en 2010, les quantités totales utilisées sont restées relativement stables (Tacon *et al.*, 2011). En effet, alors que 235 et 118 mille tonnes d'HP et de FP étaient utilisées en 1995 pour l'élevage des TAC, 190 et 126 mille tonnes seront nécessaires en 2020 (Tacon *et al.*, 2011).

Il est donc indispensable d'aller plus loin dans la substitution pour que l'aquaculture s'affranchisse des ressources marines et devienne productrice nette de poissons. Mais des taux de substitutions plus élevés (supérieur à 80 %) affectent négativement les performances des poissons, notamment lors des phases précoces. En raison de l'existence d'une variabilité pour l'utilisation des aliments, la sélection génétique est aujourd'hui une autre solution envisagée pour continuer d'augmenter la proportion d'huiles et de farines végétales dans les aliments pour salmonidés (Le Boucher *et al.*, 2012).

Cependant, un nombre très limité d'études s'est intéressé aux mécanismes liés aux différences phénotypiques observées entre les différents génotypes. De manière générale, alors que

1. Pour un FIFO = 3,4, il faudrait donc 3,4 kg de poissons issus de la pêche minotière pour produire 1 kg de poisson.

Chapitre 4. Problématique

les études transcriptomiques portant sur les effets des aliments V ont permis d'identifier de nombreux gènes, celles s'étant intéressées au génotype n'ont détecté que peu de différences, probablement en raison d'un manque de puissance statistique. De plus, aucune étude n'a examiné les stades précoces, alors qu'ils sont essentiels et déterminent les futures performances (Le Boucher *et al.*, 2011; Balasubramanian *et al.*, 2016).

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR Agreenfish et elle a pour but d'étudier les fonctions liées à la capacité de certains individus à utiliser un aliment 100% V et ce afin d'identifier les freins au remplacement complet des HP et des FP. Pour cela, des approches avec ou sans *a priori* et sur du matériel animal complémentaire ont été utilisés.

Dans une première partie, j'ai travaillé avec trois lignées isogéniques de truites présentant l'avantage d'avoir des performances de croissance similaires lorsqu'elles sont nourries avec un aliment M, mais des performances très contrastées lorsqu'elles sont nourries avec un aliment V. Ces lignées constituent donc un excellent modèle pour explorer notre question. Les objectifs étaient :

- (i) Identifier des gènes, *via* une analyse du transcriptome, qui expliqueraient les différences de performances entre les trois lignées, au cours des phases précoces (5 semaines après la première alimentation).
- (ii) Identifier des gènes, *via* une analyse du transcriptome à plus long terme (6 mois), sur le foie et l'intestin distal, organes clefs pour l'utilisation des aliments. En parallèle, différents phénotypes ont également été étudiés.

Ces résultats sont présentés dans les **chapitres 6 et 7**.

Dans une seconde partie, j'ai étudié la lignée de TAC sélectionnée par l'INRA, avec deux objectifs :

- (i) Confirmer l'efficacité de la sélection après deux, trois et quatre générations de sélection.
- (ii) Tester la spécificité de la sélection, pour évaluer dans quelle mesure l'adaptation est liée à l'aliment 100% V.
- (iii) Comprendre par quelle stratégie les poissons sélectionnés se sont adaptés à l'aliment 100% V. Pour cela, différents caractères liés à la nutrition ont été étudiés.
- (iv) Analyser l'expression des gènes précédemment identifiés dans la première partie de la thèse, chez les lignées, sélectionnée et témoin, qui expliqueraient la meilleure utilisation de l'aliment V par la lignée sélectionnée.

Les résultats des parties (i), (ii) et (iii) sont présentés dans le **chapitre 8**. Les résultats de la partie (iv) sont présentés dans le **chapitre 9**.

5

Matériels et méthodes

5.1 Les aliments expérimentaux

Les différents aliments expérimentaux utilisés ont été formulés et produits par l'Unité Mixte de Recherche Nutrition, Métabolisme, Aquaculture (NuMÉA, à Saint-Pée-sur-Nivelle, INRA, France) : des aliments M et V extrêmes et deux aliments incluant des matières premières alternatives. Un aliment commercial C a également été utilisé. Ces aliments ont été formulés pour répondre aux besoins nutritionnels de la TAC (NRC, 2011).

5.1.1 Les aliments M et V

L'aliment M

L'aliment M a été formulé à base d'HP, de FP et de blé entier. Un mélange de vitamines et de minéraux essentiels a été ajouté à l'aliment (Tableau 5.1).

L'aliment 100% V

L'aliment 100% V était dépourvu d'HP et de FP, remplacées par un mélange d'huiles et de farines végétales.

La nature et les proportions des matières premières utilisées pour l'aliment V ont légèrement changé pour les différentes expérimentations dont les données ont été utilisées au cours de la thèse (V_{old} et V). Ces modifications sont notamment dues à l'amélioration des connaissances en nutrition (ajout d'un attractant), mais également en raison de la disponibilité de certaines matières premières (farine de soja).

Pour toutes ces expérimentations, les farines végétales utilisées étaient des farines de blé, de féverole et de lupin blanc doux. Pour assurer un apport en protéines adéquat, du gluten de maïs, du gluten de blé, du tourteau de soja, des concentrés protéiques (pois) ont été incorporés. Afin d'équilibrer le profil en AA, de la lysine et de la méthionine ont été ajoutées au mélange pour couvrir les besoins. Les HP ont été remplacées par un mélange d'huiles végétales (colza,

Chapitre 5. Matériels et méthodes

Tableau 5.1 – Ingrédients et composition des différents aliments expérimentaux V et M (MS : matière sèche)

	Aliment <i>V_{old}</i>	Aliment V	Aliment M
Ingrédients (%)			
Farine de poisson (Sopropêche, France)	0	0	65
Blé entier (SudOuest Aliment, France)	0	4	21
CP de févérole	0	10	0
Gluten de maïs (CP 60 ; Inzo, France)	25	17	0
Gluten de blé (CP 70 ; Roquette, France)	23,9	17	0
Tourteau de soja (CP 48 ; Inzo, France)	20,8	12	0
Farine de lupin (Terrena, France)	7	5	0
CP de pois lysaminé (Aquatex, Sotexpro, France)	0	12,5	0
Huile de poissons (Sopropêche, France)			
Huile de colza (Daudruy, France)	6,2	6	0
Huile de lin (Daudruy, France)	3,7	3,6	0
Huile de palme (Daudruy, France)	2,4	2,4	0
Lécithine de soja (Louis François, France)	2	2	0
L-Lysine (Eurolysine)	1,5	0,5	0
L-Méthionine (Evonik, Germany)	0	0,5	0
CaHPO ₄ .2H ₂ O (18%P ; 22%Ca)	3,5	3	0
Min. and Vit. premix, INRA ^a	2	3	3
Attractant mix ^b	0	1,5	0
Composition (% MS)			
Matière sèche	94,1	96,9	97,6
Protéines brutes	50,5	51,4	50,1
Matières grasses	16,2	18,5	19,4
Amidon	-	9,6	14,1
Cendre	5,6	6,5	12,7
Énergie (kJ/g MS)	23,2	23,6	22,6
Acide gras (% des acides gras totaux)			
AG saturés	16,3	19,8	39,2
AG Mono-insaturés	40,7	39,0	29,5
Poly-insaturés n-6	22,5	24,0	4,7
→ 18 :2 n-6 (LA)	22,2	24,0	3,2
Poly-insaturés n-3	20,6	17,1	19,3
→ 18 :3 n-3 (ALA)	20,6	17,1	1,1
→ 20 :5 n-3 (EPA)	0,0	0,0	9,5
→ 22 :6 n-3 (DHA)	0,0	0,0	5,2

^aMineral premix (g or mg kg⁻¹ diet) : calcium carbonate (40% Ca), 2,15 g ; magnesium oxide (60%Mg), 1,24 g ; ferric citrate, 0,2 g ; potassium iodide (75%I), 0,4 mg ; zinc sulphate (36%Zn), 0,4 g ; copper sulphate (25%Cu), 0,3 g ; manganese sulphate (33%Mn), 0,3 g ; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g ; cobalt sulphate, 2 mg ; sodium selenite (30%Se), 3 mg ; KCl, 0,9 g ; NaCl, 0,4 g (UPAE, INRA) ; And Vitamin premix (IU or mg kg⁻¹ diet) : DL-a tocopherol acetate, 60 IU ; sodium menadione bisulphate, 5 mg ; retinyl acetate, 15,000 IU ; DL-cholecalciferol, 3,000 IU ; thiamin, 15 mg ; riboflavin, 30 mg ; pyridoxine, 15 mg ; B12, 0,05 mg ; nicotinic acid, 175 mg ; folic acid, 500 mg ; inositol, 1,000 mg ; biotin, 2,5 mg ; calcium pantothenate, 50 mg ; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA).

^bAttractant mix : glucosamine, 0,5 g ; taurine, 0,3 g ; betaine, 0,3 g ; glycine, 0,2 g ; alanine, 0,2 g.

de lin et de palme) complété par de la lécithine de soja afin d'apporter les phospholipides indispensables. Un mélange attractant et un mélange de vitamines et de minéraux essentiels ont aussi été ajouté à l'aliment V (Tableau 5.1).

Les deux aliments ont été formulés afin qu'ils soient isolipidiques, isoprotéiques et isoénergétiques et contenaient environ 50% de protéines et 19% de lipides. En raison de la présence de blé entier en quantité importante dans l'aliment M, ce dernier est plus riche en amidon que l'aliment V (14,1 *versus* 9,6%).

5.1.2 L'aliment commercial C

L'aliment commercial C est un aliment de la gamme B MEGA 20 du fournisseur "Le Gouessant". Cet aliment est formulé avec un mélange d'HP et de FP mais contient également des matières premières d'origine végétale. Il contient 40% de protéines et 28% de lipides. La formule précise n'est pas connue.

5.1.3 Les deux autres aliments alternatifs, T et V_{alt}

Dans le contexte où les formules des aliments aquacoles évoluent rapidement, notamment avec l'arrivée sur le marché de nouvelles matières premières (algues, farines d'insectes) et la ré-autorisation de certaines comme les PAT, deux autres aliments alternatifs ont également été testés afin d'évaluer la spécificité de la sélection (Détail dans le paragraphe 5.3.2). Le premier est formulé avec des matières premières d'origine terrestre (Aliment T). Le second est formulé à base de matières premières végétales alternatives (V_{alt}) (Tableaux 5.2 et 5.3).

Aliment T

Les farines utilisées pour l'aliment T étaient des protéines animales transformées (PAT) : farine de protéines déshydratées de volaille, farine de sang de volaille et de porc, farine de plume hydrolysée et farine d'insectes (*hermetia*). De la farine de blé, de la cellulose et de l'amidon cru ont aussi été incorporés. Les HP ont été remplacées par un mélange d'huile de lin et de volaille. Un mélange de vitamines et de minéraux essentiels a été ajouté à l'aliment T.

Aliment V_{alt}

Un mélange de matières premières comprenant de la spiruline, de la levure de bière, des concentrés protéiques de pomme de terre et de luzerne, de l'amidon de blé et du tourteau de colza, a été utilisé pour l'aliment V_{alt} . Afin d'équilibrer le profil en AA, de la lysine et de la méthionine ont été ajoutées au mélange pour couvrir les besoins de la TAC. Les HP ont été remplacées par un mélange d'huiles végétales (colza, lin et tournesol), complétés par de la lécithine de soja afin d'apporter les phospholipides indispensables. Un mélange attractant ainsi qu'un mélange de vitamines et de minéraux essentiels, ont également incorporés à l'aliment V_{alt} .

Tableau 5.2 – Ingrédients et composition de l'aliment expérimental T
(MS : matière sèche)

	Aliment T
Ingrédients (%)	
Farine de protéines déshydratées volaille	25
Blé entier	21,5
Farine d'Hermetia APPI	17,9
Farine de sang (volaille et porc)	10
Farine de plume hydrolysée	10
Amidon cru de blé	3,2
Cellulose	3,1
Huile de volaille	5,3
Huile de lin	1,0
Min. and Vit. premix, INRA ^a	3
Composition (% MS)	
Matière sèche	97,4
Protéines brutes	48,4
Matières grasses	12,2
Amidon	15,9
Cendres	6,7
Énergie (kJ/g MS)	22,8

^aMineral premix (g or mg kg-1 diet) : calcium carbonate (40% Ca), 2,15 g ; magnesium oxide (60%Mg), 1,24 g ; ferric citrate, 0,2 g ; potassium iodide (75%I), 0,4 mg ; zinc sulphate (36%Zn), 0,4 g ; copper sulphate (25%Cu), 0,3 g ; manganese sulphate (33%Mn), 0,3 g ; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g ; cobalt sulphate, 2 mg ; sodium selenite (30%Se), 3 mg ; KCl, 0,9 g ; NaCl, 0,4 g (UPAE, INRA) ; And Vitamin premix (IU or mg kg-1 diet) : DL-a tocopherol acetate, 60 IU ; sodium menadione bisulphate, 5 mg ; retinyl acetate, 15,000 IU ; DL-cholecalciferol, 3,000 IU ; thiamin, 15 mg ; riboflavin, 30 mg ; pyridoxine, 15 mg ; B12, 0,05 mg ; nicotinic acid, 175 mg ; folic acid, 500 mg ; inositol, 1,000 mg ; biotin, 2,5 mg ; calcium pantothenate, 50 mg ; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA).

Tableau 5.3 – Ingrédients et composition de l'aliment expérimental V_{alt}
(MS : matière sèche)

	Aliment V _{alt}
Ingrédients (%)	
Algue Spiruline (terraMer)	22
Levure de bière (Nutrisaf Y390)	18
CP de pomme de terre (Tubermine)	17
CP de luzerne	16
Tourteau de colza	2,1
Lécithine de soja	2
Huile de colza	6
Huile de Tournesol	5
Huile de lin	2
CaHPO ₄ .2H ₂ O	1,7
Attractant mix ^b	1,5
Min. and Vit. premix, INRA ^a	3
L-Lysine (Eurolysine)	1,5
L-Methionine (Evonik, Germany)	0,5
Composition (% MS)	
Matière sèche	96,3
Protéines brutes	49,2
Matières grasses	15,5
Amidon	3,4
Cendres	3,4
Énergie (kJ/g MS)	23,7

^aMineral premix (g or mg kg-1 diet) : calcium carbonate (40% Ca), 2,15 g ; magnesium oxide (60%Mg), 1,24 g ; ferric citrate, 0,2 g ; potassium iodide (75%I), 0,4 mg ; zinc sulphate (36%Zn), 0,4 g ; copper sulphate (25%Cu), 0,3 g ; manganese sulphate (33%Mn), 0,3 g ; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g ; cobalt sulphate, 2 mg ; sodium selenite (30%Se), 3 mg ; KCl, 0,9 g ; NaCl, 0,4 g (UPAE, INRA) ; And Vitamin premix (IU or mg kg-1 diet) : DL-a tocopherol acetate, 60 IU ; sodium menadione bisulphate, 5 mg ; retinyl acetate, 15,000 IU ; DL-cholecalciferol, 3,000 IU ; thiamin, 15 mg ; riboflavin, 30 mg ; pyridoxine, 15 mg ; B12, 0,05 mg ; nicotinic acid, 175 mg ; folic acid, 500 mg ; inositol, 1,000 mg ; biotin, 2,5 mg ; calcium pantothenate, 50 mg ; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA).

^bAttractant mix : glucosamine, 0,5 g ; taurine, 0,3 g ; betaine, 0,3 g ; glycine, 0,2 g ; alanine, 0,2 g.

5.2 Le matériel animal

Afin d'identifier les mécanismes liés à la capacité de certains génotypes à survivre et grandir avec un aliment 100% V, nous avons choisi de travailler sur différentes lignées de TAC ayant des caractéristiques spécifiques : trois lignées isogéniques, ainsi qu'une lignée sélectionnée et une lignée témoin.

5.2.1 Les trois lignées isogéniques

L'INRA possède 18 lignées isogéniques, qui sont maintenues à la pisciculture expérimentale de la Peima (Sizun, INRA). Au sein d'une même lignée, tous les poissons ont le même génome. Elles peuvent être reproduites à l'identique dans le temps. Pour ces deux raisons, ces lignées représentent un outil formidable pour répondre à diverses questions scientifiques et sont très utilisées pour diverses recherches scientifiques, notamment en nutrition. Les réponses de ces lignées quand celles-ci sont nourries avec des aliments V ou M sont donc maintenant très bien caractérisées en terme de croissance.

Principe d'obtention des lignées isogéniques

Les lignées isogéniques sont obtenues par deux générations successives de gynogénèse (Figure 5.1). Les ovules chez la TAC sont pondus avant la fin de la méiose : ils sont en métaphase II et le second globule polaire n'a pas encore été expulsé. Pour réaliser la première gynogénèse, le matériel génétique du mâle est éliminé par une radiation UV du sperme avant la fécondation. Le spermatozoïde ne joue alors qu'un rôle de stimulation du développement de l'œuf. Après la fécondation, le second globule polaire est expulsé mais la première division mitotique est bloquée par traitement thermique, permettant ainsi d'obtenir un œuf diploïde (Figure 5.1(b)). Les poissons issus de cette première gynogénèse ne possèdent que le matériel génétique de la femelle. Cependant, les poissons issus de cette gynogénèse, s'ils sont tous homozygotes, ne sont pas tous génétiquement identiques, car les ovules diffèrent en fonction des recombinaisons

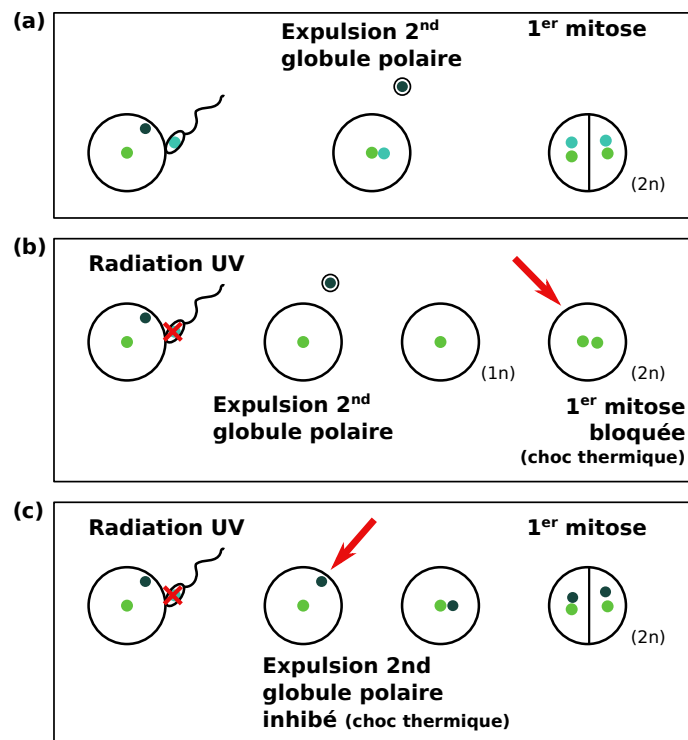


FIGURE 5.1 – (a) Schéma de fécondation classique. (b) et (c) Principe d'obtention des lignées isogéniques par gynogénèse.

des ovules. Cependant, les poissons issus de cette gynogénèse, s'ils sont tous homozygotes, ne sont pas tous génétiquement identiques, car les ovules diffèrent en fonction des recombinaisons

qui ont eu lieu pendant la méiose. Une seconde génération de gynogénèse sur les œufs d'une femelle homozygote, où l'expulsion du second globule polaire est inhibée par un traitement thermique (Figure 5.1(c)) permet d'obtenir une lignée de poissons isogéniques. Ces poissons sont donc génétiquement identiques et constituent une lignée isogénique homozygote. Certaines femelles ainsi obtenues subissent une réversion de sexe par traitement hormonal (méthyltestostérone) qui permet d'obtenir des individus néo-males.

Les trois lignées utilisées dans notre étude ont été obtenues en croisant une seule lignée de femelle homozygote (nommée B57) avec des mâles provenant de trois autres lignées homozygotes différentes. Afin d'avoir un nombre de poissons suffisant, les ovules de différentes femelles de la même lignée isogénique ont été recueillis, puis mélangés et divisés en trois groupes. Chaque groupe a été fécondé par du sperme d'une des trois lignées isogéniques. Les trois lignées ainsi obtenues sont hétérozygotes et les différences observées entre ces lignées sont seulement attribuables aux pères et ne peuvent donc pas être dues à la qualité des œufs (taille, quantité et qualité des réserves, ...). Ces trois lignées sont dénommées R23h, AB1h et A22h.

Choix des trois lignées isogéniques

Les trois lignées, R23h, AB1h et A22h, ont été choisies parmi les 18 que possède l'INRA, au vu des résultats de précédentes expérimentations ayant démontré des performances de croissance similaires lorsque les poissons de ces trois lignées avaient été nourris avec un aliment formulé avec des HP et FP, mais des performances très diverses lorsqu'ils avaient été nourris avec des aliments 100% V (Geurden *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2016). Les poissons des lignées R23h et AB1h semblent avoir de bonnes capacités pour survivre et pour grandir lorsqu'ils sont nourris avec ces aliments V. À l'inverse, les poissons de la lignée A22h ne semblent avoir qu'une faible capacité à grandir avec ces aliments.

5.2.2 Les lignées, témoin et sélectionnée

L'INRA a sélectionné une lignée de TAC (SU pour lignée SUAVE "Sélection pour l'Utilisation d'Aliment Végétaux") pour sa capacité à survivre et à grandir avec un aliment 100% végétal distribué dès le premier repas (Le Boucher *et al.*, 2012). En parallèle, une lignée témoin, non sélectionnée, est maintenue à l'INRA de façon à maximiser la variabilité génétique au sein de cette population (SY pour lignée synthétique).

Les principes de la sélection

Le principe de la sélection opérée par l'INRA est détaillé dans la publication présentant la première génération de sélection (Le Boucher *et al.*, 2012) et dans le chapitre 3 de la partie introductive de ce manuscrit (Paragraphe 3.2.3). Après cette première génération de sélection, la sélection a été poursuivie pendant 3 générations supplémentaires. Des poissons sélectionnés, issues de la première génération de sélection (SU-1), ont été nourris avec un aliment C pour assurer une reproduction optimale. Ces poissons ont ensuite été

reproduits afin de sélectionner la génération suivante. Les poissons sélectionnés issus de cette reproduction ont été nourris dès leur premier repas avec un aliment 100% V (V_{old}). La sélection a été effectuée sur la survie et sur la croissance (longueur) lors de quatre tris successifs effectués entre leur deuxième et treizième mois de croissance. Un processus similaire a été appliqué pour chaque génération mais l'aliment utilisé pour la sélection a évolué et l'aliment V_{old} a été remplacé par un autre aliment 100% V, contenant un mélange attractant et des proportions différentes de soja (Figure 5.4).

5.3 Les protocoles expérimentaux

Les différentes expérimentations se sont déroulées à la pisciculture expérimentale de la Peima (Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée, Sizun, France), dans des conditions similaires.

Pour chacune des expérimentations détaillées ci-dessous, les alevins issus des reproductions (Décembre) ont été répartis aléatoirement au cours du mois suivant dans des bassins d'élevage à l'intérieur d'un bâtiment ($n = 3$ par condition, excepté pour l'expérimentation avec lignées isogéniques, détaillée ci-dessous). Le volume d'eau de source des bassins a été ajusté en fonction de la biomasse de poissons (de 0,08 à 0,20 m³). Les expérimentations ont été effectuées sous lumière artificielle avec une photo-période fixe (lumière de 8h00 à 20h00), à une température constante (11,4°C). Dès leur premier repas, les poissons ont été nourris avec différents aliments expérimentaux (Paragraphe 5.1) Ces aliments ont été distribués automatiquement grâce à des tapis roulants pendant 8h.

Pour chaque expérimentation, les mortalités ont été relevées quotidiennement. Le poids moyen des poissons de chaque condition a été estimé à différentes dates. Pour cela, plusieurs échantillonnages ($n = 3-4$ par bassin) de groupe de poissons (de 20 à 100 selon leur taille) ont été effectués aléatoirement puis pesés et comptés.

5.3.1 Partie 1 : Les lignées isogéniques

Le protocole expérimental pour les lignées isogéniques est présenté en figure 5.2.

Suivi des paramètres zootechniques

Les aliments V ($n = 3$ bassins) ou M ($n = 6$ bassins) ont été distribués *ad libitum* aux poissons des 3 différentes lignées isogéniques dès le premier repas (42 dpf).

Afin de différencier les effets de la diminution de la consommation d'aliment lorsque les poissons sont nourris avec des aliments V (Gomes *et al.*, 1995; Espe *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2009) des effets de la composition de l'aliment V uniquement, des poissons de trois des bassins précédemment nourris avec l'aliment M *ad libitum*, ont été restreints à partir de 75 dpf (condition MR, $n = 3$ bassins). Les pourcentages de restriction ont été estimés pour chaque lignée en fonction de la quantité d'aliment distribué aux poissons nourris avec l'aliment V.

Pour confirmer les caractéristiques des lignées R23h, AB1h et A22h, la croissance et la survie ont été suivies tout au long de l'expérimentation. Les mortalités ont été relevées

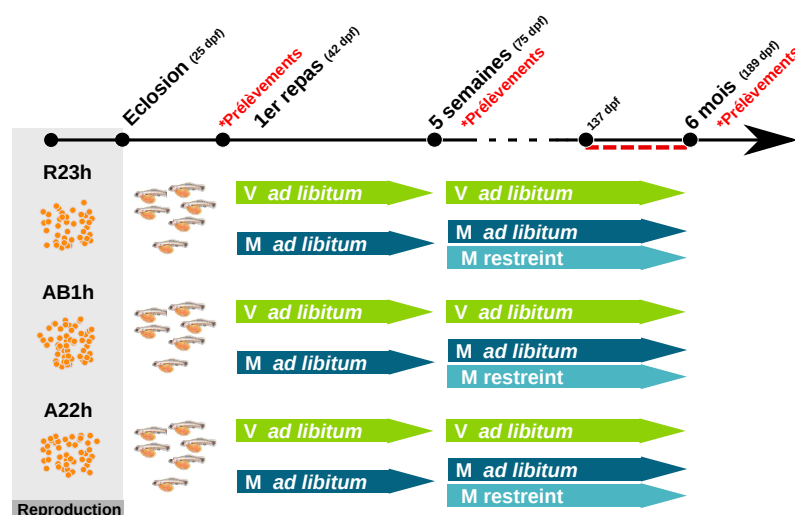


FIGURE 5.2 – Schéma du protocole expérimental pour les lignées isogéniques avec les trois conditions alimentaires (V, M *ad libitum* et M restreint) et les dates des trois prélèvements (42, 75 et 189 dpf). La période de mesure de l'ingéré alimentaire est indiquée par la zone en pointillés rouges.

quotidiennement et la survie moyenne de chaque condition a été estimée tout au cours de l'expérimentation. Les poids moyens des poissons de chaque condition ont été estimés à différentes dates (75, 88, 102, 116, 137, 151 et 189 dpf).

La quantité d'aliment ingérée (NI) a été mesurée précisément afin d'estimer la consommation d'aliment (DFI) et l'efficacité alimentaire (FE) du lot de poissons de chaque bac, entre 137 et 189 dpf.

$$DFI = \frac{NI}{(BW_f^{0.8} \times BW_i^{0.8})^{0.5} \times 44}$$

$$FE = \frac{BW_f - BW_i}{NI}$$

avec BW_i et BW_f , le poids des poissons au début et à la fin de la période (en g) et NI la quantité totale ingérée (en g (MS)).

Digestibilité

À la fin de l'expérimentation (entre 392 and 454 dpf), des juvéniles ont été échantillonnés aléatoirement puis transférés à la pisciculture expérimentale de Saint-Pée-Sur-Nivelle (INRA, France) afin de mesurer les coefficients d'utilisation digestive (CUD).

Les poissons ont été maintenus à une température constante de 17°C dans un système thermorégulé. Des groupes de 15 juvéniles pesant en moyenne 120 g ont été maintenus dans des bacs cylindro-coniques de 60L équipés d'un collecteur automatique de matières fécales. Les poissons ont été nourris à la main deux fois par jour à satiété visuelle avec les aliments V ou M additionné de 1% Cr_2O_3 , utilisé comme marqueur inerte (*i.e.* qui ne franchit pas la barrière digestive). Les matières fécales ont été recueillies automatiquement pendant 62 jours et stockées quotidiennement à -20°C en vue d'une analyse biochimique ultérieure (détaillée ci-dessous).

La digestibilité apparente a été calculée pour les protéines, les lipides, l'amidon ou l'énergie :

$$CUD_{MS} = 100 - \left(100 \times \frac{Cr_2O_{3diet}}{Cr_2O_{3feces}} \right)$$

$$CUD_X = 100 - \left(100 \times \frac{X_{feces}}{X_{diet}} \times \frac{Cr_2O_{3diet}}{Cr_2O_{3feces}} \right)$$

Analyses biochimiques

Les aliments, précédemment réduits en poudre par broyage, les lots de poissons préalablement broyés et lyophilisés (2 pools de 5 de poissons entiers) et les fèces préalablement lyophilisées ont été analysés. Le contenu en matière sèche (MS) a été mesuré après séchage des échantillons (5 g) à 105°C pendant 24 h. La teneur en protéines a été estimée par la méthode Kjeldahl (Nx6.25, Kjeldahl Nitrogen Analyzer 2000, Fison Instruments). L'énergie brute des échantillons a été mesurée après combustion dans un calorimètre de bombe adiabatique. Le contenu en amidon a été mesuré selon la méthode décrite par Thivend *et al.* (Thivend *et al.*, 1972). L'extraction totale des lipides a été réalisée selon la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957), afin d'évaluer ensuite la teneur en lipides.

Pour analyser le profil des AG, une transméthylation a été réalisée à partir de 100mg de lipides extraits selon la méthode de Shantha et Ackman (Shantha et Ackman, 1990), afin d'obtenir des esters méthyliques d'AG. Ces derniers ont ensuite été analysés avec un chromatographe à gaz Varian 3900 et identifiés à l'aide d'un mélange standard (Sigma, St Louis, MO, USA).

Échantillonnages

Premièrement, pour caractériser les différences préexistantes entre ces trois lignées, des alevins entiers ont été prélevés avant leur première alimentation (à 42 dpf, n=6). Deuxièmement, pour identifier les mécanismes liés à la capacité à grandir avec un aliment 100% V chez les jeunes stades (**Partie 1 - objectif (i)**), des prélèvements d'alevins entiers ont été effectués après 5 semaines d'alimentation, soit à 75 dpf (n = 9 par condition). Finalement, pour identifier des mécanismes à long terme (**Partie 1 - objectif (ii)**), des prélèvements de foie et d'intestin distal ont été effectués après 6 mois d'alimentation à 189 dpf, 8h après le dernier repas (n=9 par condition). Une fois prélevés, les échantillons ont été plongés directement dans l'azote liquide et ont été conservés à -80°C.

Lors de ces derniers prélèvements, du sang a également été échantillonné afin d'analyser les paramètres plasmatiques. Les taux de glucose (Glucose RTU, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), de triglycérides (PAP 150, bioMérieux) et de cholestérol (CHOD-PAP, Sobioda) ont ainsi été mesurés.

Extraction d'ARN

Les ARN totaux des différents échantillons (n=9 par condition) ont été extraits grâce à la méthode de réactif au TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La concentration de l'ARN extrait a été analysée à l'aide d'un spectrophotomètre (ND-1000, NanoDrop) en mesurant l'absorbance à 260 nm. Six échantillons sur les neuf extraits ont été sélectionnés en fonction de leur

qualité pour l'analyse du transcriptome, testée à l'aide du Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kista, Suède).

Microarray

Les analyses du transcriptome ont été effectuées sur une puce microarray Agilent (8x60K sondes par plaque), constituée de séquences de TAC (Agilent Technologies, Massy, France ; numéro d'accès GEO : GPL15840). La plaque a été utilisée et validée dans plusieurs études précédentes (Lazarotto *et al.*, 2015; Balasubramanian *et al.*, 2016).

Pour chaque échantillon, 150ng d'ARN ont été amplifiés et marqués à l'aide de Cy3-CTP (Agilent). L'ADNc obtenu par rétrotranscription, en utilisant une amorce polyDT T7 (Dénaturation : 10 min à 65°C, Réaction : 2 heures à 40°C, Inactivation : 5 min à 70°C), a ensuite été marqué avec un colorant Cy3 (2 h à 40°C). L'excès de colorant a été éliminé en utilisant un kit RNeasy (Qiagen) et le niveau d'incorporation de colorant a été évalué à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop ND1000, LabTech) (Rendement $\leq 0,825 \mu\text{g}$ d'ARNc et activité spécifique $\geq 6\text{pmol}$ de Cy3 par μg d'ARNc). 600 ng d'ADNc Cy3 ont ensuite été fragmentés avec un tampon spécifique (30 minutes à 60°C) puis hybridés sur chaque puce. L'hybridation a été effectuée dans un four à hybridation (Agilent) pendant 17h à 65°C. Après une étape de rinçage, les puces ont été scannées en utilisant les paramètres standard (3 μm et 20bits, Agilent Technologies, Massy, France). Les données d'expression ont été extraites grâce au logiciel Agilent Feature Extraction (Version 10.7.1.1).

Stratégie d'analyse des données de microarray

Les données d'expression obtenues par microarray ont été transformées (logarithme) et la qualité de chaque échantillon a été contrôlée (Kauffmann *et al.*, 2009). Les données ont été analysées à l'aide de la librairie Limma du logiciel R (Smyth, 2005). Pour chaque comparaison effectuée, des tests T modifiés ont été réalisés (Limma T-Tests) et des corrections de Benjamini-Hochberg pour tests multiples ont été appliquées (P-value seuil = 0,05).

L'objectif de cette première partie était d'identifier les fonctions liées à la capacité à grandir avec un aliment 100% végétal. En d'autres termes, nous avons cherché à comprendre pourquoi les poissons des lignées R23h et AB1h réussissent à grandir avec un aliment totalement substitué alors que les poissons A22h ont des capacités moindres. Pour cela, les transcriptomes des trois lignées ont été comparés entre eux (R23h *versus* AB1h ; R23h *versus* A22h ; AB1h *versus* A22h). Trois listes de gènes ont donc été obtenues pour les analyses avant le premier repas et représentaient les différences préexistantes entre ces trois lignées. Les comparaisons entre les lignées ont été effectuées, après 5 semaines et 6 mois d'alimentation, lorsque celles-ci étaient nourries avec l'aliment V, M *ad libitum* et l'aliment M en quantité restreinte (MR pour les analyses à long terme, seulement) :

- **R23h *versus* AB1h** : R23h-M *versus* AB1h-M ; R23h-V *versus* AB1h-V et R23h-MR *versus* AB1h-MR (pour les analyses à long terme, seulement)
- **R23h *versus* A22h** : R23h-M *versus* A22h-M ; R23h-V *versus* A22h-V et R23h-MR

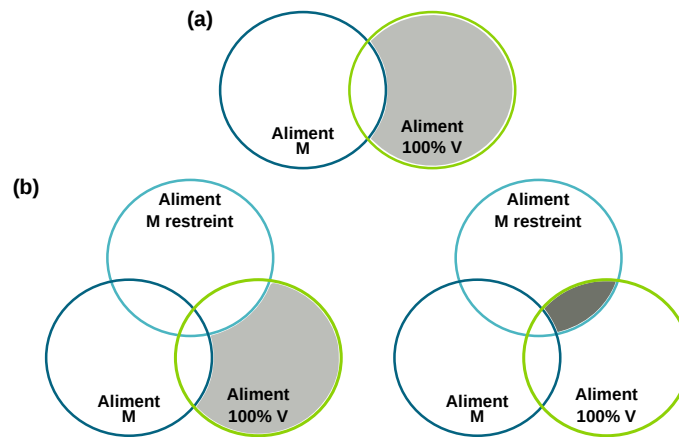


FIGURE 5.3 – Diagrammes de Venn montrant le nombre de sondes différentiellement exprimées entre les trois lignées (a) après 5 semaines (b) et après 6 mois d'alimentation, lorsqu'elles sont nourries avec l'aliment 100 % V (cercle vert), avec l'aliment M *ad libitum* (cercle bleu foncé) ou l'aliment M restreint (cercle bleu clair). Les sondes différentiellement exprimées lorsque les poissons sont nourris avec l'aliment V seulement ont été identifiées comme des marqueurs potentiels (zone grisée). Après 6 mois (b), on distingue les potentiels marqueurs moléculaires liés à des différences de capacités à utiliser l'aliment V (gris clair) des marqueurs liés à des différences de quantité d'aliment consommé (gris foncé), entre les trois lignées.

versus A22h-MR (pour les analyses à long terme, seulement)

- **AB1h *versus* A22h** : AB1h-M *versus* A22h-M ; AB1h-V *versus* A22h-V et AB1h-MR *versus* AB1h-MR (pour les analyses à long terme, seulement)

Pour chacune des trois comparaisons, deux listes de sondes différentiellement exprimées ont alors été obtenues après 5 semaines d'alimentation (V, M) et trois listes après 6 mois d'alimentation (V, M et MR). Pour chacune des trois comparaisons, les listes obtenues ont été comparées (Figure 5.3).

La condition M a été considérée comme notre condition contrôle, les poissons n'ayant pas de différences de croissance lorsqu'ils sont nourris avec cet aliment. Les sondes dont l'expression variaient entre les lignées lorsque les poissons avaient été nourris avec l'aliment M ont donc été attribuées à des différences entre les génotypes, mais sans lien avec leur capacité à grandir avec l'aliment V. Ces sondes ont donc été exclues de l'analyse.

Après 5 semaines d'alimentation, les sondes différentiellement exprimées uniquement avec l'aliment V ont été identifiées comme de potentiels marqueurs moléculaires. Après 6 mois d'alimentation, les potentiels marqueurs moléculaires trouvés ont pu être scindés en deux groupes distincts : les potentiels marqueurs moléculaires liés à des différences de quantité d'aliment consommé et des potentiels marqueurs moléculaires liés à des différences de capacités à utiliser l'aliment V.

Pour ces gènes identifiés comme potentiels marqueurs, l'écart d'expression (fold change, FC) entre les poissons des différentes lignées nourris avec l'aliment V, a ainsi été obtenu et correspond à l'**effet du génotype**. Pour **Lignée -1- *versus* Lignée -2-** :

- si le **Log(FC) > 0**, le gène est **plus** exprimé chez les poissons de la lignée -1-
- si le **Log(FC) < 0**, le gène est **moins** exprimé chez les poissons de la lignée -1-

Afin d'aider l'interprétation des résultats, pour chacun de ces marqueurs, l'**effet de l'aliment V** a été analysé pour chacune des trois lignées (Aliment V *versus* Aliment M) :

- si le **Log(FC) > 0**, l'expression de ce gène est **augmentée** par l'aliment V
- si le **Log(FC) < 0**, l'expression de ce gène est **diminuée** par l'aliment V

Les **ontologies de gènes (GO)** permettent de caractériser les gènes, en indiquant les composantes cellulaires dans lesquelles ils agissent, les fonctions moléculaires réalisées, ou les processus biologiques dans lesquels ces gènes sont impliqués. Les analyses d'enrichissement de GO permettent de caractériser des listes de gènes. Ces analyses ont été réalisées grâce à l'outil bio-informatique DAVID (version 6.7) (Huang *et al.*, 2009b,a) sur les différentes listes de potentiels marqueurs obtenus afin d'identifier les fonctions impliquées dans les capacités des TAC à grandir avec un aliment 100% V (Cut-off p-value $\leq 0,01$; Benjamini $\leq 0,1$).

qPCR

L'expression de certains des marqueurs moléculaires trouvés grâce à l'étude du transcriptome a été vérifiée par qPCR. Pour cela un μg d'ARN a été rétrotranscrit en ADNc avec la transcriptase inverse RNase H de SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en utilisant des amorces aléatoires ($n = 6$ / condition). Les qPCR ont été réalisées avec le système Roche Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France). Deux μl d'ADNc dilués ont été mélangés avec 3 μl du mix Light Cycler 480 SYBR[®] Green I Master 0,12 μL de chaque amorce (400 nM) et 0,76 μL d'eau DNase / RNase (5 Prime GmbH, Hambourg, Allemagne). Les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 400 nM. Le cycle de réaction se décompose avec une première étape d'incubation à 95°C pendant 10 min, puis de quarante-cinq étapes (Dénaturation : 95°C pendant 15 secondes ; 60°C pendant 10 second ; Elongation à 72°C pendant 15 secondes). Les courbes de fusion ont été systématiquement surveillées (avec un gradient de 0,5°C / 10 sec de 55°C à 94°C). Des échantillons sans transcriptase inverse et sans ARN ont été utilisés comme témoins négatifs. Certaines des amorces utilisées ont été conçues par nos soins avec le logiciel Primer 3 (Annexe i).

5.3.2 Partie 2 : Les lignées, sélectionnée et témoin

Objectifs (i) et (ii) : Efficacité et spécificité de la sélection

Pour confirmer l'efficacité et tester la spécificité de la sélection (**Partie 2 - Objectif (i) et (ii)**), des poissons des deux lignées, sélectionnée (SU) et témoin (SY), ont été produits après deux (SU-2), trois (SU-3) et quatre (SU-4) générations de sélection (Figure 5.4). Les aliments expérimentaux ont été distribués aux poissons issus de ces deux lignées dès la première alimentation ($n = 3$ bassins).

Réponse à la sélection, après deux générations (Expérimentation RS2)

Après deux générations de sélection, quatre aliments différents ont été testés : M, C, 100% V et V_{old} (Figure 5.4 (a)). En plus d'évaluer l'efficacité et la spécificité de la sélection, nous avons aussi testé l'effet de la formule des aliments V (transition de V_{old} à V). De plus, notre aliment

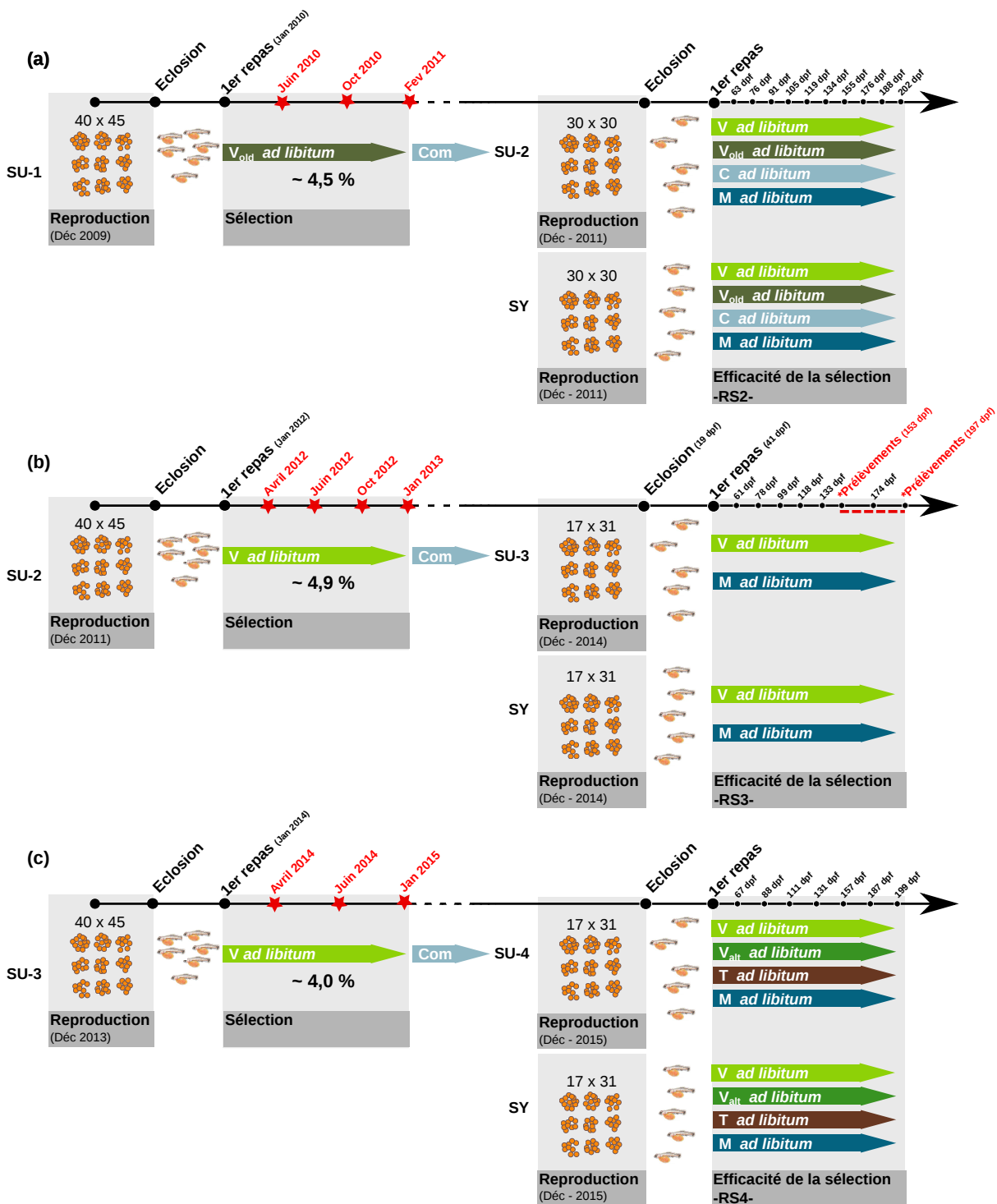


FIGURE 5.4 – Protocole de la sélection et des expérimentations de réponses à la sélection après (a) deux (RS2), (b) trois (RS3) et (c) quatre (RS4) générations de sélection, avec SU la lignée sélectionnée et SY la lignée témoin. Pour les étapes de reproduction (pour la sélection et pour l'expérimentation de la réponse à la sélection), le nombre de reproducteurs est indiqué avec le "Nombre de mâles x Nombre de femelles". Pour les étapes de **sélection**, les dates des tris effectués sur la longueur des poissons sont indiquées par une étoile. Pour les **expérimentations de réponses à la sélection**, les dates indiquées sont les dates où les poids des poissons ont été estimés et la zone pointillée rouge représente la période de mesure de l'ingéré alimentaire (RS3 seulement).

M contenait une proportion très importante d'HP et de FP (Tableau 5.1) et ne représente pas les aliments aujourd'hui utilisés en aquaculture qui contiennent une proportion importante de matières premières d'origine végétale. Un aliment C a donc également été testé dans le but de comparer les performances des poissons nourris avec les aliments M et C. Le suivi de la mortalité et de la croissance a été effectué pendant 6 mois à différentes dates (63, 76, 91, 105, 119, 134, 155, 176, 188 et 202 dpf).

Réponse à la sélection, après trois générations (Expérimentation RS3)

Après trois générations de sélection, deux aliments ont été testés (Figure 5.4 (b)) : un aliment M et un aliment 100% V. Le suivi de la mortalité et de la croissance a été effectué pendant 6 mois à différentes dates (61, 78, 99, 118, 133, 153, 174, 197 dpf).

Réponse à la sélection, après quatre générations (Expérimentation RS4)

Après quatre générations de sélection, quatre aliments ont été testés (Figure 5.4 (c)) : un aliment M, un aliment 100% V, ainsi que deux autres aliments formulés avec des matières premières alternatives, T et V_{alt}. Le suivi de la mortalité et de la croissance a été effectué pendant 6 mois à différentes dates (41, 67, 88, 111, 131, 157, 178, 199 dpf).

L'**efficacité de la sélection** a été évaluée grâce aux calculs des gains génétiques pour les poids moyens et pour la survie pour chaque régime. Les $Gain_V$ et $Gain_M$ ont été calculés de la manière suivante :

$$Gain_V = 100 \times \frac{X_{SU-V} - X_{SY-V}}{X_{SY-V}}$$

$$Gain_M = 100 \times \frac{X_{SU-M} - X_{SY-M}}{X_{SY-M}}$$

Ces gains génétiques représentent l'amélioration moyenne de chaque caractère chez les poissons sélectionnés par rapport aux poissons de la lignée témoin (SY). Avec $Gain_V$, le gain obtenu lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V et avec $Gain_M$ le gain obtenu lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M. Des gains génétiques positifs révèlent des performances supérieures chez les poissons sélectionnés et confirment ainsi l'efficacité de la sélection.

La **spécificité de la sélection** a été évaluée en calculant la différence entre le $Gain_V$ et le $Gain_M$:

$$Gain_{V_{specific}} = Gain_V - Gain_M$$

Ce gain génétique spécifique permet d'étudier les origines de l'adaptation et permet de distinguer si l'amélioration des performances est liée à la composition de l'aliment utilisé pour la sélection (*i.e.* poissons adaptés spécifiquement à l'aliment V) ou si elle est indépendante de la composition de l'aliment (*i.e.* poissons sélectionnés sur leur capacité à grandir de manière globale, quel que soit l'aliment). En d'autres termes, plus ce gain spécifique est proche de 0, plus le $Gain_V$ est similaire du $Gain_M$ et plus les améliorations induites par la sélection sont indépendantes de l'aliment V. À l'inverse, plus le gain spécifique est élevé, plus l'amélioration des performances des poissons nourris avec l'aliment V est grande en comparaison de l'amélioration des poissons nourris avec l'aliment M, ce qui est le reflet de l'adaptation des poissons à l'aliment V *per se*. Des gains spécifiques importants révèlent donc l'intérêt de sélectionner les

poissons avec des aliments V.

Dans le contexte où les aliments aquacoles évoluent rapidement, notamment avec l'apparition de nouvelles matières premières, l'effet de la sélection lorsque les poissons sont nourris avec deux autres aliments, eux aussi dépourvus d'HP et de FP (Paragraphe 5.1.3) a également été étudié après quatre générations de sélection. Les gains génétiques et les gains génétiques spécifiques ont été calculés :

$$Gain_{V_{alt}} = 100 \times \frac{X_{SU-V_{alt}} - X_{SY-V_{alt}}}{X_{SY-V_{alt}}}$$

$$Gain_T = 100 \times \frac{X_{SU-T} - X_{SY-T}}{X_{SY-T}}$$

$$Gain_{V_{alt}Specific} = Gain_{V_{alt}} - Gain_M$$

$$Gain_{TSpecific} = Gain_T - Gain_M$$

La comparaison des gains spécifiques obtenus avec l'aliment 100%V, utilisé pour la sélection et ceux obtenus avec les T et V_{alt} permet également de tester la spécificité de la sélection. En effet, des gains spécifiques faibles pour les aliments alternatifs (T et V_{alt}) seraient le reflet de poissons adaptés à l'aliment V *per se*. À l'inverse, des gains spécifiques dans le même ordre de grandeur que les gains spécifiques V, seraient le reflet de poissons adaptés à l'absence d'HP et de FP dans l'aliment.

Objectif (iii) : Fonctions impliquées dans la capacité de la lignée sélectionnée à grandir avec l'aliment V

Afin d'identifier les mécanismes liés à la capacité des poissons de la lignée sélectionnée à grandir avec des aliments 100% V, différents caractères liés à la nutrition ont également été analysés après trois générations de sélection (Expérimentation RS3).

Consommation d'aliment et efficacité alimentaire

Premièrement, de façon similaire à ce qui a été effectué chez les lignées isogéniques (Paragraphe 5.3.1), la quantité d'aliment ingérée a été mesurée précisément afin d'estimer la consommation d'aliment et l'efficacité alimentaire par bac entre 153 et 197 dpf. Au début et à la fin de cette période, des poissons entiers ont été prélevés, pesés individuellement, congelés puis stockés à -20°C pour ensuite analyser les compositions corporelles des poissons et estimer les rétentions des nutriments (n = 10 poissons/bacs).

Digestibilité

À la fin de l'essai d'alimentation, des juvéniles ont été échantillonnés aléatoirement puis transférés à la pisciculture expérimentale de Saint-Pée-Sur-Nivelle (INRA, France) afin de mesurer les coefficients d'utilisation digestive (CUD). Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé pour les lignées isogéniques (Paragraphe 5.3.1).

Composition corporelle et rétention

Les compositions corporelles et les profils en AG ont été analysés chez les poissons entiers

échantillonnés avant et après chaque période de mesure de l'ingéré. La rétention a été calculée pour les lipides, les protéines et l'énergie comme suit :

$$Retention = \frac{BW_f \times X_f - BW_i \times X_i}{DI_X} * 100$$

avec X_i and X_f les quantités totales de nutriments des poissons entiers (en g) et DI_X , la quantité totale digérée (en g).

Objectif (iv) : Fonctions communes affectées chez les différentes lignées de TAC

Afin d'identifier les fonctions communes mises en place pour survivre et grandir avec des aliments 100% V chez les lignées isogéniques et chez la lignée sélectionnée, l'expression de certains des marqueurs moléculaires identifiés grâce à l'étude du transcriptome des lignées isogéniques (**Partie 1 - Objectif (i) et (ii)**) a été mesurée chez les lignées témoin (SY) et sélectionnée (SU-3).

A la fin de l'expérimentation RS3, des prélèvements de foie et de cerveau ont été effectués. Une fois prélevés, les échantillons ont été plongés directement dans l'azote liquide et ont été conservés à -80°C . Les ARN totaux des échantillons de foie et de cerveau prélevés (n=6 par condition) ont été extraits grâce à la méthode de réactif au TRIzol et des qPCR ont été réalisées (Protocoles détaillés dans le paragraphe 5.3.1).

5.3.3 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.2.5). Les données étudiées ont été transformées si nécessaire afin de respecter les conditions d'application de l'analyse des variances (transformation arc-sinus pour les proportions et logarithmique pour les poids moyens). Les effets des lignées, de l'aliment et de l'interaction entre ces deux facteurs ont été testés grâce à des analyses de variances. Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés dans les cas où les conditions d'applications de l'ANOVA n'ont pas été réunis. Des tests post hoc de Tukey ont ensuite été réalisés pour identifier les différences entre chaque condition.

En ce qui concerne les données de qPCR, les analyses ont été effectuées conformément aux normes MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin *et al.*, 2009). Les niveaux d'expression relative ont été calculés selon une méthode basée sur l'efficacité des PCR (Pfaffl, 2001). L'expression moyenne géométrique de plusieurs gènes de référence (18S et EF1) a été utilisée pour la normalisation. Les données d'expression ont ensuite été transformées avec une transformation logarithmique. Les corrélations de Pearson ont été calculées pour quantifier les relations entre les données microarray et de qPCR.

3

Résultats

6	Les lignées isogéniques, à 5 semaines	73
6.1	Résultats préliminaires avant la première alimentation	
6.2	Publication scientifique	
6.3	Discussion	
7	Les lignées isogéniques, après 6 mois	105
7.1	Publication scientifique	
7.2	Résultats complémentaires	
7.3	Discussion	
8	La lignée sélectionnée	137
8.1	Publication scientifique	
8.2	Résultats complémentaires	
8.3	Discussion	
9	La lignée sélectionnée : expression de gènes	171
9.1	Expression de gènes liés à la consommation d'aliment	
9.2	Expression de gènes liés à différentes voies du métabolisme	
9.3	Expression de gènes liés à l'immunité	



6 Les lignées isogéniques à 5 semaines : fonctions impliquées dans les capacités à grandir avec l'aliment végétal

L'objectif de cette première partie était d'identifier les fonctions impliquées dans les capacités des différents génotypes de TAC à grandir avec un aliment 100% V à court terme et de caractériser de potentiels marqueurs moléculaires.

Pour cela, les poissons des trois lignées isogéniques ont été nourris avec l'aliment M ou l'aliment 100% V dès leur premier repas. Des prélèvements d'alevins entiers ont été effectués avant le premier repas et après 5 semaines d'alimentation, puis des analyses du transcriptome sur des alevins entiers ont été réalisées.

Les profils transcriptomiques des alevins entiers avant le premier repas ont été comparés dans le but caractériser ces trois lignées et d'identifier les différences préexistantes entre celles-ci. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe 6.1.

Ensuite, la comparaison des profils obtenus après 5 semaines d'alimentation a permis d'identifier les potentiels marqueurs liés à l'utilisation d'aliment V lors des phases précoces (*i.e.* sondes différenciellement exprimées entre les lignées lorsque celles-ci sont nourries avec l'aliment V seulement). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication scientifique "**Detection of new pathways involved in the acceptance and the utilisation of a plant-based diet in isogenic lines of rainbow trout fry**", soumise à PloS One (Paragraphe 6.2). L'ensemble de ces résultats est discuté dans une troisième partie (Paragraphe 6.3).

6.1 Résultats préliminaires : des différences préexistantes entre les trois lignées isogéniques avant le premier repas

Avant le premier repas, 5503, 5907 et 2624 sondes étaient différentiellement exprimées entre les poissons des lignées R23h *versus* AB1h, R23h *versus* A22h et AB1h *versus* A22h, respectivement. Les résultats d'enrichissement de GO ont permis d'identifier d'importantes différences pré-existantes entre les trois lignées (Figure 6.1 et annexe ii).

Avant le premier repas, les poissons R23h se sont différenciés des poissons AB1h et A22h par les niveaux d'expression de gènes de la région extra-cellulaire. De plus, les poissons R23h et AB1h se sont différenciés entre eux sur l'expression de gènes liés à la synthèse d'énergie (cycle de Krebs et chaîne respiratoire, liste en annexe iii) et sur certaines voies du métabolisme des glucides et du métabolisme azoté.

Parmi les gènes impliqués dans le métabolisme des glucides (liste en annexe iv), l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse et dans la synthèse du glycogène était plus importante chez les poissons R23h. A l'inverse, les gènes de la voie des pentose-phosphate étaient moins exprimés chez ces derniers. Concernant les gènes impliqués dans la néoglucogenèse, certains étaient plus exprimés chez les poissons R23h (PCK1 et FBP1), alors que FBP2 et G6PC étaient plus exprimés chez les poissons AB1h.

Des gènes impliqués dans les voies du catabolisme de certains AA (Tryptophane, Aspartate, Sérine et Thréonine) étaient plus exprimés chez les poissons R23h, alors que l'inverse a été trouvé pour les voies de dégradation de la lysine, de la proline et de l'alanine (liste en annexe v). Les poissons AB1h et A22h présentaient des différences au niveau de l'expression de certains gènes codant pour des endopeptidases.

Finalement, les trois lignées se sont différenciées par les niveaux d'expression de 244 gènes impliqués dans diverses voies de l'immunité : le complément, la présentation des antigènes, l'apoptose. Des gènes codant pour des interleukines, des interférons ou encore des chemokines étaient également différentiellement exprimés entre les poissons des trois lignées avant la première alimentation (Liste en annexe vi).

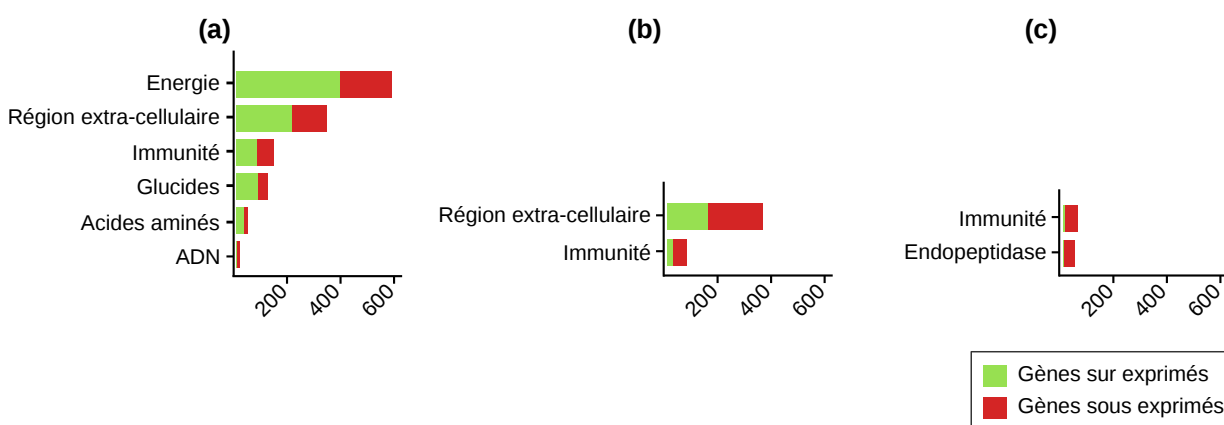


FIGURE 6.1 – Résultat de l'analyse d'enrichissement d'ontologies de gènes avant le premier repas pour les sondes différentiellement exprimées entre (a) R23h *versus* AB1h, (b) R23h *versus* A22h et (c) AB1h *versus* A22h (Cutoff P-value<0.01 ; Benjamini<0.1). Sur chaque graphique, le nombre de sondes différentiellement exprimées entre les lignées est représenté pour différentes catégories de GO, avec le nombre de sondes dont le fold-change était supérieur à 0 en vert (*i.e.* gènes sur-exprimés) et le nombre de sondes dont le fold-change était inférieur à 0 en rouge (*i.e.* gènes sous-exprimés).

6.2 Publication scientifique

Detection of new pathways involved in the acceptance and the utilisation of a plant-based diet in isogenic lines of rainbow trout fry

Thérèse Callet^{1,2}, Mathilde Dupont-Nivet¹, Marianne Cluzeaud², Florence Jaffrezic¹, Denis Laloë¹, Thierry Kerneis³, Laurent Labbé³, Edwige Quillet¹, Inge Geurden², David Mazurais⁴, Sandrine Skiba-Cassy², Françoise Médale^{2*},

1 UMR GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

2 UMR NuMÉA, INRA, St-Pée-sur-Nivelle, France

3 PEIMA, INRA, Sizun, France

4 IFREMER, Brest, France

* francoise.medale@inra.fr

Abstract

To meet the growing demand of fish feed for aquaculture, an increasing proportion of marine ingredients are being replaced by blends of plant products. However, the total replacement of marine ingredients in salmonid diets impairs fish performance, in particular during the early fry stage. In rainbow trout (RBT), the existence of a genetic variability to survive and grow with plant-based diets devoid of marine ingredients has now been proved, but the mechanisms behind are little studied. To investigate these, we analysed the whole transcriptome of three isogenic lines of RBT fry, which have similar growth when fed a marine resources-based diet (M diet) but which highly differ in their responses to a plant-based diet (V diet). Analysis of transcriptomes profiles revealed 1740, 1834 and 246 probes differentially expressed among the three lines when fed the V diet. The use of these lines led to the discovery of potential molecular markers linked to plant-based diet utilisation, some of them belonging to new pathways, never described before. An important number of genes was related to immunity, but further investigations are needed to better understand the difference between the genotypes in their immune status response to V diet exposure. Finally, differences in expression of genes related to feed intake and sensory perception among lines suggested that the mechanisms underlying the differences in growth on plant-based diet are closely linked to diet acceptance. Research on plants components affecting feed intake should be thus further explored.

Introduction

Fish consumption per person per year has almost doubled over the last 50 years, growing from 9.9 kg in 1960 to 20 kg in 2014, and is expected to reach 22.4 kg in 2022 [1]. Aquaculture has grown exponentially since 1950 to meet fish demand, thereby increasing the demand for feedstuffs. The ingredients traditionally used in aquafeeds were mostly based on fishery-derived products. Availability of these ingredients is however limited due to the regulation by fishing quotas and cannot meet the increasing demand [2]. To address human protein needs and the increasing demand that is placed on fish supply, aquaculture needs to further expand, while at the same time it must

reduce its reliance on marine by-products [2,3]. Over the years, researchers and the feed industry have worked to replace marine ingredients (fish oil and fishmeal) by plant-derived ingredients in fish feeds, especially for carnivorous species, such as salmonids which are large fish oil (FO) and fishmeal (FM) consumers. This research has resulted in a remarkable increase in the level of plant products used, coupled with an improved diet formulation [4]. A replacement threshold is, however, met since growth performance and survival rate of salmonids, such as rainbow trout (RBT), are impacted when a diet contains more than 80% of plant products [5,6]. Different hypotheses have been proposed to explain these decreased performances.

Firstly, altered performance observed with highly substituted plant-based diets could be partly explained by the reduction of feed intake [7]. Secondly, even with a diet composition carefully formulated to meet the all known nutrient requirements of RBT, plant-based diets still differ from a marine resources-based diet in their amino acids, fatty acids (FA), and carbohydrates profiles, in their mineral contents, and often by the presence of anti-nutritional factors [8]. Numerous nutrigenomic analyses have been conducted to investigate how these differences affect fish metabolism. They mainly focused on the liver [5,9–15] and the intestines [13,16], key organs in nutrition. Although, results from these studies depend on the species studied, replacement rate and diet composition, the expression of several key genes involved in metabolism was found to be particularly sensitive to either vegetable meal and/or vegetable oils. This is especially true for genes coding for enzymes that promote biosynthesis of omega-3 long-chain fatty acids (LC-PUFA) and cholesterol, as both omega-3 LC-PUFA and cholesterol are lacking in vegetable oils [5,9–15]. Genes related to the utilisation of glucose (glycolysis, glycogenogenesis) and production of endogenous glucose (glycogenolysis, gluconeogenesis) are impacted likely because of a change in starch content of diets with plant-ingredients [5,9,13,14]. Misregulation of certain amino acid pathways and stimulation of proteolysis [5,14] are also commonly observed.

Finally, those transcriptomic analyses have also revealed that expression of genes from both innate and adaptive immunity are often disturbed [5,13,14], but implications for fish immune responses and how these changes could impact growth rate are not yet clear.

Almost all the previously cited transcriptomic analyses investigated the effect of the diet, and very few considered the impact of fish's genetic background. It has, however, been shown that a high variability exists in the growth responses among RBT individuals from a same population when fed a 100% plant-based diet. Significant genotype \times diet interactions associated with body weight [17,18], feed intake and feed efficiency [19] were also reported in RBT. Together, these results suggest that some genotypes are more able than others to survive and grow on a plant-based diet, highlighting the potential to improve growth rate by exploiting genetic variability. Morais *et al.* studied the changes in the liver [11,12] and intestines [16] of two post-smolt Atlantic salmon groups with contrasting phenotypes (lean or fat), that were fed vegetable oils. A study on European sea bass revealed differences between two families characterized by their different abilities to use a plant-based diet [14]. And only two studies focused on RBT, and analysed two families with different ability to grow with a diet devoid of fishmeal [20,21].

The previous cited studies have investigated the effect of the fish genotype on plant-based diets utilization on later stages only. However, the weeks immediately after start-feeding have been also identified as a critical step in the utilization to such diets, as this period show the highest genotype \times diet interaction for RBT mean body weight and length [18] and a significant decrease in fish survival rate [22,23]. Moreover, previous studies have shown that an early exposure to a 100% plant-based diet improves later fish performance when fed again the same extreme diet [24], and identified

different molecular markers linked to plant-based diet adaptation [25]. The molecular mechanisms underlying this genetic variability during the first few weeks after the first-feeding, stage of particular importance, have thus not been identified.

The originality of the present study was to identify genes contributing to the differential ability of RBT to use plant-based diets from very first feeding. The second aim was to focus on early stage, which is a highly critical step, thus transcriptomic analyses were carried out 5 weeks after the first feeding on whole fry as fish are too small at this stage to analyse specific organs.

We studied three isogenic lines generated for scientific research [26], which exhibit similar growth rates when fed a marine resources-based diet, but different growth rates when fed a plant-based diet after long term feeding trials, explained by differences in feed efficiency and feed intake [19,24]. Because of the within line genetic homogeneity, a limited within line (residual) phenotypic variability is expected. The specific features of these three isogenic lines, along with the use of an extreme plant-based diet to emphasize the differences between the lines, are expected to enhance the power and relevance of the analyses to detect potential molecular markers linked to plant-based diet utilisation after a short-term feeding.

Materials and methods

Animal material

The three heterozygous isogenic lines studied, denominated R23h, AB1h and A22h, were produced at PEIMA facilities (INRA, Sizun, France). They were obtained by mating all homozygous females from one single isogenic line with individual males from three other homozygous isogenic lines. The homozygous lines were obtained after two generations of gynogenesis and further maintained by within line pair-mating [26]. In order to have enough fish for the whole experience, ova were collected from 33 different females from the same isogenic line (thus sharing the same genome), and were then mixed up. Differences observed between lines could then be attributed only to paternal effects.

Experimental diets and feeding trial

Two experimental diets with different levels of FM and FO or plant ingredients were formulated and manufactured in INRA facilities (INRA, Donzacq, France). Composition of both diets is presented in Table 1. Diets were formulated to contain similar levels of protein, energy, and lipid. The control diet contained fishmeal, fish oil and whole wheat as major ingredients (M diet). The plant-based diet (V diet) was devoid of marine ingredients, and contained a blend of vegetable oils (rapeseed, palm and linseed oil) and vegetable meals (faba bean, corn, soybean, wheat gluten, peas, and white lupin) with added L-Lysine and L-methionine to meet the nutrient requirements of RBT. The V diet also contained an attractant mix. Both diets were extruded.

Before the first feeding, the fry were randomly distributed into 18 tanks (0.25m³) and supplied with natural spring water at a constant temperature of 11.4°C (6 tanks/line with on average 350 fish), and under artificial photoperiod condition (from 8am to 8pm). At this stage, no difference in fry mean body weights were detected. At 42 days post fertilization (dpf), fish received their first feeding. For each line, three tanks received the control diet (M diet) and three tanks received the V diet. Feed was distributed *ad libitum* during 5 weeks with automatic feeders over 8h of the lighting period.

After the first 5 weeks of feeding (74 dpf), total fish weight of each tank was measured, the number of fish was counted and mean body weight of fry were calculated. Whole body fry were sampled, anaesthetized and then euthanized (anesthetic overdose)

8h after their last meal (n=6/condition: genotype×diet). All the samples were then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

109
110

Table 1. Ingredients, proximal composition of the experimental diets V, and M, and fatty acid composition of the M and V (2mm) experimental diets (DM: dry matter).

	V diet	M diet
Ingrédients (%)		
Fishmeal (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	0	65
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	4	21
Fava bean (CP)	10	0
Corn gluten (CP 60; Inzo, France)	17	0
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)	17	0
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)	12	0
White lupin seed meal (Terrena, France)	5	0
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France)	12.5	0
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	0	11
Rapeseed oil (Daudruy, France)	6	0
Linseed oil(Daudruy, France)	3.6	0
Palm oil(Daudruy, France)	2.4	0
Soy-lecithin (Louis François, France)	2	0
L-Lysine (Eurolysine)	0.5	0
L-Methionine (Evonik, Germany)	0.5	0
CaHPO4.2H2O (18%P; 22%Ca)	3	0
Min. and Vit. premix, INRA ^a	3	3
Attractant mix ^b	1.5	0
Composition (% DM)		
Dry matter	96.9	97.6
Crude protein	51.4	50.1
Crude fat	18.5	19.4
Starch	9.6	14.1
Ash	6.5	12.7
Energy (kJ/g DM)	23.6	22.6

^aMineral premix (g or mg kg⁻¹ diet): calcium carbonate (40% Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60%Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75%I), 0.4 mg; zinc sulphate (36%Zn), 0.4 g; copper sulphate (25%Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33%Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30%Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA) ; And Vitamin premix (IU or mg kg⁻¹ diet): DL-α tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1,000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA).

^bAttractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 6 individual fry per treatment, using the TRIzol reagent method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's

111
112
113

recommendations. The concentration of extracted RNA was analysed using a spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop) by measuring absorbance at 260nm. Quality of RNAs was checked with Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kista, Sweden).

Microarrays, cDNA labelling and hybridisation

RNA samples from fry from the three isogenic lines after 5 weeks of feeding with either the M diet or the V diet were analysed with microarray technology. Microarray analyses were performed on an Agilent-based microarray platform with 8 X 60 K probes per slide. This platform is based on a high density rainbow trout oligonucleotide microarray resource, which has been enriched with oligonucleotides utilizing recent NGS data from rainbow trout [27](Agilent Technologies, Massy, France; Gene Expression Omnibus (GEO) accession no. GPL15840). The platform has been employed and validated in several previous studies [25, 28].

For each sample, 150ng of total RNA was amplified and labelled using Cy3-CTP according to the manufacturer's instructions (Agilent). cRNA were obtained by first reverse transcribed RNA, using a polyDT T7 primer (denaturation step: 10min at 65°C, reaction step: 2hr at 40°C, inactivation step: 5min at 70°C). cRNA were then labelled with Cy3-dye (2hr at 40°C). Excess dye was removed using a RNeasy kit (Qiagen). The level of dye incorporation was evaluated using a spectrophotometer (Nanodrop ND1000, LabTech) (Yield>0.825µg cRNA and specific activity>6pmol of Cy3 per µg of cRNA). 600ng of Cy3-cRNA was then fragmented with a specific buffer (30 minutes at 60°C) and hybridised on a sub-array. Hybridisation was performed in a microarray hybridisation oven (Agilent) for 17h at 65°C. After a washing step, slides were scanned (Agilent DNA Microarray Scanner, Agilent Technologies, Massy, France) using the standard parameters for a gene expression 8x60K oligoarray (3µm and 20bits). Data were then obtained with the Agilent Feature Extraction software (10.7.1.1). Raw data are available in NCBI's GEO database (accession number: GSE92673).

Quantitative real-time PCR analysis

In order to confirm the microarray results, the same RNA samples as previously used for the microarray analysis were used to determine relative gene expression levels by quantitative real-time PCR (qPCR) of 9 genes selected among those found differentially expressed. One µg of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with SuperScript III RNase H reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using random dT Primers (n=6/condition). QPCR were performed using the Roche Lightcycler 480 system (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France). Two µL of diluted cDNA were mixed with 3 µL of Light cycler 480 SYBR Green I Master mix, 0.12 µL of each primer (400 nM) and 0.76 µL DNase/RNase-free water (5 Prime GmbH, Hamburg, Germany). Forward and reverse primers were used at a final concentration of 400nM. Primers were designed with Primer 3 software (Supplementary File 1). Thermal cycling was initiated with the incubation at 95°C for 10 min. Forty five steps of PCR were performed, each one consisting of heating at 95°C for 15 sec for denaturing, and at 60°C for 10 sec for annealing and a third extension step at 72°C for 15 sec. Melting curves were systematically monitored (with a gradient of 0.5°C/10 sec from 55°C to 94°C). Samples without reverse transcriptase and samples without RNA were run for each reaction as negative controls. Primers sequences, along with their efficiencies are presented in the Supplementary file 1.

Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using the R-software (version 3.2.5) [29] and associated Bioconductor packages. For mean body weights calculated at 74 dpf, the normality and homogeneity of residuals were tested with the Shapiro-Wilk's test and the Bartlett test, respectively. A two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to assess effects of genotype, diet, and genotype×diet interaction, followed by a Tukey's range test.

Data from the microarray analysis were transformed with a logarithmic transformation and scale-normalised. The quality of each sample was controlled using the ArrayQualityMetrics package [30], and two samples were excluded from the analysis, as they did not pass the quality control. Data were analysed using the package Limma [31] and for each comparison Limma t-tests were performed. A Benjamini-Hochberg correction for multiple tests was applied and an adjusted P-value cutoff=0.05 was considered.

We compared the 3 isogenic lines amongst each other (R23h versus AB1h; R23h versus A22h; AB1h versus A22h) to identify genes which explain their divergent ability to use the V diet. The 6 different comparisons included: R23h-V versus AB1h-V and R23h-M versus AB1h-M; R23h-V versus A22h-V and R23h-M versus A22h-M; AB1h-V versus A22h-V and AB1h-M versus A22h-M. Two lists of genes differentially expressed were obtained per line comparison (M and V). However, given that these 3 lines display different genotypes, intrinsic differences are present among each of the lines. Differences in the expression of genes between lines could thus be a result of differences in genotype, and may have no relation to their ability to use the V diet. In order to exclude these genes from our results, the two lists of differentially expressed genes obtained per line comparison were compared. Probes that were found to be differentially expressed when fed both the M diet and the V diet were considered as intrinsic differences between lines, irrespective of the dietary treatment and were excluded from the analysis. Probes found to be differentially expressed only with the V diet ($V \text{ diet} \cap M \text{ diet}^c$) were identified as potential molecular markers linked to plant-based diet utilisation, and were thus kept for further analysis (Fig 1). To interpret results, gene ontology (GO) enrichment analyses were performed using the functional annotation chart tool from the DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) bioinformatics resource, version 6.7 [32,33]. Gene ontology (GO) enrichment analyses were carried out on the three lists of genes identified as potential molecular markers (Cut-off p-value<0.01 ; Benjamini<0.1). Swiss Prot identifiers were used as input against all Swiss protein identifiers of the array. Lastly, to help enrich the biological interpretation, the within line diet effect was assessed for genes previously kept, by calculating the fold change between fish fed the V diet versus the control M diet (R23h-V versus R23h-M ; AB1h-V versus AB1h-M ; A22h-V versus A22h-M) (Cut-off p-value = 0.05).

Concerning qPCR data, assays were carried out according to the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) standards [34]. The relative expression levels were calculated by a mathematical method based on the real-time PCR efficiencies [35]. The geometric average expression of GAPDH, 18S and EF1A was used for normalisation. Gene expression data were transformed with a logarithmic transformation. The normality and homogeneity of variance of residuals were also tested with the Shapiro-Wilk's and Bartlett tests, respectively. Student t tests were performed to compare relative genes expression between lines when fed the M diet and then the V diet (Cut-off p-value=0.05). Pearson's correlations were calculated to quantify relationships between microarray and qPCR data.

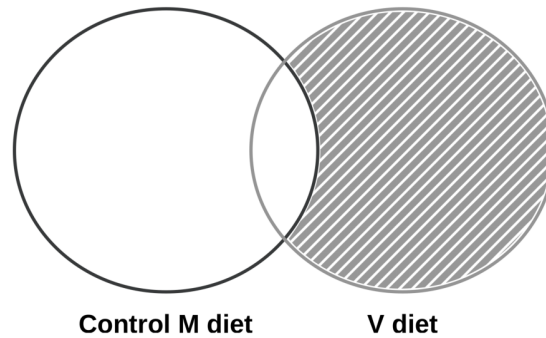


Fig 1. Transcriptomic analysis strategy. Venn diagrams show the numbers of differentially expressed probes (Adjusted P-value < 0.5) when compared the three lines when fed the control M diet (dark grey) and when fed the V diet (light grey). Probes found to be differentially expressed only with the V diet ($V \text{ diet} \cap M \text{ diet}^C$) were identified as potential molecular markers linked to plant-based diet utilisation, and were thus kept for further analysis (hatched area).

Ethical statement

Experimentation was conducted in the INRA experimental facilities (Peima facilities, Sizun, France) authorized for animal experimentation by the French veterinary service which is the competent authority (B 29-277-02). The experiments were in strict accordance with EU legal frameworks related to the protection of animals used for scientific research (Directive 2010/63/EU) and according to the National Guidelines for Animal Care of the French Ministry of Research (decree n°2013-118, february 1st, 2013). The scientist in charge of the experimentation received training and personal authorization (N°B64 10 003).

In agreement with ethical committee "Comité d’Ethique Finistérien en Expérimentation Animale" (C2EA-74), the experiment reported here does not need approval by a specific ethical committee since it implies only classical rearing practices with all diets used in the experiment formulated to cover the nutritional requirements of Rainbow trout [8]. During the experiment, fish were daily monitored. If any clinical symptoms (i.e. morphological abnormality, restlessness or uncoordinated movements) were observed, fish were sedated by immersion in 2% benzocaine solution and then euthanized by immersion in a 6% benzocaine solution (anesthetic overdose) during 3 minutes.

Results

Biometric parameters

Mean body weights of fry from each condition at the end of the feeding trial, i.e. after the first 5 weeks of feeding (74 dpf), are presented in Fig 2. While there were no significant differences in weight between isogenic lines that were fed the M diet (overall mean equal to $0.48 \pm 0.03\text{g}$ (mean \pm standard error of the mean), P-value > 0.05), there were significant differences between isogenic lines when fed the V diet (P-value < 0.01). As shown in Fig 2, R23h fed the V diet had the highest final weight in comparison to AB1h (-18%), and A22h (-50%). At the end of the 5 weeks trial, there was no effect of the line, nor the diet, on survival rates ($95.7 \pm 2.46\%$).

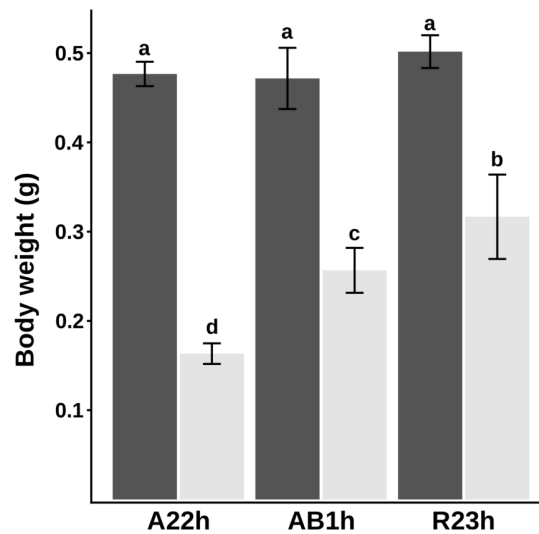


Fig 2. Mean body weights after 5 weeks of feeding. Final body weight (means±SEM) of the three isogenic lines fed either a diet M (control diet in dark grey) or V diet (in light grey) after 5 weeks of feeding. Two-way analysis of variance, followed by a Tukey post hoc test were carried out in order to assess effects of diet and genotype. Different letters mean significance between groups (Cut-off P-value<0.05).

Microarray results

The numbers of genes differentially expressed between the three isogenic lines after 5 weeks of feeding with either the V diet or the M diet are summarised in Table 2. For the three line comparisons, 1740, 1834 and 246 probes were found to be differentially expressed only with the V diet, and were thus identified as potential molecular markers linked to a plant-based diet (Supplementary file 2). Among those genes, 1279, 1253 and 186 have a swiss prot ID's. To identify pathways potentially involved in plant-based diet utilisation, a gene ontology enrichment analysis was carried out only on potential molecular markers. For the three different comparisons, GO terms obtained were manually clustered in different categories of interest and are presented in Fig 3. The complete list of GO terms found significantly enriched is presented in the Supplementary file 3.

Table 2. Number of differentially expressed probes among conditions after limma t-test (corrected P-value≤0.05, Benjamini-Hotchberg).

	R23h versus AB1h	R23h versus A22h	AB1h versus A22h
M diet	2477	2135	4132
V diet	3403	3270	926
V diet ∩ M diet ^c	1740	1834	246

GO categories related to extracellular region (210 and 184 probes, respectively), innate and adaptive immunity (42 and 10 probes, respectively), and amino acid metabolism (5 and 8 probes, respectively) were significantly enriched for R23h versus AB1h and R23h versus A22h comparisons. For R23h versus AB1h only, GO terms linked to lysosome and inhibition of endopeptidase activity were significantly enriched, and contained 35 probes and 30 probes, respectively. For R23h versus A22h comparisons, a cluster of significantly enriched gene ontology linked to neurological

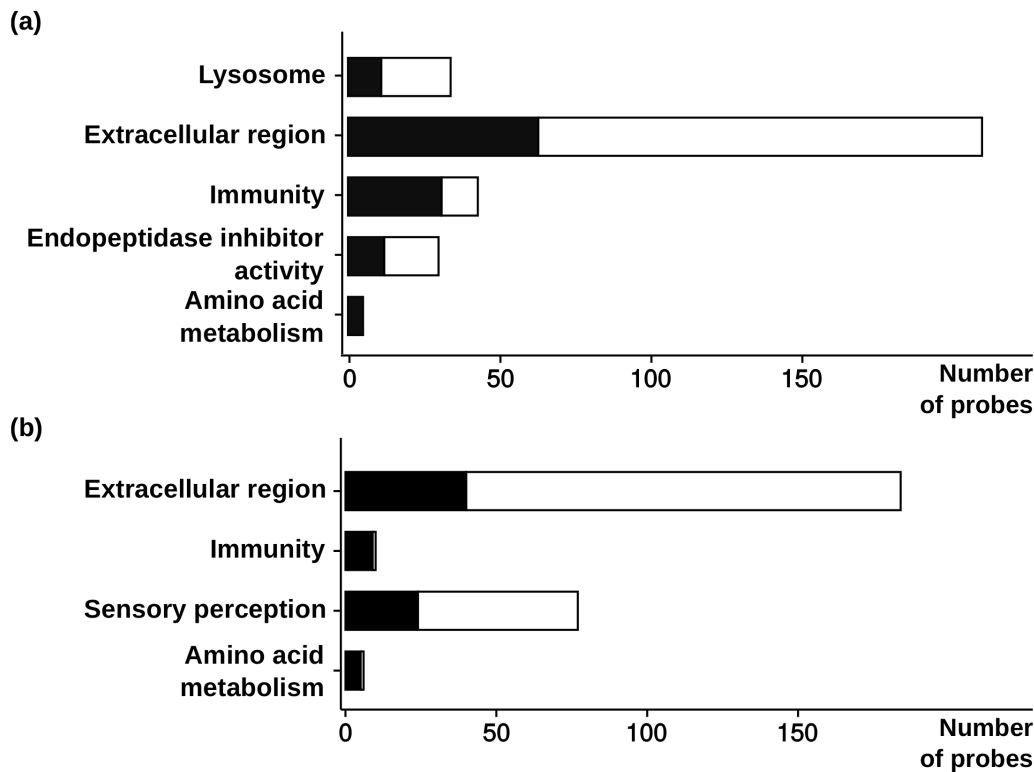


Fig 3. Gene ontology enrichment analysis results. Cluster with number of genes up (in black) and down-regulated (in white), issued from the gene ontology enrichment analysis using DAVID bioinformatics resource for the (a) R23h *versus* AB1h and (b) R23h *versus* A22h comparisons (Cut-off: p-value<0.01; Benjamini<0.1).

processes and perception contained 70 probes. Finally, no gene ontologies were found to be significantly enriched for AB1h versus A22h comparison after 5 weeks of feeding (Cut-off p-value<0.05, Benjamini Cut-off<0.1).

More precisely, the genes related to perception (Table 3) described here are linked to several sensory systems including vision, olfactory, gustatory and auditory perception and the majority were less expressed in R23h lines in comparison to A22h (57/70). Moreover, genes coding factors linked to feed intake regulation were also found. Both orexigenic (factors which positively regulate feed intake) and anorexigenic factors (which negatively regulate feed intake) were detected. Expression of the genes related to the different perception systems and feed intake were not affected in R23h by the V diet but were either up or down-regulated in A22h.

The genes related to the sulphur amino acid biological process were the betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT1 and BHMT2), S-adenosylmethionine synthetase (Mat1a) and cysteine- γ -lyase (CGL), and were all more expressed in R23h when fed the V diet (Table 4). And while genes expressions were up-regulated in R23h and AB1h lines when fed the V diet, the diet did not affect expression of these genes in A22h.

Concerning immunity, genes were related to the complement system, the major histocompatibility complex, and T and B cell regulation (Table 5). Most of these genes were expressed at a higher level in R23h in comparison to AB1h (31/43 genes) and A22h (9/10 genes). While expression of the majority of these genes was unaffected by

the V diet in R23h, genes were either down or up-regulated in AB1h and A22h when fed the V diet.

In addition, some genes previously found as enteropathy markers were also retrieved and were listed in Table 6. Among those genes, some were related to the epithelial barrier, the activation of the T and B cell functions via the up-regulation of the GTPase IMAP family member, or the NF- κ -B inhibitor α pathway.

The important number of genes related to the extracellular component (GO cellular component category) had highly heterogeneous functions.

qPCR

In order to check microarray results, 9 genes found differentially expressed through the transcriptome analysis and linked to immunity, perception, and metabolism were tested by real-time qPCR. Fold changes obtained with both microarray and qPCR are presented in Fig 4. For all genes tested, relative expressions were not significantly different between lines when fish were fed the M diet, as expected. In contrast, expressions were significantly different between lines fed with the V diet (Cut-off p-value<0.05 and Cut-off p-value<0.1 for CXCL1 and CFP). Fold changes obtained by qPCR and microarray were in agreement, therefore validating transcriptomic results. Coefficients of correlation showed that qPCR and microarray results were correlated for 8/9 genes (Pearson correlation coefficient>0.60 and p-value<0.01) (Table 7).

Discussion

In order to identify genes which discriminate trout lines in their ability to grow on a full plant-based diet at an early-stage, which is a critical step in their future capacity to grow with such diet [24], we compared transcriptomic profiles of three RBT isogenic lines, known to differ in their growth response when fed a plant-based diet. Transcriptomic analysis is considered appropriate to tackle questions related to nutrition without any *a priori* hypothesis.

Effects of plant-based diets have been largely studied, but only few transcriptomic studies have analysed the effect of fish genetic background. Overall, these studies indicated only a limited number of genes to be differentially expressed according to the genotype in RBT [20,21], in salmon [11] or in sea bass [14]. In the present experiment, we found a high number of genes differentially expressed between lines, with a cut-off p-value corrected for multiple testing, controlling thus the number of false positives. This is probably due to the reduced variability in gene expressions within each isogenic line, as fish share the same genotype. This enhances the capacity to detect differences between line, confirming the benefit of using this relevant biological material.

Difference in expression of genes linked to perception may influence feed intake

Replacement of FM by plant ingredients affects fish feeding behaviour [41] and feed intake [42], even though diets meet nutrient requirements and are supplemented with an attractant mix like in the present study. It is known that olfactory and visual stimuli are key factors in the feeding behaviour, while gustatory sense plays a minor role in RBT [43,44]. Two main hypotheses were put forward to explain the perturbation of feeding behaviour with plant-based diets [42]. The first one is a change in palatability that could provoke an aversion to such a diet. The other possible explanation is a negative feedback due to the nutritional quality of diets, which could affect appetite.

Table 3. Genes differentially expressed between the 3 isogenic lines related to perception and genes previously identified as enteropathy markers.

Swiss Prot	Description	Genotype effect	Diet effect		
			R23h	AB1h	A22h
Perception of smell/taste					
P36510	UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (Ugt2a1)	R23h <A22h	ns	ns	ns
P56373	P2X purinoceptor 3 (P2RX3)	R23h <A22h	ns	ns	up
Q3V3I2	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit α -3 (GNAT3)	R23h <A22h	ns	ns	down
P23625	G protein α q subunit (G α q)	R23h <A22h	ns	ns	ns
Vision					
P43004	Excitatory amino acid transporter 2 (SLC1A2)	R23h <A22h	ns	up	up
Q9BGL2	Lecithin retinol acyltransferase (LRAT)	R23h <A22h	ns	ns	up
P35349	Metabotropic glutamate receptor 6 (Grm6)	R23h <A22h	ns	ns	up
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial (OAT)	R23h <A22h	ns	ns	up
P87368	Putative violet-sensitive opsin	R23h <A22h	ns	up	up
P87367	Red-sensitive opsin	R23h <A22h	up	up	up
Q9XT54	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta (P2E6D)	R23h <A22h	ns	ns	up
Q9ZI275	Retinaldehyde-binding protein 1 (Rlbp1)	R23h <A22h	ns	up	up
Q8AXN9	Retinoid isomerohydrolase (RPE65)	R23h <A22h	ns	up	up
Q9YGX2	Retinoid isomerohydrolase (RPE65)	R23h <A22h	ns	ns	up
Q96NR8	Retinol dehydrogenase 12 (RDH12)	R23h <A22h	ns	ns	ns
P47804	RPE-retinal G protein-coupled receptor (RGR)	R23h <A22h	ns	up	up
Sensory Perception of sound					
O55225	Otogelin (Otog)	R23h <A22h	ns	ns	up
Q8NHW6	Otospiralin (OTOS)	R23h <A22h	down	up	up
P58743	Prestin (SLC26A5)	R23h >A22h	ns	ns	ns
Q810W9	Whirlin (Whrn)	R23h >A22h	ns	ns	ns
Feed intake					
P28566	5-hydroxytryptamine receptor 1E (Htr1E)	R23h >A22h	ns	down	down
P35563	5-hydroxytryptamine receptor 3A (Htr3A)	R23h >A22h	ns	ns	ns
Q9W6M9	Galanin (GAL)	R23h <A22h	ns	ns	up
Q9JLS8	Leptin receptor gene-related protein (Leprot)	R23h >A22h	ns	ns	up
P70579	Metabotropic glutamate receptor 8 (GRM8)	R23h <A22h	ns	ns	up
	Proopiomelanocortin B (PomCb)	R23h <A22h	ns	ns	ns

The genotype effect refers to genes whose expression differed between lines when they were fed with the V diet. The diet effect refers to the effect of the V diet for each isogenic line ("up"=gene was up-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet; "down"=gene was down-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet).

Although an accurate measure of feed intake is not possible at early life stages of fish and knowledge on fish feeding behaviour is limited, the transcriptomic analysis has allowed the detection of a genetic variability in the expression of genes related to feed intake at an early-stage, confirming the benefit to use such a method. Results have been

Table 4. Genes differentially expressed between the 3 isogenic lines related to amino acid metabolism and genes previously identified as enteropathy markers.

Swiss Prot	Description	Genotype effect	Diet effect		
			R23h	AB1h	A22h
Q68FT5	Betaine–homocysteine S-methyltransferase 2 (BHMT2)	R23h >AB1h, R23h >A22h	up	up	ns
Q32LQ4	Betaine–homocysteine S-methyltransferase 1 (BHMT1)	R23h >AB1h, R23h >A22h	up	up	ns
Q58DW2	Cystathionine gamma-lyase (CTH)	R23h >A22h	up	up	ns
P13444	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-1 (Mat1)	R23h >A22h	up	up	ns

The genotype effect refers to genes whose expression differed between lines when they were fed with the V diet. The diet effect refers to the effect of the V diet for each isogenic line ("up"=gene was up-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet; "down"=gene was down-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet).

confirmed by qPCR for the genes tested (Fig 4).

As genes involved in perception and regulation of feed intake were differentially expressed between R23h and A22h fish, we hypothesized that differences in feed intake could be the first step distinguishing RBT on their ability to grow with a plant-based diet. These results are in line with previous data obtained in the same line after a long-term feeding trial, where different feed intake had been recorded for these isogenic lines [24]. The difference in feed intake could stem either through perception mechanisms or through direct effects on feeding motivation.

Perception

All the genes linked to perception were under expressed in R23h, and except the red-sensitive opsin, the expression of those genes was not affected by the V diet in the R23h fish but was significantly up-regulated in A22h fish fed the V diet. Noteworthy, the expression of several of these genes (e.g. Opsin, Retinaldehyde-binding protein, GRM8) was also altered in the brain of juvenile RBT following a plant-based diet feeding period at the fry stage, suggesting a long-term programming effect of early plant-based diet exposure on pathways of sensory perception [25].

We hypothesise that some of these differences in the expression of genes related to sensory perception could impact fish environmental perception, and notably food perception. Fish with the highest growth rate (R23h) might have a lower aversion to components present in this plant-based diet, and thus higher feed intake. We present, for the first time, a list of genes that could potentially affect the acceptance of a plant-based diet during the first weeks after first-feeding. Most of these genes have not been characterised in fish, and further investigations are needed to determine their specific roles in the acceptance of plant-based diets in RBT.

Appetite-regulating peptides

Variations in mRNA expression of genes encoding molecules involved in the control of feed intake were also found in the lines fed the V diet. Neuropeptide expression, which presents a high variation during and after meal time, is impacted by the quantity of feed ingested by fish. As outlined by Balasubramanian *et al.*, changes in their expression level may indicate downstream effects caused by differences in feed intake [25]. But variations in the expression or regulation of neuropeptides can also directly induce different feed intake among the lines. In this case, higher expression of orexigenic factors in R23h in comparison to A22h might reflect higher appetite for the plant-based

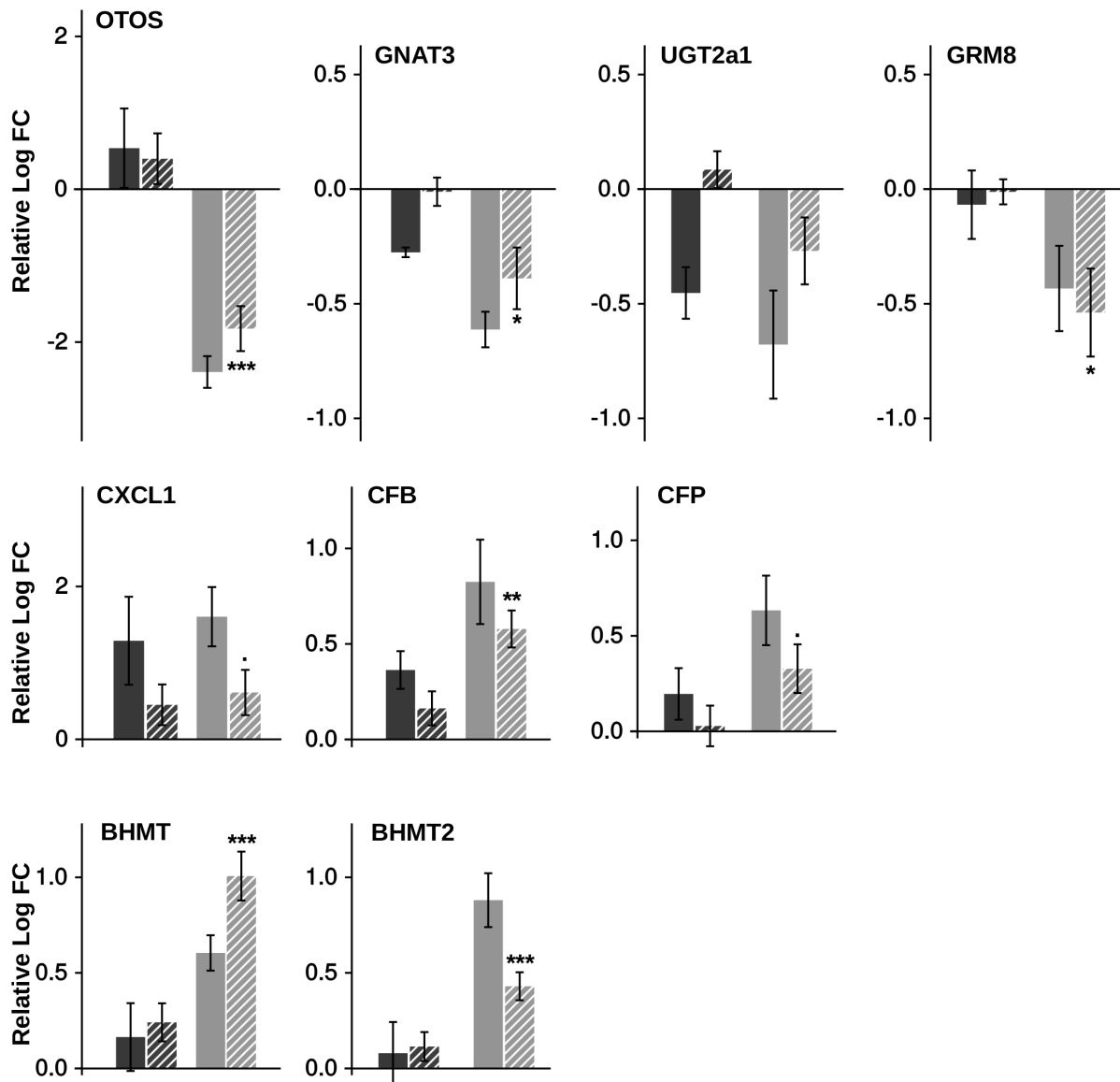


Fig 4. qPCR results. Fold changes obtained by microarray (fill) and by qPCR (hatched) when fed the M diet (dark grey) or the V diet (light grey) for genes involved in sensory perception (R23h *versus* A22h), immunity (R23h *versus* AB1h) and for amino acid metabolism (R23h *versus* A22h).

diet. In our study, two serotoninins (Htr3a and Htr1e) were more expressed in R23h in comparison to A22h when fed the V diet. Hayes *et al.* [45] found that Htr3a receptor positively regulates feed intake in rats. GRM8 can also influence NPY [46, 47], known to stimulate feed intake, but its role is not yet well understood. In contrast, the PomC-b gene which is the precursor peptide for the melanin-concentrating hormones (MSH) which negatively regulates feed intake [48], was less expressed in R23h than in the A22h lines when fed the V diet. A particular attention should therefore be given to these genes, which might be molecular markers related to feed intake regulation.

Few genes related to metabolism

As plant-based diets are known to highly affect different metabolism pathways [5,9–15], it could be hypothesized that, in addition to potential difference in feed intake, differences in metabolism among genotypes could also explain why some fish grow better with such diets.

Differences in the methionine metabolism were revealed among lines when fed the V diet. Methionine metabolism is crucial in fish as methionine donates a methyl group to methylate DNA, proteins, lipids, and other intracellular metabolites that lead to homocysteine formation (transmethylation pathway). Homocysteine can then either be recycled to methionine (remethylation pathway), or engaged in the formation of cysteine and taurine (transsulfuration pathway) [49,50]. Expression of genes encoding for enzymes from these three pathways (BHMT1, BHMT2, Mat1a, CGL) were up-regulated by the V diet in the two lines having the best growth rates (R23h and AB1h). Results have been confirmed for the two genes tested (BHMT1 and BHMT2) by qPCR (Fig 4).

The lack of taurine in plant-based diets has been proposed as a possible explanation for the reduced performance observed in fish fed plant diets [8], and taurine supplementation improved RBT growth [51]. Results obtained in the present study possibly indicated either a higher taurine biosynthesis in R23h in comparison to A22h, or a higher requirement for taurine in A22h genotypes which may contribute to the growth differences. This result confirms the interest of paying attention to the level of taurine in plant-based diets, in addition to that of methionine.

No other biological process GO related to metabolism pathways, differentiated the three lines when fed the V diet. Nevertheless, as we worked on whole fry, the expression of some genes which could be differentially expressed in some specific organs may not have been revealed by our analysis. At this stage of life, the liver, the organ responsible for the regulation of metabolism, represents only a small proportion of whole fry in comparison to muscle [28]. Further analyses are thus needed on specific organs to strengthen our findings regarding metabolism.

Immunity: existence of genotype variability

Finally, several genes linked to immunity were identified to vary among genotypes in our analysis of fry transcriptome. Results have been confirmed for two genes amongst the three tested (Fig 4). Due to the whole genome duplication that occurred in salmonids [27], validating transcriptomic data by qPCR studies are often challenging due to the presence of duplicated and highly similar genes whose transcripts might be differentially regulated [28].

The results obtained in the present study demonstrated the existence of a genetic variability in the expression of genes related to immunity at an early-stage. This result corroborates a previous transcriptomic analysis which also revealed a differential expression of some immunity genes between two families of European sea bass differing in their growth response to a plant-based diet [14].

R23h line seems to be less affected by the plant-based diet

Overall, the effect of the diet seems negligible in the R23h line as expression of most genes related to immunity was unaffected by the V diet. In contrast, the majority of these genes were down-regulated in the two other lines when fed the V diet. R23h fish could be less affected by dietary factors and fish from these lines could spend less energy on modulation of the immune function, improving thus its growth.

Firstly, FO and vegetable oils differ greatly in their FA profile, and this affects gene expression related to immunity [10,11,16] and immunity parameters by altering

immune cell phospholipids and/or eicosanoid production, key hormones in immune response derived from FA [52]. While ω -3 LC-PUFA such as EPA (eicosapentaenoic acid), abundant in FO, are precursors of prostaglandins and leukotrienes, known to have anti-inflammatory action in mammals [53,54], vegetable oils are usually rich in omega-9 and omega-6 LC-PUFA [55], which produce mainly pro-inflammatory molecules.

No genes related to the lipid metabolism were found differentially expressed among the three lines when fish were fed the V diet. But as the use of whole fry could potentially hide some differences in gene expression, as previously explained [28], we hypothesize that fish with higher growth rates (R23h and AB1h) could have higher capacity to biosynthesized ω -3 LC-PUFA and might thus be less susceptible to their lack in plant-based diets. This hypothesis is reinforced by data obtained in liver of the three same lines after 6 months of feeding where the gene coding for the FA desaturase and elongase implicated in biosynthesized of these LC-PUFA was more expressed in the AB1h and R23h fish (unpublished data).

Secondly, numerous studies have shown that anti-nutritional factors (ANF) present in vegetable meals, may cause gut inflammation (enteritis), characterised by an intestinal dysfunction. Presence of ANF leads to a rapid alteration of liver and intestine transcriptome profiles [36–40,56,57], even when diets were carefully formulated to diminish their negative effects [13].

Although, effects of ANF has not been clearly demonstrated at early-stage in Atlantic salmon fry fed a diet containing 16.7% soybean meal [38], we could also hypothesize that modifications in the transcriptomic profiles of AB1h and A22h fish might indicate subtle changes in biological processes, and that these two lines were affected by ANF, while R23h fish might be less susceptible to these factors. Expression of some of the previously identified enteropathy markers indicated indeed that AB1h and A22h fish may be affected by ANF (Tables 5 and 6). Among those genes, some genes were involved in the epithelial barrier [37,38], the activation of the T and B cell functions via the up-regulation of the GTPase IMAP family member 7, and the major histocompatibility complex, which plays a crucial role by presenting antigenic peptides to T cells [58]. Moreover, annexins which are usually highly up-regulated during enteritis, contributing to the intestinal resistance due to their anti-inflammatory properties [37–39], were also up-regulated in the A22h line. Other markers such as the fatty acid-binding protein or the NF- κ -B inhibitor α were also up-regulated in AB1h, as expected during enteritis [37,40].

Expression of some of the previously identified enteropathy markers was however regulated opposite to what would be expected during enteritis in AB1h or A22h (Ig mu chain C, Hes-1, Cebpz), or was also affected in the R23h line (IGKV4-1, MMP-9). And, as both FO and FM were replaced, expression of genes related to immunity could be also affected by the interaction between ANFs and FA (Complement system for example). Further analyses after a long-term feeding (transcriptomic and histological analysis of the intestine) are needed to gather information on how fish from these three lines were affected by those different factors to confirm the hypotheses.

Conclusion

Isogenic lines constitute a relevant biological material in this study as the reduced variability within each line enhances the statistical power to detect differences among groups. The transcriptomic approach, without *a priori* hypothesis, allowed us to set up a list of molecular markers which may play a role in the acceptance and utilisation of plant-based diets at an early stage, known as a critical rearing phase [22,24]. Although only analysis on whole fry are feasible at this highly important stage, possibly hiding some effects on specific organs, we were able to identify an important number of

molecular markers linked to the utilisation of a plant-based diet. Moreover, the comparison of three isogenic lines with two lines performing better with plant-based diets (R23h and AB1h) than the third one (A22h) reveals different pathways, showing that there are different possible strategies to optimise utilisation of such diets.

Several of these genes had been previously identified in other studies and we confirm their potential role in the utilisation of a plant-based diet (immunity, methionine metabolism). In addition, we found new genes, several of which are linked to sensory perception and appetite regulation. Pathways linked to vision, olfaction and feed intake regulation had previously been mentioned in a transcriptomic analysis that studied the nutritional programming of plant-based diets acceptance in RBT [25]. These convergent data strongly suggest that sensory perception is a key determinant of the acceptance of plant-based diets at an early stage. Studying sensory perception mechanisms and the regulation of feed intake by dietary factors should help improve the formulation of plant-based diets, thus improving performance of fish fed diets devoid of marine ingredients.

Acknowledgments

We thank F. Sandres and F. Terrier for manufacturing the experimental diets (INRA, Donzaq, France), A. Le Cam (INRA-LPGP, Rennes, France) for technical assistance, and J. Almany for language editing.

References

1. The state of world fisheries and aquaculture 2016, FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.
2. Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 2000;405(6790):1017–1024.
3. Tacon AG, Metian M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*. 2008;285(1):146–158.
4. Medale F, Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Quillet E, Aubin J, Panserat S. Plant based diets for farmed fish. *INRA Productions animales*. 2013;26(4):303–315.
5. Panserat S, Hortopan G, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, et al. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*. 2009;294(1):123–131.
6. Drew MD, Ogunkoya AE, Janz DM, Van Kessel AG. 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*. 2007;267(1):260–268.
7. Espe M, Lemme A, Petri A, El-Mowafi A. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture*. 2006;255(1):255–262.
8. The National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press; 2011.

9. Panserat S, Kolditz C, Richard N, Plagnes-Juan E, Piumi F, Esquerré D, et al. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *British Journal of Nutrition*. 2008;100(5):953–967.
10. Leaver MJ, Villeneuve LA, Obach A, Jensen L, Bron JE, Tocher DR, et al. 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*. 2008;9(1):299.
11. Morais S, Pratoomyot J, Taggart JB, Bron JE, Guy DR, Bell JG, et al. Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC genomics*. 2011;12(1):255.
12. Morais S, Pratoomyot J, Torstensen BE, Taggart JB, Guy DR, Bell JG, et al. Diet × genotype interactions in hepatic cholesterol and lipoprotein metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to replacement of dietary fish oil with vegetable oil. *British journal of nutrition*. 2011;106(10):1457–1469.
13. Tacchi L, Secombes CJ, Bickerdike R, Adler MA, Venegas C, Takle H, et al. Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics*. 2012;13(1):363.
14. Geay F, Ferrareso S, Zambonino-Infante JL, Bargelloni L, Quentel C, Vandeputte M, et al. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC genomics*. 2011;12(1):1.
15. Jordal AE, Lie Ø, Torstensen B. Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*. 2007;13(2):114–130.
16. Morais S, Silva T, Cordeiro O, Rodrigues P, Guy DR, Bron JE, et al. Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bmc Genomics*. 2012;13(1):448.
17. Pierce LR, Palti Y, Silverstein JT, Barrows FT, Hallerman EM, Parsons JE. Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype × diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2008;278(1):37–42.
18. Le Boucher R, Quillet E, Vandeputte M, Lecalvez JM, Goardon L, Chatain B, et al. Plant-based diet in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): Are there genotype-diet interactions for main production traits when fish are fed marine vs. plant-based diets from the first meal? *Aquaculture*. 2011;321(1):41–48.
19. Dupont-Nivet M, Médale F, Leonard J, Le Guillou S, Tiquet F, Quillet E, et al. Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture*. 2009;295(1):15–21.

20. Overturf K, Vallejo RL, Palti Y, Barrows FT, Parsons JE. Microarray analysis of differential utilization of plant-based diets by rainbow trout. *Aquaculture international*. 2012;20(2):213–232.
21. Abernathy J, Brezas A, Snekvik K, Hardy RW, Overturf K. Integrative functional analyses using rainbow trout selected for tolerance to plant diets reveal nutrigenomic signatures for soy utilization without the concurrence of enteritis. *PLoS one* 2017;12(7):e0180972. doi.org/10.1371/journal.pone.0180972.
22. Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, Kerneis T, Goardon L, Labbe L, et al. Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PloS one*. 2012;7(9):e44898.
23. Callet T, Médale F, Larroquet L, Surget A, Aguirre P, Kerneis T, et al. Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLOS ONE*. 2017;12(10):1–21. doi:10.1371/journal.pone.0186705.
24. Geurden I, Borchert P, Balasubramanian MN, Schrama JW, Dupont-Nivet M, Quillet E, et al. The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS One*. 2013;8(12):e83162.
25. Balasubramanian MN, Panserat S, Dupont-Nivet M, Quillet E, Montfort J, Le Cam A, et al. Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC genomics*. 2016;17(1):449.
26. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & shellfish immunology*. 2007;22(5):510–519.
27. Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M, Noël B, et al. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature communications*. 2014;5.
28. Lazzarotto V, Corraze G, Larroquet L, Mazurais D, Médale F. 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*. 2016;115(12):2079–2092.
29. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; 2015. Available from: <https://www.R-project.org/>.
30. Kauffmann A, Gentleman R, Huber W. arrayQualityMetrics—a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*. 2009;25(3):415–416.
31. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, editors. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. New York: Springer; 2005. p. 397–420.
32. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4(1):44–57.

33. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*. 2009;37(1):1–13.
34. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611–622.
35. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45–e45.
36. De Santis C, Bartie KL, Olsen RE, Taggart JB, Tocher DR. Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2015;15:1–11.
37. Kortner TM, Skugor S, Penn MH, Mydland LT, Djordjevic B, Hillestad M, et al. Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC veterinary research*. 2012;8(1):1.
38. Sahlmann C, Sutherland BJ, Kortner TM, Koop BF, Krogdahl Å, Bakke AM. Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish & shellfish immunology*. 2013;34(2):599–609.
39. Skugor S, Grisdale-Helland B, Refstie S, Afanasyev S, Vielma J, Krasnov A. Gene expression responses to restricted feeding and extracted soybean meal in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*. 2011;17(5):505–517.
40. Krogdahl Å, Gajardo K, Kortner TM, Penn M, Gu M, Berge GM, et al. Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(15):3887–3902.
41. Geurden I, Corraze G, Boujard T. Self-feeding behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Applied animal behaviour science*. 2007;108(3):313–326.
42. Geurden I, Cuvier A, Gondouin E, Olsen R, Ruohonen K, Kaushik S, et al. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & behavior*. 2005;85(2):107–114.
43. Hara T. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *Journal of Fish Biology*. 2006;68(3):810–825.
44. Valentinčič T, Caprio J. Visual and chemical release of feeding behavior in adult rainbow trout. *Chemical senses*. 1997;22(4):375–382.
45. Hayes MR, Covasa M. Dorsal hindbrain 5-HT₃ receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation. *Brain research*. 2006;1103(1):99–107.
46. Higgins SE, Ellestad LE, Trakooljul N, McCarthy F, Saliba J, Cogburn LA, et al. Transcriptional and pathway analysis in the hypothalamus of newly hatched chicks during fasting and delayed feeding. *BMC genomics*. 2010;11(1):1.

47. Gast MT, Tönjes A, Keller M, Horstmann A, Steinle N, Scholz M, et al. The role of rs2237781 within GRM8 in eating behavior. *Brain and behavior*. 2013;3(5):495–502.
48. Volkoff H. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Frontiers in neuroscience*. 2016;10.
49. Li P, Mai K, Trushenski J, Wu G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids*. 2009;37(1):43–53.
50. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition*. 2006;136(6):1636S–1640S.
51. Gaylord TG, Barrows FT, Teague AM, Johansen KA, Overturf KE, Shepherd B. Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2007;269(1):514–524.
52. Montero D, Izquierdo M. Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*. 2010; p. 439–486.
53. Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2009;55(1-3):123–139.
54. Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*. 2003;38(4):323–341.
55. Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*. 2003;11(2):107–184.
56. Król E, Douglas A, Tocher DR, Crampton VO, Speakman JR, Secombes CJ, et al. Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC genomics*. 2016;17(1):156.
57. Martin SA, Dehler CE, Król E. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016;.
58. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994;76(2):287–299.

Supporting information

S1 File. Sequence of primers used for gene expression analysis by real-time PCR.

S2 File. Fold changes and p-value associated with each gene found differentially expressed among the three lines, identified as potential molecular markers linked to plant-based diets utilisation.

S3 File. GO terms found significantly enriched (Cut-off: p-value<0.01 ; Benjamini<0.1).

Table 5. Genes differentially expressed between the 3 isogenic lines related to immunity and genes previously identified as enteropathy markers.

Swiss Prot	Description	Genotype effect	Diet effect			Effect ANF
			R23h	AB1h	A22h	
Complement						
P98093	Complement C3 (Fragment) (C3)	R23h >AB1h	ns	ns	ns	down [36]
P04186	Complement factor B (CFB)	R23h >AB1h	ns	down	ns	
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (CFH)	R23h >AB1h	ns	ns	ns	
P20023	Complement receptor type 2 (CR2)	R23h >AB1h	ns	ns	up	
Q66S62	Mannose-binding protein C (MBL2)	R23h >AB1h	down	down	down	
Q5RBP8	Properdin (CFP)	R23h >AB1h	ns	down	down	up [37]
T and B cell regulation						
Q9NUV9	GTPase IMAP family member 4 (GIMAP4)	R23h >AB1h	ns	ns	ns	down [38]
Q8NHV1	GTPase IMAP family member 7 (GIMAP7)	R23h <A22h	ns	ns	up	up [38]
P06314	Ig kappa chain V-IV region B17 (IGKV4-1)	R23h >AB1h, R23h >A22h	up	ns	down	up [38]
P23735	Ig mu chain C region membrane-bound form	R23h <AB1h	down	ns	ns	up [38]
P23735	Ig mu chain C region membrane-bound form	R23h >A22h	ns	ns	down	up [38]
Antigen processing and presentation						
P14483	H-2 class II histocompatibility antigen, A β chain	R23h <A22h	ns	ns	ns	
P15979	Class I histocompatibility antigen, F10 α chain	R23h >A22h	ns	ns	ns	
P36372	Antigen peptide transporter 2 (Tap2)	R23h >A22h	ns	ns	ns	
Q9R233	Tapasin (Tapbp)	R23h >A22h	ns	ns	ns	
Q8VD31	Tapasin-related protein (Tappl)	R23h >A22h	ns	ns	ns	
Q8VCW4	Protein unc-93 homolog B1 (Unc93b1)	R23h >A22h	ns	down	ns	
Q9JJ22	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Erap1)	R23h >AB1h	ns	down	ns	
P35737	Class II histocompatibility antigen, M β 1 chain	R23h >AB1h	ns	down	ns	
Q95IT1	HLA class I histocompatibility antigen, α chain G	R23h >AB1h	ns	ns	ns	
P01897	H-2 class I histocompatibility antigen, L-D α chain	R23h >AB1h	ns	down	ns	
Q8HQB0	Major histocompatibility complex class I-related gene protein	R23h >AB1h	ns	down	ns	
P14483	H-2 class II histocompatibility antigen, A β chain	R23h >AB1h	ns	down	up	
P15981	SLA class II histocompatibility antigen, DQ haplotype D α chain	R23h >AB1h, R23h >A22h	ns	ns	ns	
P04223	H-2 class I histocompatibility antigen, K-K α chain	R23h >AB1h, R23h >A22h	ns	down	ns	

The genotype effect refers to genes whose expression differed between lines when they were fed with the V diet. The diet effect refers to the effect of the V diet for each isogenic line ("up"=gene was up-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet; "down"=gene was down-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet) Effect of ANF refers to the known effect of ANF, according to literature.

Table 6. Genes, differentially expressed between the 3 isogenic lines, previously identified as enteropathy markers.

Swiss Prot	Description	Genotype effect	Diet effect			Effect ANF
			R23h	AB1h	A22h	
Q8HZM6	Annexin A1 (ANXA1)	R23h <AB1h, R23 <A22h	ns	ns	up	up [37, 39]
P24801	Annexin A2-B (anxa2-b)	R23 <A22h	ns	ns	ns	up [38]
Q8HYP5	C-C motif chemokine 21 (CCL21)	R23h >AB1h	ns	down	ns	down [37]
P53569	CCAAT/enhancer-binding protein zeta (Cebpz)	R23h >AB1h	ns	down	ns	up [37, 39]
Q56JX9	Fatty acid-binding protein, intestinal (FBP2)	R23h <AB1h	ns	up	ns	up [37, 40]
P13284	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (IFI30)	R23h >A22h	ns	ns	down	down [37]
Q9BDB7	Interferon-induced protein 44-like (Ifi44l)	R23h >AB1h	ns	ns	down	down [37, 38]
O62644	Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2)	R23h <AB1h, R23 <A22h	ns	ns	up	up [39]
Q1JPB0	Leukocyte elastase inhibitor (SERPINB1)	R23 <AB1h	ns	ns	ns	up [37, 38]
O60449	Lymphocyte antigen 75 (LY75)	R23h >AB1h	ns	ns	ns	down [39]
P25963	NF-kappa-B inhibitor α (NFKBIA)	R23h <AB1h	ns	up	ns	up [37]
Epithelial barrier						
Q9Y251	Heparanase (HSPE)	AB1h >A22 h	ns	up	ns	up [38]
P14780	Matrix metalloproteinase-9 (MMP9)	R23 <A22h	up	up	up	up [37]
Q9TTY1	Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)	R23 <A22h	ns	down	up	up [37]
Q02817	Mucin-2 (Muc2)	R23h <A22h	ns	ns	ns	up [38]
Q04666	Transcription factor HES-1 (Hes1)	AB1h >A22h	ns	ns	down	up [38]

The genotype effect refers to genes whose expression differed between lines when they were fed with the V diet. The diet effect refers to the effect of the V diet for each isogenic line ("up"=gene was up-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet; "down"=gene was down-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet) Effect of ANF refers to the known effect of ANF, according to literature.

Table 7. Correlation between gene expression patterns obtained through real-time PCR and microarray approaches.

Gene		Correlation Coefficient	P-value
Amino acid metabolism			
BHMT	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	0.71	2.78E-06
BHMT2	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 2	0.69	7.28E-06
Immunity			
CFB	Complement factor B	0.61	1.39E-04
CFP	Properdin	0.51	2.26E-03
CXCL1	Growth-regulated α protein	0.71	4.45E-06
Sensory Perception			
OTOS	Otospiralin	0.92	7.11E-15
Ugt2a1	UDP-glucuronosyltransferase 2A1	0.62	1.04E-04
GNAT3	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit α -3	0.78	4.80E-08
Other			
SERPINC1	Antithrombin-III	0.64	4.91E-05

Coefficient correlation were obtained with a Pearson test.

Publication : les principaux résultats

- Les résultats de croissance obtenus lors de cette expérimentation sont en accord avec des résultats précédents (Geurden *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2016). Alors que les poids moyens des poissons des différentes lignées nourries avec l'aliment M n'étaient pas significativement différents après 5 semaines d'alimentation ($0,48 \pm 0,03$ g, P-value > 0,05), les poissons R23h étaient en moyenne plus gros que les poissons AB1h (-18%) et A22h (-50%) lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment 100% V.
- Après 5 semaines d'alimentation, aucune différence de survie n'a été détectée entre les trois lignées.
- Après 5 semaines d'alimentation, 1740, 1834 et 246 sondes ont été identifiées comme de potentiels marqueurs liés à la capacité des poissons à survivre et grandir avec un aliment à base de végétaux, pour les comparaisons R23h *versus* AB1h, R23h *versus* A22h et AB1h *versus* A22h, respectivement. Grâce aux analyses d'enrichissement de GO, plusieurs fonctions ont été identifiées au sein de ces trois listes de potentiels marqueurs (Liste complète en annexe vii). Ces fonctions pourraient être à l'origine des capacités contrastées de ces trois lignées pour grandir efficacement avec l'aliment 100% V. On peut citer parmi les résultats obtenus :
 - 70 gènes impliqués dans des processus du système neurologique. Parmi ces gènes, 25 étaient liés à la perception (vision, olfaction, perception des sons) et à la consommation d'aliment (liste complète dans la publication scientifique)
 - 49 gènes liés à l'immunité
 - 4 gènes liés au métabolisme des AA soufrés (BHMT1, BHMT2, Mat1, CTH)

6.3 Discussion : fonctions impliquées dans les capacités des TAC à grandir avec des aliments V

Bien que les réponses au cours des phases précoces aient été identifiées comme essentielles pour les futures capacités à grandir avec des aliments V, aucune étude ne s'était encore intéressée à identifier les fonctions impliquées dans la capacité de certains génotypes à grandir avec des aliments V lors de ces phases. Ces premiers résultats obtenus à court terme chez la TAC sont donc très prometteurs, d'autant plus que le nombre de marqueurs potentiels identifiés a été élevé (avec des P-values corrigées < 0,05). Les études de nutriginomique chez les poissons sont généralement confrontées à des difficultés pour identifier des gènes différentiellement exprimés entre différentes conditions après que des corrections pour tests multiples aient été appliquées (Leaver *et al.*, 2008b), ce qui n'a pas été le cas dans notre étude avec ces trois lignées. Cela pourrait s'expliquer par une faible variabilité d'expression au sein de chaque lignée, associée à une forte variabilité entre les lignées. Ces propriétés renforcent l'intérêt d'utiliser ce matériel biologique.

Cependant, l'interprétation des résultats est d'autant plus difficile que le nombre de sondes est grand. Au vu du nombre important de GO trouvées et du nombre de sondes dans chaque

Tableau 6.1 – Liste de potentiels marqueurs liés à la consommation d'aliment différenciellement exprimée entre les lignées R23h et A22h avant la première alimentation (Effet génotype à J0). Pour l'effet de l'aliment 100 % V : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet du Génotype J0	5 semaines	Effet de l'aliment 100% V	
				R23h	A22h
Vision					
Q9BGL2	Lecithin retinol acyltransferase (LRAT)	R23h<A22h	R23h<A22h	ns	+
P35349	Metabotropic glutamate receptor 6 (Grm6)	R23h<A22h	R23h<A22h	ns	+
Q9XT54	Retinal rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase (P2E6D)	R23h<A22h	R23h<A22h	ns	+
Q9ZI275	Retinaldehyde-binding protein 1 (Rlbp1)	R23h>A22h	R23h<A22h	ns	+
Q96NR8	Retinol dehydrogenase 12 (RDH12)	R23h>A22h	R23h<A22h	ns	ns
Perception auditive					
Q8NHW6	Otospiralin (OTOS)	R23h<A22h	R23h<A22h	-	+
P58743	Prestin (SLC26A5)	R23h>A22h	R23h>A22h	ns	ns
Prise alimentaire					
P28566	5-hydroxytryptamine receptor 1E (Htr1E)	R23h>A22h	R23h>A22h	ns	-
P70579	Metabotropic glutamate receptor 8 (GRM8)	R23h<A22h	R23h<A22h	ns	+

catégorie de GO, nous avons décidé de nous concentrer sur les voies qui nous paraissent les plus pertinentes, notamment sur les GO relatifs à des processus biologiques. Trois grandes fonctions différenciant les lignées ont ainsi été identifiées et expliquent les capacités contrastées des trois lignées isogéniques nourries avec l'aliment 100% V après 5 semaines. Elles sont détaillées dans les paragraphes suivants. Ces différences pourraient être à l'origine des disparités de croissance observées à court terme entre les génotypes de TAC nourries avec l'aliment V.

6.3.1 Rôle majeur de la consommation d'aliment à court terme

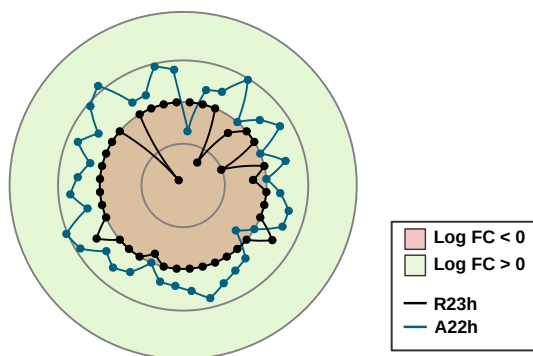


FIGURE 6.2 – Effet de l'aliment 100% V sur l'expression des gènes de la perception pour les lignées R23h (noir) et A22h (bleu), après 5 semaines d'alimentation.

Il a été proposé que la baisse de la consommation de l'aliment V pourrait être le résultat d'une aversion pour l'aliment V ou d'un effet rétroactif de certains composants de cet aliment sur la régulation de la prise alimentaire (Geurden *et al.*, 2005). Bien qu'une mesure de la consommation d'aliment ne soit pas envisageable durant les phases précoces en raison de la petite taille de granulés, adaptée à la taille de la bouche des poissons, la constance dans l'expression des gènes de la perception chez les poissons R23h lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V pourrait refléter une moindre sensibilité aux différentes substances présentes dans les farines végétales chez ces poissons. À l'inverse, ces gènes étaient significativement sur-exprimés avec l'aliment V chez les poissons A22h (Figure 6.2).

Parallèlement, l'expression plus importante de gènes codants pour des facteurs orexigéniques (Galanin) et l'expression moins importante des gènes codants pour des facteurs anorexigéniques chez les poissons R23h (PomCb) pourrait également être la cause d'une plus forte quantité d'aliment consommé chez ces poissons, en comparaison des poissons A22h.

Parmi les 25 gènes trouvés après 5 semaines d'alimentation, seuls 9 d'entre eux étaient déjà différenciellement exprimés entre R23h et A22h avant la première alimentation (Tableau 6.1).

6.3.2 Rôle mineur du métabolisme à court terme

Lors des phases précoces, peu de différences ont été détectées au niveau de l'expression des gènes du métabolisme, à l'exception de quatre gènes impliqués dans le métabolisme des AA soufrés et notamment dans la synthèse de la taurine. Ces différences pourraient expliquer en partie les différences de croissance observées, puisque cet AA, limitant dans les matières premières d'origine végétale (Liaset et Espe, 2008), est impliqué dans la régulation de diverses voies du métabolisme (Ripps et Shen, 2012; Hoang *et al.*, 2012). Alors que l'expression de ces gènes n'a pas été significativement modifiée par l'aliment V chez les poissons A22h, ils étaient sur-exprimés chez les poissons R23h et AB1h avec l'aliment V, suggérant une meilleure capacité des poissons de ces deux dernières lignées à faire face au manque de taurine.

Tableau 6.2 – Liste de potentiels marqueurs liés à l'immunité différentiellement exprimée entre les lignées R23h et A22h avant la première alimentation (Effet génotype à J0). Pour l'effet de l'aliment 100 %V : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype		Effet aliment 100%V		
		J0	5 semaines	R23h	AB1h	A22h
Complément						
P04186	Complement factor B (CFB)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	-	ns
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (CFH)	R23h<AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	ns
P20023	Complement receptor type 2 (CR2)	R23h<AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	+
Q5RBP8	Properdin (CFP)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	-	-
P14483	H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain	R23h<A22h	R23h<A22h	ns	ns	ns
Q9R233	Tapasin (Tapbp)	R23h>A22h	R23h<A22h	ns	ns	ns
Q9JJ22	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Erap1)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	-	ns
NF-kappa B Signaling Pathway						
P25963	NF-kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA)	R23h<AB1h	R23h>AB1h	ns	+	ns
Barrière épithéliale						
P14780	Matrix metalloproteinase-9 (MMP9)	R23<A22h	R23<A22h	+	+	+
Q9TTY1	Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)	R23<A22h	R23<A22h	ns	-	+
Marqueurs entériques						
P13284	γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase (IFI30)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	-
O62644	Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2)	R23h<AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	+
O60449	Lymphocyte antigen 75 (LY75)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	ns
Autre						
P01867	Ig gamma-2B chain C region (Igh-3)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	ns
P58195	Phospholipid scramblase 1 (Plscr1)	R23h>AB1h	R23h<AB1h	ns	+	+
Q5ZL74	Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)	R23h>AB1h	R23h>AB1h	ns	ns	+

Bien que l'analyse avant la première alimentation ait permis d'identifier des différences pré-existantes entre les lignées R23h et AB1h au niveau de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le catabolisme des AA, aucun des gènes identifiés après 5 semaines d'alimentation n'étaient différenciellement exprimés avant le premier repas. Les différences liées au métabolisme (Paragraphe 6.1), trouvés entre les lignées avant le premier repas ne semblent donc pas influencer les futures capacités des poissons à utiliser l'aliment V lors des phases précoces de croissance.

6.3.3 Implication de l'immunité

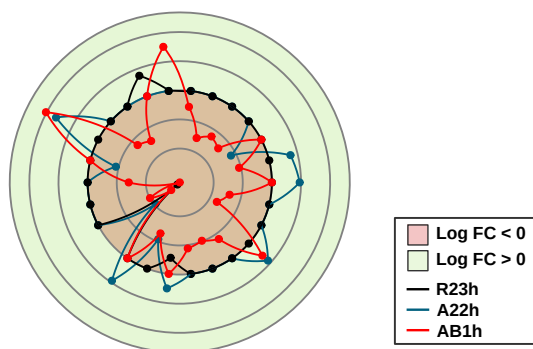


FIGURE 6.3 – Effet de l'aliment 100% V sur l'expression des gènes de l'immunité pour les lignées R23h (noir), AB1h (rouge) et A22h (bleu), après 5 semaines d'alimentation.

Des variations liées à l'immunité pourraient également être à l'origine des différences de performance entre les lignées, puisqu'un certain nombre de gènes étaient différenciellement exprimés entre les trois lignées, nourries avec l'aliment V. Il est maintenant reconnu que les aliments V modulent fortement l'expression d'un certain nombre de gènes de l'immunité et cela en raison, notamment de la présence de facteurs anti-nutritionnels (Kroghdahl *et al.*, 2010), mais également en raison des différences du profil en AG de ces aliments (Montero et Izquierdo, 2010). Or, après 5 semaines d'alimentation, l'expression de la majorité de ces gènes n'a pas été modifiée chez les poissons R23h, alors qu'ils étaient soit sur-exprimés, soit sous-exprimés chez les poissons des deux autres lignées, AB1h et A22h (Figure 6.3). Les poissons R23h pourraient être moins sensibles aux facteurs affectant normalement la composante immunitaire chez les TAC et pourrait ainsi allouer davantage d'énergie à la croissance. Pour 16 de ces gènes (sur les 244 gènes de l'immunité trouvés à J0), des différences d'expression préexistaient entre ces trois lignées avant la première alimentation (Tableau 6.2).

6.3.4 Comparaison des données d'expression aux différents temps


Parmi les sondes identifiées comme de potentiels marqueurs de la capacité à utiliser des aliments V après 5 semaines d'alimentation, 30,9, 41,2 et 61,5% étaient déjà différenciellement exprimés avant la première alimentation. C'est notamment le cas pour 9 et 16 des potentiels marqueurs impliqués dans la consommation d'aliment et l'immunité, respectivement (Tableaux 6.1 et 6.2). En d'autres termes, ces gènes, qui ont été identifiés comme des facteurs pouvant expliquer les différences de capacité à grandir avec l'aliment V, étaient, avant même que les poissons soient confrontés à l'aliment V, déjà différenciellement exprimés entre les lignées. Pour 7 gènes liés à la consommation d'aliment et 10 gènes liés à l'immunité, les différences d'expression entre les lignées avant le premier repas et après 5 semaines d'alimentation vont dans le même sens. Il n'est cependant pas possible de savoir si ces différences pré-existantes

(ou différences intrinsèques aux lignées) ont influencé (soit positivement, soit négativement) ou non, les capacités des poissons lors des phases précoces d'alimentation.

Bien que ces résultats puissent suggérer des prédispositions à l'aliment V chez R23h, des conclusions sont difficiles à tirer. En effet, le nombre de gènes trouvés en commun entre ces deux analyses est faible et pour Rlbp1, RDH12 (perception) et CFH, CR2, Tapbp, NFKBIA et LECT2, leurs expressions avant la première alimentation et après 5 semaines vont dans des sens inverses. De plus, la comparaison de l'expression des gènes entre les deux périodes est délicate, car durant ces premières semaines de vie, les alevins subissent d'importants changements morphologiques et fonctionnels (passage d'une alimentation endogène à exogène) qui sont accompagnés de changements drastiques dans les niveaux d'expression des gènes (Jantzen *et al.*, 2011; White *et al.*, 2013; Mennigen *et al.*, 2013).

■ ■ ■ Conclusion du chapitre 6

La comparaison des transcriptomes des alevins entiers des trois lignées isogéniques, ayant des caractéristiques particulières lorsqu'elles sont nourries avec l'aliment V, nous a permis de mettre en évidence les différences préexistantes entre ces lignées et les fonctions impliquées dans la capacité ou l'incapacité de certaines lignées à grandir efficacement avec l'aliment V à court terme. Notre étude a permis d'identifier, après 5 semaines d'alimentation, de potentiels marqueurs moléculaires liés à la prise alimentaire, à la perception, à la synthèse de taurine et à l'immunité. Lors des phases précoces, la consommation d'aliment et l'immunité semblent donc être les deux points majeurs permettant d'expliquer les différences de performances observées, alors que les variations au niveau métabolique ne joueraient qu'un rôle plus mineur.



7 Les lignées isogéniques après 6 mois : fonctions impliquées dans les capacités à grandir avec l'aliment végétal

Afin d'identifier les fonctions impliquées dans les capacités des différents génotypes de TAC à grandir avec un aliment 100% V à plus long terme, l'expérimentation avec les trois lignées isogéniques présentée dans le chapitre précédent s'est poursuivie durant 5 mois supplémentaires. En plus des deux conditions alimentaires jusqu'alors étudiées (poissons nourris avec un aliment 100% V, aliment M *ad libitum*), la moitié des poissons nourris avec l'aliment M jusqu'à là *ad libitum*, ont été restreints pour qu'ils atteignent le poids des poissons nourris avec l'aliment 100% V.

La survie et le poids ont été suivis durant 6 mois. La consommation d'aliment et l'efficacité alimentaire ont été estimées durant les 52 derniers jours de l'expérimentation. Le foie et l'intestin, organes clefs en nutrition, ont été prélevés 6 mois après le début de l'alimentation, et des analyses du transcriptome ont été effectuées sur ces deux tissus. Différents caractères ont été mesurés : coefficients d'utilisation digestive, paramètres plasmatiques et paramètre immunitaire (M. Danion).

La comparaison des profils transcriptomiques de ces trois lignées, nourries avec l'aliment 100%V, M *ad libitum* ou M restreint, a permis d'identifier de potentiels marqueurs liés aux capacités des trois lignées à grandir avec l'aliment 100%V (*i.e.* sondes différenciellement exprimées entre les lignées lorsque celles-ci sont nourries avec l'aliment V seulement). Ce protocole nous a permis de distinguer parmi ces potentiels marqueurs, ceux :

- liés aux différences de quantité d'aliment consommé entre les trois lignées
- liés aux différences de capacité à utiliser efficacement l'aliment V entre ces trois lignées

Les résultats des analyses sur le foie ont fait l'objet d'une publication scientifique "**Why some rainbow trout genotypes grow better with a complete plant-based diet? A transcriptomic analysis on three isogenic lines**", qui sera prochainement soumise à BMC Genomics (Paragraphe 7.1). Les résultats obtenus sur l'intestin sont présentés en résultats complémentaires (Paragraphe 7.2). L'ensemble de ces résultats est discuté dans la troisième et dernière partie du chapitre (Paragraphe 7.3).

7.1 Publication scientifique

RESEARCH

Why do some rainbow trout genotypes grow better with a complete plant-based diet? A transcriptomic analysis on three isogenic lines

Thérèse Callet^{1,2}, Mathilde Dupont-Nivet², Morgane Danion³, Christine Burel¹, Marianne Cluzeaud¹, Anne Surget¹, Pierre Aguirre¹, Thierry Kerneis⁴, Laurent Labbé⁴, Stéphane Panserat¹, Edwige Quillet², Inge Geurden¹, Sandrine Skiba-Cassy¹ and Françoise Médale^{1*}

*Correspondence:

francoise.medale@inra.fr

¹UMR NuMÉA, INRA, Aquapôle,
64310 Saint Pée-sur-Nivelle,
France

Full list of author information is
available at the end of the article

†Equal contributor

Abstract

In the actual context where the aquaculture production is increasing but the production of fish oil and fish meal, main components of fish diet, remains stable, important research have been conducted in order to replace those products, and especially for diet of salmonids such as rainbow trout (RBT). Due to their relative low prices and high availability, terrestrial plant ingredients are now the most common used ingredients for substitution. However, rates of substitution are limited and a possible way to go forward is, now, to use the genetic variability existing in RBT population to further increase plant inclusion in salmonids diet. We aim to understand why some genotypes are able to use such diet, as the molecular mechanisms underlying this genetic variability have been little studied. To this end, we compared the hepatic transcriptome of three isogenic lines of RBT, which have similar growth when fed a marine resources-based diet (M diet) but which highly differ in their responses to a plant-based diet (V diet).

Results: The analysis of transcriptomes profiles revealed 575, 1770 and 2973 probes differentially expressed among the three lines when fed the V diet. These genes, belonging to the carbohydrates, protein synthesis, lipid and cholesterol metabolisms and also immunity, were linked to the differences in feed efficiencies revealed among the three lines, and thus to their different ability to grow with a plant-based diet.

Conclusion: First, genotypes which had the highest growth were the ones which were the less affected by the V diet, and which had the highest capacity to maintain energy production and protein synthesis. But, it is however not clear if these differences were a consequence or a cause of fish better performance. Secondly, genotypes which were able to activate pathways linked to lipid and cholesterol metabolism, such as the biosynthesis of ω 3 LC-PUFA had the highest growth. Finally, as it has already been demonstrated, immunity seems also to play an important role in ability of fish to use the V diet, but further investigations are needed to understand by which way immunity interacts with growth.

Keywords: Aquaculture; Plant-based diet; Genetic variability; Transcriptomic analysis; Rainbow trout; Isogenic lines

Background

Fish have always been an important food commodity, bringing protein, essential ω 3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) and some essential minerals and vitamins for human. The augmentation of both human population and average fish

consumption *per capita* led to an increasing demand for fish [1]. Mainly provided by fish captures up to the early 20th century, almost half of fish eaten are nowadays produced by the aquaculture, thanks to an exponential growth in its production [1]. This exceptional growth has logically led to an increased demand for aquaculture feed, and for fish oil (FO) and fish meal (FM), their main components. But, because of their limited availability, FO and FM were gradually substituted by plant ingredients since 1990 [2], and this is particularly true for aquafeed of high trophic level species, such as rainbow trout (RBT).

The effects of FM and/or FO substitution by plant products have been extensively studied in salmonids. First, plant-based diets are known to affect feed intake [3, 4, 5], probably due to a change in diet palatability or due to a negative feedback by plants components [6].

Second, fish fed highly substituted diets are less efficient. The lower feed efficiency could stem from a lower nutrient digestibility and absorption, due to the presence of anti-nutritional factors (ANF) impacting both the structure and the functioning of fish digestive tracts [7]. Nutrient deficiencies or inadequacy, such as lacking LC-PUFA, lower levels of phospholipids, presence of indigestible carbohydrates, or unbalanced amino acid profile in plant-based diets, may impair metabolism and subsequently growth [8]. To understand how metabolism is impacted by the substitution, several studies have investigated its effect on transcriptome profiles of liver, which is the key organ in the regulation of metabolism, and have thus identified the main pathways affected by the replacement of FO [9, 10, 11], FM [9, 12, 13] or the replacement of both [14, 15]. Among the most severely impacted pathways by high substitution rates are the LC-PUFA and cholesterol biosynthesis pathways [9, 10, 11, 12]. The protein biosynthesis capacity is decreased and a modification in the amino acid metabolism is observed when FM is replaced by vegetable meals [9, 12, 13]. The replacement of both FM and FO by plant-based ingredients in the salmonids diet is associated with changes in carbohydrate metabolism, in addition to the changes in lipid and protein metabolism, as previously mentioned [14, 15]. Finally, plant-based diets are also known to affect immune fish parameters and expression of some of genes involved in immunity is also highly modified when FO or/and FM are replaced [9, 10, 12, 15].

Although growing knowledge of fish nutrition has allowed to identify the main hindrances to high substitution and the improvement of diet formulation, the complete substitution of both FO and FM since the first feeding by plant ingredients, is not possible in RBT without impairing growth and survival [16, 17].

More recently, a genetic variability for the capacity to grow with such diet have been demonstrated in RBT population [16], and some genotypes are more able than others to survive and grow with plant-based diets [16, 17]. However, few studies have investigated mechanisms explaining this genetic variability while it could be used to further increase proportions of plant ingredients in RBT diet, in future years. A study on European sea bass revealed differences between two families characterised by their different abilities to use a plant-based diet, linked to protein synthesis and immune response [15]. Concerning salmonids, only one study focused on RBT. This study has analysed two families with different capacity to grow with a diet de-

void of fishmeal, but revealed only few markers, linked to the immune response [18].

In the present study, we aim to identify genes, from metabolic and physiological pathways, distinguishing genotypes which have different capacity to grow with plant-based diet. For this purpose and to increase the statistical power to detect differences, we used a specific animal material: three isogenic lines known to have similar growth when fed a marine resources-based diet, and divergent growth when fed a plant-based diet [19, 5]. Differences among the three lines could stem from differences in feed intake, or/and different capacity to grow with such diet among lines. To identify and to distinguish potential molecular markers linked to differences in feed intake from markers linked to differences in the capacity to use a plant-based diet, hepatic transcriptomic profiles were, therefore, compared between these three lines either fed a marine resources-based diet *ad libitum*, a restricted marine resources-based diet or a 100% plant-based diet *ad libitum*, totally devoid of both FM and FO.

Materials and methods

Experimental diets

The two experimental diets, formulated to be isoproteic, isolipidic and isoenergetic, were produced by INRA facilities (UMR Numéa, Donzacq, France). Formulation, composition and fatty acid profiles of both experimental diets are presented in Table 1. The marine resources-based diet (M diet) contained FM, FO and whole wheat as major ingredients. The V diet contained only plant products and was devoid of marine products. Faba bean, corn, soybean, wheat gluten, peas, and white lupin were used as vegetable meals and rapeseed, linseed and palm oils as vegetable oils. To meet the nutrient requirements of rainbow trout, the V diet was supplemented with L-Lysine and L-methionine. An attractant mix was also added in the V diet. Both diets were extruded. Pellet size evolved during the experiment to adapt to fish body size, but composition remained unchanged.

Animal material

The three heterozygous lines studied were three heterozygous isogenic lines, denominated R23h, AB1h and A22h. The three lines were produced in the experimental PEIMA facilities (INRA, Sizun, France). These lines used for scientific research only, were obtained by mating homozygous females from one single isogenic line with individual males from three other homozygous isogenic lines. The homozygous lines were obtained after two generations of gynogenesis and further maintained by within line pair-mating [20]. In order to have enough fish for the whole experience, ova were collected from 33 different females from the same isogenic line (thus sharing the same genome), and were then mixed up. Differences observed between lines could then be attributed only to paternal effects.

Moreover, as fish share the same genotype within each line, those three isogenic lines are relevant biological material to work on as a low within phenotypic variability is expected. These could be valuable when feed intake and feed efficiency were estimated by batch and when genes expression is studied.

Table 1 Ingredients, proximal composition of the experimental diets V, and M, and fatty acid composition of the M and V (2mm) experimental diets (DM: dry matter).

	V diet	M diet
Ingredients (%)		
Fishmeal (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	0	65
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	4	21
Fava bean (CP)	10	0
Corn gluten (CP 60; Inzo, France)	17	0
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)	17	0
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)	12	0
White lupin seed meal (Terrena, France)	5	0
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France)	12.5	0
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	0	11
Rapeseed oil (Daudruy, France)	6	0
Linseed oil(Daudruy, France)	3.6	0
Palm oil(Daudruy, France)	2.4	0
Soy-lecithin (Louis François, France)	2	0
L-Lysine (Eurolysine)	0.5	0
L-Methionine (Evonik, Germany)	0.5	0
CaHPO ₄ .2H ₂ O (18%P; 22%Ca)	3	0
Min. and Vit. premix, INRA ^a	3	3
Attractant mix ^b	1.5	0
Composition (% DM)		
Dry matter	96.9	97.6
Crude protein	51.4	50.1
Crude fat	18.5	19.4
Starch	9.6	14.1
Ash	6.5	12.7
Energy (kJ/g DM)	23.6	22.6

^aMineral premix (g or mg kg⁻¹ diet): calcium carbonate (40% Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60%Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75%I), 0.4 mg; zinc sulphate (36%Zn), 0.4 g; copper sulphate (25%Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33%Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30%Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA) ; And Vitamin premix (IU or mg kg⁻¹ diet): DL- α tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1,000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA).

^bAttractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g.

The 6-month growth trial

The experiment was performed in the experimental PEIMA facilities. Before the first feeding, eggs from the three lines were randomly distributed into 27 different tanks (0.25m³, 9 tanks per isogenic line). At this stage, no differences in fry mean body weights were detected. Tanks water volume was gradually increased from 0.08 to 0.20m³, and was at constant water temperature of 11.4°C. From fish first feeding (47 days post fertilization (dpf)), fish were fed *ad libitum* with either the M diet (N= 6 tanks/line) or the V diet (N=3 tanks/line). Five weeks after the first feeding (75 dpf), half of the fish previously fed the M diet *ad libitum* were restricted (MR dietary treatment) in order to obtain fish with a similar feed intake as fish fed the V diet (N=3 tanks/line). Feed was distributed with automatic feeders over 8h of the lighting period.

To monitor growth, two or three random samplings of 50 fish in each tank were performed at different dates (88, 102, 116, 137, 151 and 189 dpf). Between 137 and 189 dpf (52-day trial), uneaten pellets were collected daily after each distribution and weighted. Estimation of uneaten and consumed quantities allowed for the estimation of the daily feed intake (DFI) and feed efficiency (FE):

$$DFI = \frac{NI}{(BW_f^{0.8} \times BW_i^{0.8})^{0.5} \times 44} \quad (1)$$

$$FE = \frac{BW_f - BW_i}{NI} \quad (2)$$

with BW_i and BW_f , the mean body weight (in g wet weight) at the beginning (137 dpf) and at the end (189 dpf) of the period, and NI the net feed intake (in g dry matter (DM)).

Mortality was recorded daily for each tank during the experiment, and the survival rate was estimated along the experiment.

Sampling

At 194 dpf, the end of the experiment, different tissues were collected 8h post-prandial. First, 162 fish (n=18 fish/condition) were randomly sampled, anesthetized, weighted, then euthanised with benzocaine in excess. For 81 fish (n=9 fish/conditions), liver and plasma were sampled, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction and analysis of the plasma metabolites, respectively. For the other 81 fish, liver, spleen and blood were sampled. Liver and spleen were weighted and condition factors were determined as

$$HSI = \frac{LW}{BW} \times 100 \quad (3)$$

and

$$SSI = \frac{SW}{BW} \times 100 \quad (4)$$

with BW, the mean body weight (in g wet weight) and LW et SW, the weight of the liver and spleen (in g), respectively. Different immune parameters were immediately estimated on blood samples for each condition.

Apparent digestibility study

Groups of 15 juveniles weighing on average 120 g from the three different isogenic lines were randomly sampled and transferred to the experimental INRA facilities of Saint-Pée-sur-Nivelle (France) in order to analyse apparent coefficient of digestibility (ACD). Fish were maintained in 60L cylindro-conical tanks equipped with an automatic faeces collector (3 tanks per condition), at a constant temperature of 17°C between 392 and 454 dpf. Fish were hand-fed twice a day to visual satiation with either the V or the M diet *ad libitum*, enriched with 1% Cr2O3, as an inert marker. The faeces were automatically collected over 62 days and stored daily at -20°C for further biochemical analyses.

Diets, previously reduced to powder and faeces previously lyophilized were analyzed. Dry matter content (DM) was measured after drying samples (5g) at 105°C for 24 h. Protein content was estimated by the Kjeldahl method (Nx6.25, Kjeldahl Nitrogen Analyser 2000, Fison Instruments). Gross energy of the samples was measured after combustion in an adiabatic bomb calorimeter. Starch content was measured according to the method described by Thivend *et al.* [21]. Total lipid extraction was performed according to Folch *et al.* [22], to assess final lipid content.

The apparent digestibility coefficients (ADC) were calculated as:

$$ADC_X = 100 - \left(100 * \frac{X_{faeces}}{X_{diet}} * \frac{Cr2O3_{diet}}{Cr2O3_{faeces}} \right) \quad (5)$$

where X corresponds to protein, lipid, starch or energy.

Analysis of plasma metabolites and immune parameters

Plasma metabolite levels were measured using commercial kits: glucose (Glucose RTU, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), triglycerides (PAP 150, bioMérieux) and cholesterol (CHOD-PAP, Sobioda).

Haematocrite (Ht) was determined by employing the microhaematocrit technique and centrifugation was at 12,000 g for 5 min. Whole blood was diluted at 1/200 in a Giemsa solution according to the method of Kekic and Ivanc [23]. White blood cell counts (WBC) were performed with a Thoma's cell haemocytometer. Plasma lysozyme activity was determined using a turbidimetric assay [24] and adapted to microtitration plates. To do so, a bacterial suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma; 1.25 g L⁻¹ in a 0.05 M sodium-phosphate buffer, pH 6.2) and 50 μ L of the individual samples were placed in 96 well microtitration plates and the optic density reading was taken at a wavelength of 450nm every 15s for 3min. Lysozyme concentrations for samples were converted to mg mL⁻¹ of plasma using the reference curve established with hen egg white lysozyme (Sigma). Determination of the alternative pathway of plasma complement activity was carried out by hemolytic assay with rabbit red blood cells (RRBC, Biomérieux) as described by Yano (1992) and adapted to microtitration plates. Plasma samples, diluted to 1/64 in EGTA-Mg-GVB buffer to prevent natural haemolytic activity, were added in increasing amounts, from 10 to 100 μ L well-1. The round-bottomed wells were then filled with EGTA-Mg-GVB buffer to final volume of 100 μ L, and 50 μ L of 2% RRBC (Biomérieux) suspension was finally added to all wells. Control values of 0% and 100% haemolysis were obtained using, respectively: 100 μ L EGTA-Mg-GVB buffer and 100 μ L haemolysis serum at 1/50 in water. Samples were incubated for 1 h at 20°C. The microplates were centrifuged (400 g, 5 min, 4°C). Then, 75 μ L of supernatant from each well was transferred with 75 μ L of phosphate buffer saline (PBS, Biomérieux) into a 96-well flat-bottom microplate. The absorbance (ACH50) was read in a Labsystems' iEMs analyser at 540nm and the number of ACH50 units per ml of plasma was determined by reference to 50% of haemolysis using the formula established by Yano (1992).

Molecular analyses: liver transcriptomic profiles and qPCR

RNA extraction

Total RNA was extracted from liver (n=6 per treatment), using the TRIzol[®] reagent method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The concentration of extracted RNA was analysed using a spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop) by measuring absorbance at 260nm. Quality of RNAs was checked with Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kista, Sweden).

Microarrays, cDNA labelling and hybridisation

Transcriptome profiles of liver of the three isogenic lines were analysed with microarray technology. Microarray analyses were performed on an Agilent-based microarray platform RBT specific with 8 X 60 K probes per slide.

For each sample, 150 ng of total RNA was first amplified by a reverse transcription, using a polyDT T7 primer (denaturation step: 10min at 65°C, reaction step:

2hr at 40°C, inactivation step: 5min at 70°C). The obtained cRNA were labelled with Cy3-dye (2hr at 40°C). Excess dye was removed using a RNeasy kit (Qiagen). The level of dye incorporation was evaluated using a spectrophotometer (Nanodrop ND1000, LabTech) (Yield > 0.825µg cRNA and specific activity > 6pmol of Cy3 per µg of cRNA). 600ng of Cy3-cRNA was then fragmented with a specific buffer (30 minutes at 60°C). Cy3-cRNA were then hybridised on a sub-array (17h at 65°C in a microarray hybridisation oven (Agilent). Slides were washed and scanned (Agilent DNA Microarray Scanner, Agilent Technologies, Massy, France) using the standard parameters for a gene expression 8x60K oligoarray (3µm and 20bits). Data were then obtained with the Agilent Feature Extraction software (10.7.1.1).

Strategy to detect potential molecular markers

The aim of the analysis was not to classically detect the effects of plant base diets but to detect potential molecular markers linked to plant-based diet utilisation *i.e.* genes differentially expressed among the three lines which could explain growth differences observed when fish were fed the V diet. In a first step, transcriptomic profile of isogenic lines were compared between each other when fed the V diet (R23h-V *versus* AB1h-V ; R23h-V *versus* A22h-V ; AB1h-V *versus* A22h-V). However, expression of these genes could vary among lines with no relation to their different abilities to use the V diet, as the three lines display different genotypes. To remove those genes related to genotype, genes which were differentially expressed among lines when fish were fed the M diet *ad libitum* (R23h-M *versus* AB1h-M ; R23h-M *versus* A22h-M ; AB1h-M *versus* A22h-M) were excluded from further analysis. For each line comparison, the list of genes obtained were considered as potential molecular markers. Among those genes, some were related to the capacity to grow with a plant-based diet and some were related to difference in feed intake among lines. To differentiate those two types of molecular markers, lines were compared when fed the restricted M diet (R23h-MR *versus* AB1h-MR ; R23h-MR *versus* A22h-MR ; AB1h-MR *versus* A22h-MR). Genes differentially expressed between lines only when fish were fed the V diet are considered as potential molecular markers linked to plant-based diet utilisation only ($V \cap (M \cup MR)^c$). Genes differentially expressed between line when fish were fed both the V and the restricted M diet are considered as potential molecular markers linked to differences in feed intake ($(V \cup MR) \cap M^c$).

In a second step, to characterise those potential markers, gene ontology (GO) enrichment analyses were performed using the functional annotation chart tool from the DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) bioinformatics resource, version 6.7 [25, 26]. Gene ontology (GO) enrichment analyses were carried out on the three lists of potential markers linked to the V diet, and three lists of markers linked to feed intake reduction (Cutoff : P-value<0.01; Benjamini<0.1). Swiss Prot identifiers were used as input against all Swiss protein identifiers of the array.

In a last step, to help enrich the biological interpretation, the within line diet effect was assessed for genes previously kept, by calculating the fold change between fish fed the V diet *vs* the control M diet *ad libitum* (R23h-V *versus* R23h-M ; AB1h-V

versus AB1h-M ; A22h-V *versus* A22h-M) (Cut-off P-value = 0.05).

qPCR

qPCRs were performed on genes found differentially expressed thanks to the microarray analysis, in order to validate those results. Those genes were involved in metabolism (carbohydrates, lipid, cholesterol, amino acid) and immunity.

One μg of total RNA, per condition, was reverse-transcribed to cDNA with SuperScript III RNase H reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using random dT Primers (N=6/condition). qPCRs were performed using the Roche Lightcycler 480 system (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France). Two μl of diluted cDNA were mixed with 3 μl of Light cycler 480 SYBR[®] Green I Master mix and diluted to obtain a final volume of 6 μl . Forward and reverse primers were used at a final concentration of 400 nM. Thermal cycling was initiated with the incubation at 95°C for 10 min. Forty five steps of PCR were performed, each one consisting of heating at 95°C for 15 sec for denaturing, and at 60°C for 10 sec for annealing and a third extension step at 72°C for 15 sec. Melting curves were systematically monitored (with a gradient of 0.5°C/10 sec from 55°C to 94°C). Primers sequences, along with their efficiencies (ranged between 1.8 and 2.2) are presented in the additional file 1.

Statistical analyses

All the statistical analyses were performed using the R-software (version 3.2.5) [27]. Mean body weight were log transformed to meet the normality and homogeneity of residuals. Two-way analyses of variance (ANOVA) were performed to assess effects of the genotype, the diet and the genotype \times diet interaction (cut-off P-value=0.05). Differences between conditions were assessed with Tukey's range tests (cut-off P-value=0.05).

Data from the microarray analysis were transformed with a logarithmic transformation, scale-normalised and quality of each sample was controlled using the ArrayQualityMetrics package [28] from R software (version 3.2.5) [27]. Data were analysed using the package Limma [29] and for each comparison Limma t-tests were performed, with a correction for multiple tests (P-value cut-off = 0.05 after a Benjamini-Hochberg correction).

Concerning qPCR data, assays were carried out according to the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) standards [30]. The relative expression levels were calculated by a mathematical method based on the real-time PCR efficiencies, using a geometric mean of two reference genes (18S and EF1) for the normalization [31]. Gene expression data were transformed with a logarithmic transformation. The normality and homogeneity of variance of residuals were tested with the Shapiro-Wilk's and Bartlett tests, respectively. Pearson's correlations were calculated to quantify relationships between microarray and qPCR data.

Ethic statement

Experimentation was conducted in the INRA experimental facilities (Peima facilities, Sizun, France and UMR Numéa, St-Pée-sur-Nivelle, France) authorized for animal experimentation by the French veterinary service which is the competent authority (B 29-277-02 and A 64-495-1). The experiments were in strict accordance with EU legal frameworks related to the protection of animals used for scientific research (Directive 2010/63/EU) and according to the National Guidelines for Animal Care of the French Ministry of Research (decree n°2013-118, february 1st, 2013). The scientists in charge of the experimentation received training and personal authorization (n°B64 10 003 and A29 102).

In agreement with ethical committees "Comité d'Ethique Aquitaine Poissons Oiseaux" (C2EA-73) and "Comité d'Ethique Finisterrien en Expérimentation Animale" (C2EA-74), the experiment reported here does not need approval by a specific ethical committee since it implies only classical rearing practices with all diets used in the experiment formulated to cover the nutritional requirements of rainbow trout ([8]). During the experiment, fish were daily monitored. If any clinical symptoms (i.e. morphological abnormality, restlessness or uncoordinated movements) were observed, fish were sedated by immersion in 2% benzocaine solution and then euthanised by immersion in a 6% benzocaine solution (anesthetic overdose) during 3 minutes.

Results

Fish performances

Growth and survival

Fish body weights and survival rates at the end of the 6-month trial, along with results of the statistical analyses, are presented in Table 2. On average, fish fed the V diet were smaller than fish fed the M diet *ad libitum* (-26.5%). The A22h fish were on average smaller than fish from the other two lines (-6.5%). While there were no significant differences in the final mean body weights of fish fed the M diet *ad libitum* (17.8 ± 0.2 g), the final mean body weights of fish fed the V or the restricted M diet differed significantly. When fed the V diet, AB1h and R23h fish were larger than A22h fish (+7.3%, P-value<0.001). When fed the restricted M diet, AB1h fish were larger than A22h fish (+7.3%, P-value<0.001).

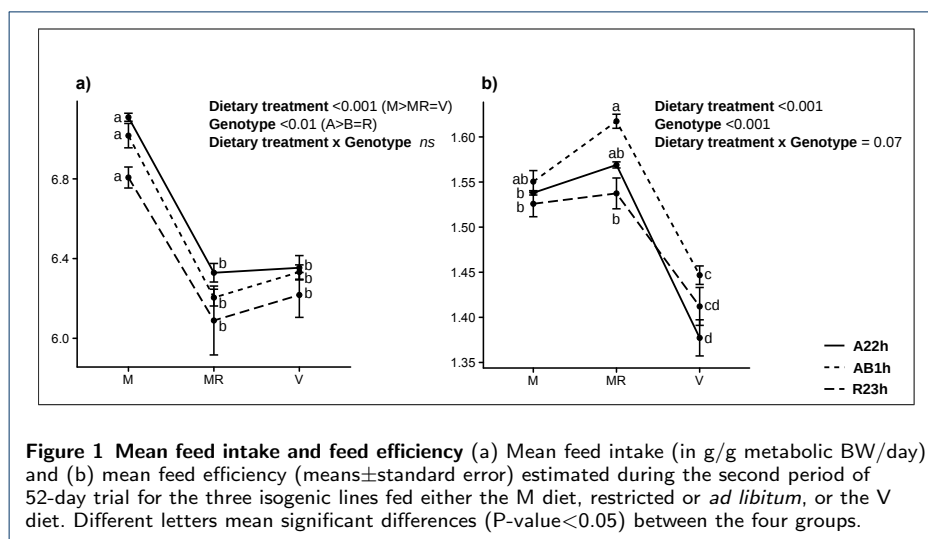
Fish fed the V diet had a lower survival rate than fish fed the restricted M diet (-31.4%, P-value<0.001), and than fish fed the M diet *ad libitum* (-38.5%, P-value<0.001).

Feed intake and feed efficiency

Feed intake and feed efficiency, estimated during the last 52 days of the 6-month trial, along with results of the statistical analyses, are presented in Figure 1. Fish fed the V diet had a lower feed intake than fish fed the M diet *ad libitum* (-9.7%, P-value<0.001), and were less efficient than fish fed the M diet, restricted or *ad libitum* (-9.4%, P-value<0.001). When fed the V diet, while no differences in dietary feed intake were observed among the different lines (P-values>0.05), AB1h fish had a higher feed efficiency than A22h fish (+5.0%, P-value<0.01).

Table 2 Final body weight (g) and survival rate (g) (means±SEM) of the three isogenic lines fed either the diet M *ad libitum*, the restricted M diet or the V diet. Two-way analysis of variance, followed by a Tukey post hoc test were carried out in order to assess effects of the dietary treatment and the genotype. Different letters mean significance between groups (Cut-off P-value<0.05)

Dietary treatment	Genotype	Body weight	Survival
M	R23h	18.3±0.2 ^a	89.3±3.0
	AB1h	17.1±0.3 ^a	93.0±1.7
	A22h	17.9±0.0 ^a	93.6±1.2
MR	R23h	12.9±0.3 ^{cd}	79.4±6.3
	AB1h	13.2±0.1 ^{bc}	83.3±6.2
	A22h	12.3±0.0 ^{de}	85.9±7.9
V	R23h	13.6±0.4 ^{bc}	60.8±7.5
	AB1h	14.0±0.1 ^b	62.0±2.7
	A22h	11.5±0.0 ^e	46.8±3.8
Statistical analysis			
Dietary treatment		<0.001	<0.001 (M>MR>V)
Genotype		<0.001	ns
Dietary treatment × Genotype		<0.001	ns



Digestibility

The results of ADC along with results of the statistical analysis are presented in Table 3. While, fish fed the V diet had higher protein ADC than fish the M diet (+6.5%, P-value<0.001), the opposite were found for lipid and starch ADC. R23h fish had, on average, lower protein ADC than AB1h and A22h fish (-0.8%, P-value<0.05). Concerning lipid, AB1h fish and A22h fish had higher lipid ADC than R23h fish when fed the M diet only (+1.5%, P-values<0.01), and no differences were detected when fish were fed the V diet (P-value>0.05). Concerning starch, AB1h and A22h fish have higher starch ADC than R23h fish when fed the M diet (-0.6%, P-values<0.001), and also when fed the V diet (-3.9%, P-values<0.001).

Plasma metabolites

Results concerning plasma metabolites (8h postprandial) along with results of the statistical analysis are presented in Table 4. Fish fed the V diet had, on average, a lower glycemia and a lower cholesterol level than fish fed the restricted M diet

Table 3 Coefficients of digestibility (means±SEM) of the three isogenic lines fed either the diet M *ad libitum*, the restricted M diet or the V diet. Two-way analysis of variance, followed by a Tukey post hoc test were carried out in order to assess effects of the dietary treatment and the genotype. Different letters mean significance between groups (Cut-off p-value<0.05).

Dietary treatment	Genotype	Protein	Lipid	Starch	Energy
M	R23h	90.5±0.2	96.4±0.3 ^b	98.9±0.0 ^b	90.2±0.5 ^b
	AB1h	91.4±0.2	97.9±0.1 ^a	99.5±0.0 ^a	92.1±0.1 ^b
	A22h	91.6±0.1	97.4±0.0 ^a	99.4±0.0 ^a	91.9±0.1 ^b
V	R23h	96.8±0.3	95.6±0.2 ^b	92.8±0.4 ^d	89.1±0.3 ^b
	AB1h	97.1±0.0	96.0±0.0 ^b	95.7±0.3 ^c	89.2±0.1 ^b
	A22h	97.2±0.0	95.8±0.0 ^b	96.6±0.0 ^c	89.8±0.4 ^b
Statistical analysis					
Dietary treatment		<0.001 (V>M)	<0.001	<0.001	<0.001
Genotype		<0.05 (AB1h=A22h>R23h)	<0.001	<0.001	<0.01
Dietary treatment×Genotype		ns	<0.001	<0.01	<0.05

despite a comparable feed intake (-54.6%, P-value<0.001 and -45.0%, P-values<0.001, respectively), and than fish fed the M diet *ad libitum* (-60.0%, P-value<0.001 and -44.7%, P-values<0.001, respectively). On average, AB1h fish had a higher plasma triglyceride levels than R23h and A22h fish (+33.6%, P-value<0.001), and a higher cholesterol level than A22h (+28.8%, P-value<0.01).

Concerning glycemia, while no differences were detected among lines fed the V and the restricted M diets, AB1h fish had a higher glycemia than R23h and A22h fish when fish were fed the M diet *ad libitum* (+38.8%, P-value<0.05 and +41.2%, P-value<0.01, respectively). Concerning the cholesterol level, while no differences were detected among lines when fish were fed the V diet, AB1h fish had a higher glycemia than A22h fish when fish were fed the M diet *ad libitum* (+18.5%, P-value<0.01).

Table 4 Plasma metabolites (means±SEM) of the three isogenic lines fed either the diet M *ad libitum*, the restricted M diet or the V diet. Two-way analysis of variance, followed by a Tukey post hoc test were carried out in order to assess effects of the dietary treatment and the genotype. Different letters mean significance between groups (Cut-off p-value<0.05).

Dietary treatment	Genotype	Glycemia	Triglycerides	Cholesterol
M	R23h	1.9±0.1 ^b	3.1±0.3	3.4±0.1 ^{abc}
	AB1h	2.6±0.1 ^a	4.1±0.3	4.0±0.1 ^a
	A22h	1.8±0.1 ^b	3.4±0.2	3.3±0.1 ^{bc}
MR	R23h	1.9±0.1 ^{ab}	3.8±0.2	3.8±0.1 ^{ab}
	AB1h	2.0±1.2 ^{ab}	4.3±0.2	4.0±0.2 ^a
	A22h	1.6±0.2 ^{bc}	3.2±0.4	3.1±0.1 ^c
V	R23h	0.8±0.0 ^d	3.1±0.2	2.0±0.1 ^d
	AB1h	0.8±0.0 ^d	4.6±0.3	2.2±0.1 ^d
	A22h	0.9±0.1 ^{cd}	2.9±0.4	1.8±0.1 ^d
Statistical analysis				
Dietary treatment		<0.001	ns	<0.001
Genotype		<0.05	<0.001 (AB1h>R23h=A22h)	<0.001
Dietary treatment×Genotype		<0.05	ns	<0.01

Immune parameters

After the 6-months-trial, immune parameters, along with results of the statistical analysis are presented in Table 5. Fish fed the V diet had a lower HSI (-51.0%, P-values<0.001) and a higher SSI than fish fed the M diet, restricted or *ad libitum* (+36.7%, P-value<0.001, and +80.7%, P-value<0.001, respectively). On average, AB1h fish had a higher HSI than R23h and A22h fish (+64.5%, P-value<0.001

and +24.9% P-value < 0.05, respectively), and the R23h fish had a higher SSI than those of the other two lines (+28.8%, P-values < 0.05). And while no differences on HSI were detected among lines when fish were fed the V diet, the indices of AB1h fish fed the M diet, restricted or *ad libitum*, were higher than those of A22h fish (M: +39.2%, P-value < 0.001), and R23h fish (M: +97.5%, P-value < 0.001 and MR: +59.7%, P-value < 0.001).

Finally, fish fed the V diet had a higher hematocrite than fish fed the M diet *ad libitum* (+6.8%, P-value < 0.05) and a higher complement activity (+15.0%, P-value < 0.05), but a lower lysozyme activities (-37.2%, P-value < 0.05). However, there was no line effect for hematocrite, complement and lysozyme activities.

Table 5 Immune parameters (means \pm SEM) of the three isogenic lines fed either the diet M (control diet), the MR diet or the V diet. Two-way analysis of variance, followed by a Tukey post hoc test were carried out in order to assess effects of the dietary treatment and the genotype. Different letters mean significance between groups (Cut-off p-value \leq 0.05).

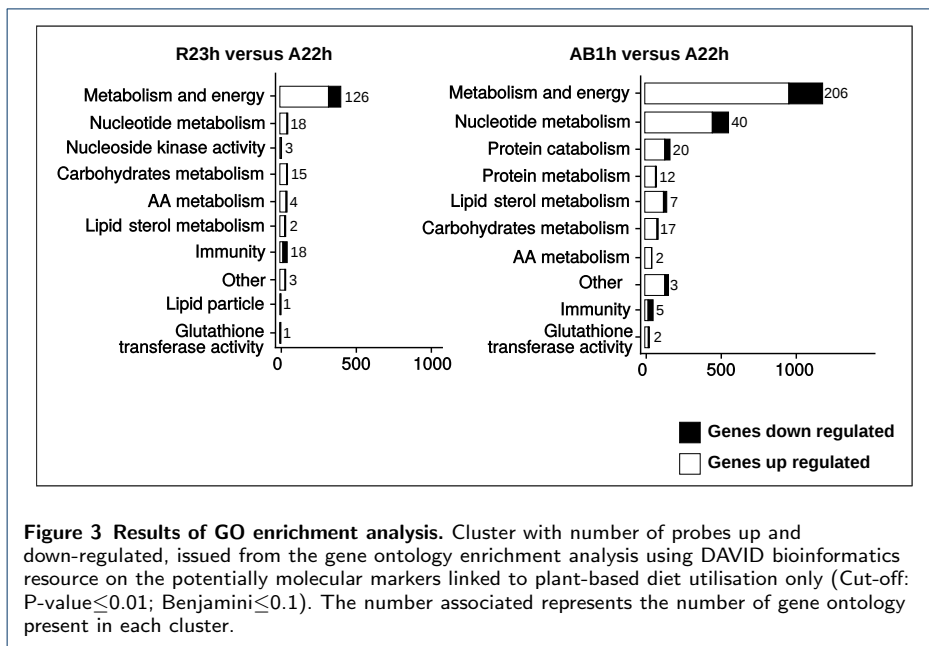
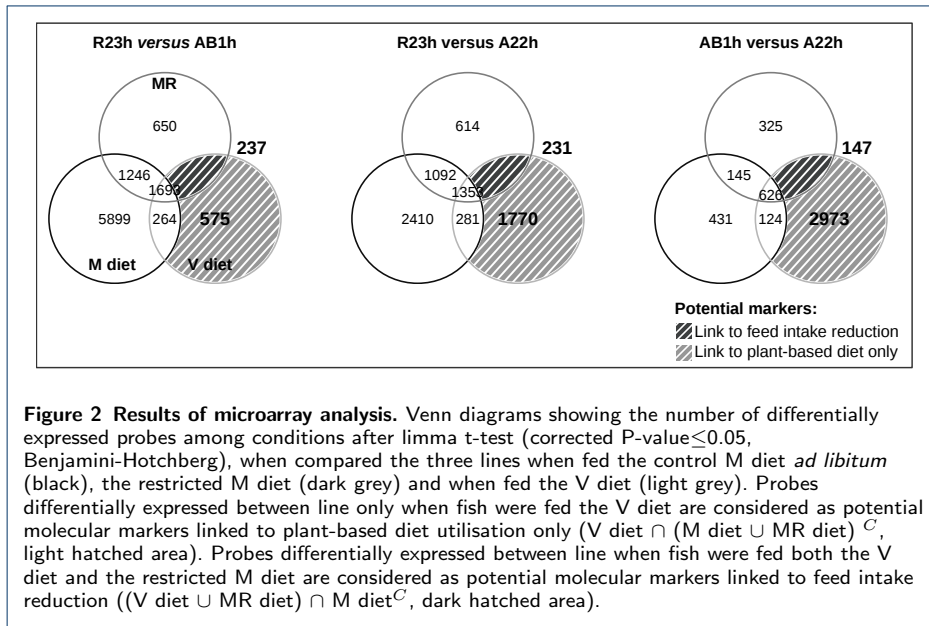
Dietary treatment	Genotype	HSI (%)	SSI (%)	Hematocrites	Complement	Lysozyme
M	R23h	2.3 \pm 0.2 ^{cd}	0.11 \pm 0.01	38.4 \pm 1.5	10.4 \pm 0.6	14.9 \pm 4.0
	AB1h	4.6 \pm 0.4 ^a	0.07 \pm 0.00	40.3 \pm 1.1	10.6 \pm 0.8	18.6 \pm 3.3
	A22h	3.3 \pm 0.1 ^b	0.07 \pm 0.01	43.0 \pm 1.7	9.2 \pm 0.4	17.3 \pm 3.5
MR	R23h	2.4 \pm 0.1 ^{cd}	0.08 \pm 0.01	38.9 \pm 1.4	10.8 \pm 0.4	12.2 \pm 2.6
	AB1h	3.8 \pm 0.2 ^b	0.05 \pm 0.01	42.8 \pm 1.4	10.6 \pm 0.6	16.0 \pm 2.8
	A22h	3.0 \pm 0.2 ^{bc}	0.06 \pm 0.01	41.2 \pm 0.3	9.1 \pm 0.6	10.5 \pm 1.5
V	R23h	1.4 \pm 0.1 ^e	0.12 \pm 0.01	43.7 \pm 0.9	12.0 \pm 0.9	9.1 \pm 0.9
	AB1h	1.6 \pm 0.0 ^{de}	0.12 \pm 0.01	42.3 \pm 1.1	10.9 \pm 0.8	10.3 \pm 2.4
	A22h	1.7 \pm 0.1 ^{de}	0.11 \pm 0.01	44.0 \pm 1.2	12.3 \pm 0.7	12.6 \pm 1.9
Statistical analysis						
Dietary treatment		<0.001	<0.001 (V > M > MR)	<0.05	<0.001 (V > M = MR)	<0.01 (M \leq MR \leq V)
Genotype		<0.001	<0.001 (R23h > AB1h = A22h)	ns	ns	ns
Dietary treatment \times Genotype		<0.001	ns	ns	ns	ns

Transcriptome profiles of the three isogenic lines

Number of probes differentially expressed between the three isogenic lines for each dietary conditions (M, V and MR) and the numbers of potential molecular markers linked to the V diet ($\mathbf{V\ diet} \cap (\mathbf{M\ diet} \cup \mathbf{MR\ diet})^C$) and the feed intake reduction ($(\mathbf{V\ diet} \cup \mathbf{MR\ diet}) \cap \mathbf{M\ diet}^C$) are summarised in Figure 2. For R23h vs AB1h, R23h vs A22h and AB1h vs A22h, 575, 1770 and 2937 probes were identified as potential molecular markers linked to the V diet utilisation, respectively. In comparison, few probes were identified as potential molecular markers linked to the feed intake reduction as only 231, 237 and 145 probes were identified for R23h vs AB1h, R23h vs A22h and AB1h vs A22h, respectively.

Concerning those linked to the feed intake reduction, no gene ontology was identified to be enriched in any of the three lists. Concerning potential markers linked to the V diet, different GO were obtained for the R23h vs A22h and the AB1h vs A22h comparison, while no gene ontology was identified for R23h vs AB1h. Those GO were manually classified in different clusters of interest (Figure 3 and Additional file 2 for details).

Among those GO obtained, an important cluster contained genes linked to energy production. Genes coding for enzymes involved in the TCA cycle and respiratory



chain were mainly more expressed in AB1h and R23h fish in comparison with the A22h fish when fish were fed the V diet (Additional file 3). While the V diet decreased the expression of the majority of these genes in A22h fish (62/76 genes down-regulated in A22h), the expression of these genes was little affected by the V diet in AB1h and R23h fish (54/76 and 60/76 genes unaffected for AB1h and R23h, respectively).

Similarly, 75.8% of the genes involved in lipid metabolism were more expressed in R23h and AB1h fish in comparison with A22h fish when fish were fed the V diet (Additional file 3). The V diet had notably stimulated the expression of genes

involved in cholesterol metabolism, LC-PUFA biosynthesis, lipogenesis, triglyceride synthesis (except for DGAT2) and prostaglandin synthesis in the R23h and AB1h fish. In contrary, their expression was either diminished or unchanged by the V diet in A22h fish. Concerning the genes involved in the β -oxidation, except for the genes involved in the FA transport to mitochondria (CPT), whose expression was stimulated by the V diet in A22h fish but unmodified in R23h and AB1h, the expression of those genes were down-regulated in A22h fish by the V diet. With regard to the peroxisomal β -oxidation, genes were up-regulated in AB1h fish by the V diet, while their expression remained unchanged in A22h fish. The gene coding for the transcription factor SREBP2 was also found in the results, and V diet had stimulated its expression in the R23h and AB1h fish, but had no effect on the A22h fish.

The majority of genes linked to protein catabolism, and in particular genes coding for proteasomes, were more expressed in AB1h than in A22h fish when fish were fed the V diet (24/26 genes). In R23h and AB1h fish, the V diet did not influence the expression of a majority of these genes (23/26 and 22/26 genes unaffected for R23h and AB1h, respectively), whereas expression of a majority of these genes was down-regulated in A22h fish (21/26 genes down-regulated). Similarly, the majority of genes linked to protein metabolism and genes coding for ribosomal proteins were more expressed in R23h and AB1h fish compared to A22h fish when fish were fed the V (Protein metabolism: 48/60; Ribosomal proteins: 55/59 genes). The V diet did not influence their expression in R23h and AB1h fish, whereas those genes were down-regulated by the V diet in the A22h fish.

The genes linked to carbohydrate metabolism (Additional file 3) were involved in different pathways, including glycolysis (Hexokinase, 6-phosphofructokinase), gluconeogenesis (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Glucose-6-phosphatase), and the pentose phosphates pathway. For each line, the V diet had influenced their expression in opposite directions.

The genes linked to amino acid metabolism participated in the catabolic pathways of tryptophan, leucine, lysine, phenylalanine, but also in the metabolism of sulphur amino acids, glycine and serine, arginine and glutamate metabolism (Additional file 3). As with the other genes related to metabolism, the majority was more expressed in the R23h and AB1h fish compared to the A22h fish when fish were fed the V, except for the genes linked to tryptophan degradation, L-serine dehydratase/L-threonine deaminase, and the Cysteine dioxygenase type 1.

Finally, a number of genes code for different components of immunity, including complement pathways, inflammatory response, cytokine activity, T-cell activation and apoptosis, were found in the analysis (Additional file 3). An important number of these genes were more expressed in the A22h fish in comparison to AB1h or R23h when fish were fed the V diet (27/46 genes). For those genes, the V diet had stimulated the expression of the majority of these genes in the A22h fish.

Coefficient of correlations obtained between microarray and qPCR data are presented in Table 6. Coefficients of correlations were greater than 0.60 for 18/21 genes tested, showing a high correlation between results from qPCR and from microarray. The lower coefficients of correlations could be explained by the whole genome duplication that occurred in salmonids [32]. Validation of transcriptomic data by qPCR

studies is often challenging due to the presence of duplicated and highly similar genes whose transcripts might be differentially regulated [11, 33]. As only 3 genes had lower coefficients of correlation, ranging from 0.46 to 0.60, results obtained by microarray are thus validated by qPCR.

Table 6 Correlation between gene expression patterns obtained through real-time PCR and microarray approaches. Coefficient correlation were obtained either with a Pearson test.

Gene	Probes	Correlation	P-Value
Lipid metabolism			
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2 CUST_4249.PI425536763	0.70	5.54E-09
FAS	Fatty acid synthase CUST_6285.PI425536763	0.91	<2.2E-16
ELOVL 2	Elongation of long chain fatty acids protein 2 CUST_14393.PI425536763	0.60	4.37E-06
ELOVL6	Elongation of long chain fatty acids protein 6 CUST_15885.PI425536763	0.90	<2.2E-16
DELTA 6	Delta 6 Desaturase CUST_4077.PI425536763	0.46	1.52E-03
HOAD	3-hydroxyacylA dehydrogenase TC121766	0.59	5.07E-06
Cholesterol			
HMGCS	3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA synthase CUST_20666.PI425536763	0.61	1.50E-06
FDPS	Farnesyl PP synthase TC120070	0.85	9.36E-16
LSS	Lanosterol synthase CUST_28240.PI425536763	0.78	1.38E-11
MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase CUST_5335.PI425536763	0.74	4.41E-10
EBP	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase TC95915	0.73	1.06E-09
CYP51A1	Lanosterol 14-alpha demethylase TC121294	0.76	4.07E-11
TM7SF2	Delta(14)-sterol reductase CUST_16667.PI425536763	0.81	4.48E-13
Amino acid			
CSAD	Cysteine sulfinic acid decarboxylase CUST_19922.PI425536763	0.94	<2.2E-16
FAH	Fumarylacetoacetase TC97137	0.53	5.08E-05
SARDH	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial TC108740	0.71	4.63E-09
Carbohydrates metabolism			
G6pcb2.a	Glucose-6-phosphatase (1) b2.a TC95453	0.89	<2.2E-16
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 CUST_2832.PI425536763	0.83	<2.2E-16
Immunity			
C3-3	Complement C3-3 TC119516	0.84	1.37E-14
CFB-2	Complement factor B-2 TC116037	0.71	3.67E-09
LCII	Lysosyme CII TC127723	0.93	<2.2E-16

Discussion

The present study aims to identify genes explaining the genetic variability in the capacity of different RBT genotypes to grow with a 100% plant-based diet. To this day, only two studies have investigated this question, one in rainbow trout [18] and the other in sea bass [15]. From these two studies, only a few genes have been identified as possible causes for the divergent capacity of trout to grow with such diets. To deepen the knowledge, transcriptomic profiles of fish issued from three different isogenic lines which have highly different growth when fed a plant-based diet, were compared.

The originality of our work relies on the use of isogenic lines of RBT, as fish share the same genotype within lines, probably reducing variability in gene expressions within each isogenic line. Those specific features enhance, indeed, the capacity to detect differences between lines, as we were able to detect an important number of pathways whose genes were differentially expressed among lines, confirming thus the benefit to use this specific biological material.

Moreover, substitution of FM by plant ingredients in salmonids is known to affect fish feed intake [3, 4, 5]. As a diminution of feed intake also affects hepatic transcriptome [34], we applied a specific experimental design in order to disassociate possible differences in feed intake from differences in the capacity of fish to grow with a plant-based diet (Figure 2).

Molecular markers linked to the reduction of the feed intake

Differences in feed intake amongst lines when fish were fed a plant-based diet could be one hypothesis explaining growth differences when they are fed a 100% plant-based diet as the existence of a variability in feed intake has already been demonstrated in RBT population when fish were fed a diet devoid of FM [5]. However, no differences in feed intake were detected among the lines during the 52-day trial, when fish were fed the V diet. Results of the transcriptomic analyses were in agreement with this result, as few potential molecular markers linked to feed intake reduction were found in the present experiment, and no gene ontology was significantly enriched among the three gene lists.

Overall, these results show that acceptance of plant-based diets is not a key factor explaining differences among genotypes, which is in disagreement with previous studies [19]. These differences could stem from the different stage studied. Differences in feed intake may exist at an earlier-stage, and might have impacted growth at long term.

Molecular markers linked to plant-based diet

An important number of potential molecular markers linked to fish capacity to grow with the V diet was found by comparing transcriptomic profiles of the two lines with the higher growth (AB1h and R23h) with the A22h fish. These changes were related to the ability of fish to digest and to efficiently use the diet but were not resulting from the reduction of the feed intake.

As expected, our zootechnical results show that the V diet has affected fish capacity to digest lipid and starch but R23h fish seemed to have been disturbed by the V diet in a higher extent than other fish. Similarly, feed efficiency was highly reduced when fish were fed the V diet, but the A22h fish were significantly more affected than AB1h ones.

These differences among genotypes in their capacity to digest nutrients and use them to grow were in accordance with the high number of molecular markers found. R23h fish seem to have established a different strategy to grow with plant-based diets than the one used by AB1h fish, as they displayed an intermediate feed efficiency and an intermediate growth despite their lower ability to digest nutrients. Furthermore, although A22h fish did not differ from AB1h fish on digestion capacity, A22h fish were not able to use efficiently the plant-based diet. We confirm thus the benefit to use three different genotypes to explore the different strategies existing in RBT population to grow with plant-based diets.

AB1h and R23h : higher growth correlated to a higher protein turnover

Expression of an important number of genes related to metabolism and energy production (mitochondrial β - *oxydation*, proteolysis, amino acid metabolism, the TCA cycle, the respiratory chain and the protein metabolism, including ribosomal protein) was almost not affected by the V diet in the R23h and AB1h lines, the two lines with the higher growth. The A22h fish were, in contrary, highly affected by the V diet, and their molecular responses (down-regulation of gene expression) were partly in accordance with the typical ones when fish are fed plant-based diets. Substitution of FO and FM by plant products is indeed known to negatively affect

expression of genes involved in energy production [9] and in protein synthesis such as ribosomal protein [9]. The over-expression of these genes in R23h and AB1h in comparison to A22h fish when fed the V diet suggests a higher production of energy from ATP hydrolysis, probably used for protein synthesis, and thus, a higher protein turnover in these two lines. These results could be directly related to the higher growth in both lines, AB1h and R23h, and are in accordance with the results obtained in two families of sea bass with different growth rates, which was also correlated with a higher protein turnover [15].

Interestingly, genes involved in proteasome activity were also down-regulated by the V diet in A22h fish while previous studies have shown that both transcription and activity of proteasome were increased when fish were fed a diet devoid of FO [9, 10], a diet devoid of FM [35], or a diet devoid of both [14, 15]. Yet, proteasome activity is negatively correlated with growth [36], and those previous results have demonstrated the negative effect of plant-based diets in fish growth.

The overall consistency of genes expression related to protein synthesis and energy production in the two lines with a better growth could be either interpreted as the capacity of these fish to withstand the plant-based diet or as the reflect of their better growth with such diet. The experimental design did not allow us to determine if this result is a cause or a consequence of the fish better growth.

Alongside those genes unaffected by the V diet in R23h and AB1h, a few were, indeed, up or down-regulated in AB1h and R23h fish. Some of them play important roles in lipid, cholesterol and carbohydrate metabolism, and could explain, in part, their better growth, as detailed in the later sections.

AB1h and R23h : up-regulation of pathways involved in lipid metabolism

The transcriptomic results confirmed the existence of a genetic variability in the expression of genes related to lipid and cholesterol metabolism when fish were fed the V diet. Previous results have already highlighted the existence of a such variability in the capacity to synthesize and retain LC-PUFA in salmon [37] and in RBT [38, 39]. We demonstrated here that genetic variability in the expression of some of these genes could explain why some genotypes have better growth when fish were fed a plant-based diet.

Surprisingly, while genes related to LC-PUFA biosynthesis (elongase and desaturase) were up-regulated by the V diet in the two lines with the highest growth, their expression remained stable in A22h. These results obtained in A22h are in disagreement with results typically obtained when FO and FM are replaced. When FO and/or FM are replaced by terrestrial plant-products, the change in the diet FA profile should indeed lead to the over-expression of the desaturase $\Delta 5$ and 6 and elongase, to counteract the lack of EPA and DHA in those diets [10, 11, 9, 40, 12]. Those two FA play essential roles in the cellular membrane structure and fluidity and as precursors of eicosanoids, either pro or anti-inflammatory molecules [41]. We demonstrated here, that some fish lack or have a reduced ability to activate these pathways, likely explaining their poor performance when fed plant-based diets. Further analysis of enzymes activities should be done to confirm the gene expression

data obtained.

Similarly, genes related to cholesterol metabolism were not up-regulated in the A22h fish, as it could have been expected as plant-based diets are lacking cholesterol and contain phytosterol [42]. Among those genes, SREBP2 was up-regulated by the V diet in fish with the higher growth (R23h and AB1h), but its expression remained unchanged in fish with lower growth (A22h). This transcription factor regulates expression of the genes implied in the cascade of cholesterol biosynthesis. Its up-regulation in AB1h and R23h, and its stability in A22h, thus explains the changes in the expression of the other genes.

However, even though AB1h fish had in average a higher cholesterolemia than fish from the two other lines irrespective of the diet, no significant differences among the three lines were detected when fish were fed the V diet.

Cholesterol plays important roles in cell, including as a precursor of bile acids. Supplementation of cholesterol in salmon does not improve growth, but cholesterol biosynthesis decreases, while conversion into bile acids increases correspondingly [43]. Higher cholesterol synthesis may therefore lead to a higher bile synthesis in the AB1h line, but the two genes coding for the Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase gene retrieved on the analysis revealed opposite results. It is therefore difficult to draw any conclusions on how activation of cholesterol synthesis may improve growth in AB1h.

Simultaneously, the over-expression of genes involved in the pentose phosphate pathway in AB1h and R23h in comparison to A22h when fed the V diet, could reveal a higher NADPH genesis in R23h and AB1h, which is required for different pathways such as cholesterol biosynthesis or lipogenesis. Genes involved in the latter pathway, such as FAS, were also more expressed in AB1h and R23h. This result is in accordance with previous results obtained in RBT and in salmon, in which expression of genes involved in both lipogenesis and pentose phosphate pathways were up-regulated when FM are replaced by mixtures of plant ingredients [12, 9, 35]. Consequently, over expression of those genes could explain the increase in fat deposition in perivisceral tissue of salmonids fed plant-based diets [9, 44].

Overall, the results demonstrated a higher capacity of the AB1h and R23h fish to stimulate the pentose phosphate pathway when fed the V diet, which has probably permit the activation of different lipid pathways, including lipogenesis. Although an increasing of perivisceral fat storage did not appear to affect growth [45], this trait is of particular concern for breeders as an augmentation of perivisceral fat could increase the non-edible parts of the final product and the overall yield inedible part.

Different capacity to handle carbohydrates?

Inclusion of plant-based diet led to the misregulation of an important number of genes related to carbohydrates metabolism. The outcome of the genetic variability in the expression of those genes on growth parameters is however difficult to explain because of their post-transcriptional regulation [14].

Feeding diets containing a high content of digestible carbohydrates usually lead to a persistent postprandial hyperglycemia, defining RBT as a glucose-intolerant species

[46, 47]. In the present study, because the M diet was formulated with 21% of whole wheat, this diet contained more starch than the V diet (14.1 *versus* 9.5%). Hence, as expected, glycemia (+8h postprandial) was higher when fish were fed the M diet *ad libitum*.

Interestingly, we demonstrated that a genetic variability exists in the expression of genes involved in gluconeogenesis (G6pcb2.a and PCK1), pathway whose misregulation have been found to influence fish glycemia [48]. Results obtained by qPCR for these two genes confirmed results obtained by microarray.

G6pcb2.a expression is known to increase with carbohydrates level at the opposite of what could be expected according to knowledge in mammals and has thus been identified as one factor responsible for the postprandial hyperglycemia [48]. In our analysis, G6pcb2.a was indeed over-expressed by the M diet for the 3 lines, but in a significantly lesser extent in R23h fish, probably due to a lower digestibility of starch in this latter line.

Concerning PCK1, this gene is usually down-regulated with high carbohydrates diet, as expected for a gluconeogenetic gene [48]. But, while this gene was down-regulated by the M diet in R23h, as expected, its expression remained stable in AB1h and A22h. Despite their lower ability to digest starch, R23h fish could be better able to repress the gluconeogenesis pathway via the down-regulation of PCK1 when diet contains higher level of carbohydrates. The lower glycemia of A22h fish in comparison to AB1h fish, when they were fed the M diet *ad libitum* was not explained. To confirm those results, which are of particular interest, responses of these three lines should be studied with diets containing zero or high content of carbohydrates to deepen knowledge on regulation of these genes depending on genotypes and their implications on the persistent hyperglycemia. Moreover, it will be essential to investigate this question beyond the molecular level and test enzymes activities.

Immunity

Finally, the transcriptomic analysis revealed a genetic variability in the expression of genes involved in different immunity pathways, linked to their capacity to grow with a diet devoid of FO and FM. This result confirmed previous studies in sea bass and RBT, which also found immunity genes related to abilities of different families to grow with a plant-based diet [18, 15].

Several factors are known to affect fish immunity when FO and/or FM are substituted by plant ingredients, which include unbalanced FA profile [49] and presence of ANF [7]. Unbalanced $\omega 3/\omega 6$ FA profile modulates different immune parameters such as the complement and the lysozyme activities [49], by altering FA composition of immune cell and/or eicosanoid production [50], key hormones in immune response derived from FA. Moreover, ANF, such as saponins, may impair intestinal integrity, which is therefore exposed to various antigens, leading to gut inflammation [7]. Both FM and FO substitution lead to a rapid alteration of expression of genes involved in immunity, even when diets are extruded to diminish the negative effects of ANFs [12].

Although no differences were detected among lines in immune parameters, analysis of gene expression may be more sensitive to detect differences amongst the fish.

We could hypothesize that immune components of fish with higher growth could be less affected by plant components, and this through two different ways.

First, as it has been demonstrated that AB1h and R23h fish seem to have a higher LC-PUFA biosynthesis capacity, it could be hypothesized that fish with the highest growth could be less affected by the change in the dietary FA profile. Moreover, prostaglandin E synthase 2 and 3, involved in the biosynthesis of both pro and anti-inflammatory eicosanoids, were differentially expressed among AB1h and A22h. While those two genes were down-regulated in A22h, in accordance with previous results obtained in sea bass fed a 100% plant-based diet [15], expression of those two genes remained unchanged by the V diet in AB1h.

Second, although the different experimental diets were extruded to diminish the negative effects of ANF, it can not be excluded that fish from the three lines could also have different capacity to cope with those factors. Indeed, genes of the complement system were up-regulated in A22h fish, in accordance with previous data obtained in salmon where those genes were significantly up-regulated in liver of fish developing enteritis [51]. In contrast, expression of those genes was not influenced by the V diet in the two lines with the highest growth.

Further investigations are needed to understand how the different nutrients interact with the different immune components and how it could impact growth.

Conclusion

The high number of genes found in the analysis and the differences in feed efficiency when fish were fed a 100% plant-based diet, confirmed the benefit to use these three isogenic lines to investigate the divergent capacity of RBT to grow with a 100% plant-based diet.

The higher growth of the two lines fed the V diet could be attributed to a higher capacity to maintain high energy production used for protein turnover and to a higher capacity to activate pathways involved in lipid metabolism. Some genotypes seem also to have a better capacity to cope with high content of digestible carbohydrates, but results were not clear as difference exists in the ability of the three studied lines to digest starch. Finally, we confirmed previous results obtained in RBT and sea bass [18, 15] which demonstrated that the capacity to grow with plant-based diet is correlated with the expression of genes related to immunity.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was carried out within the framework of the AGREENFISH project (project ANR-13-ADAP-001) funded by ANR, the French research agency.

Author's contributions

FM, MDN, EQ, IG and SSC conceived and designed the experiments. TK, LL, PA reared the 3 isogenic lines and collected zootechnical data. IG, CB formulated experimental diets. TC, MC, MD, PA and AS performed the experiments. TC analysed the data with discussion with FM, MDN, SSC, SP and MD. TC, FM, MDN prepared the final manuscript. All authors read and commented on the manuscript.

Acknowledgements

We thank F. Sandres and F. Terrier for manufacturing the experimental diets (INRA, Donzaq, France), A. Le Cam (INRA-LPGP, Rennes, France) for technical assistance.

Author details

¹UMR NuMÉA, INRA, Aquapôle, 64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France. ²UMR GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Domaine Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France. ³Ploufragan-Plouzané Laboratory, ANSES, 22440 Ploufragan, France. ⁴Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée (PEIMA), Barrage du Drennec, 29450 Sizun, France.

References

1. FAO: The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, ??? (2016)
2. Tacon, A.G., Metian, M.: Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **285**(1), 146–158 (2008)
3. Gomes, E.F., Rema, P., Kaushik, S.J.: Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* **130**(2), 177–186 (1995)
4. Espe, M., Lemme, A., Petri, A., El-Mowafi, A.: Can atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture* **255**(1), 255–262 (2006)
5. Dupont-Nivet, M., Médale, F., Leonard, J., Le Guillou, S., Tiquet, F., Quillet, E., Geurden, I.: Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture* **295**(1), 15–21 (2009)
6. Geurden, I., Cuvier, A., Gondouin, E., Olsen, R., Ruohonen, K., Kaushik, S., Boujard, T.: Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & behavior* **85**(2), 107–114 (2005)
7. Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M.: Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research* **41**(3), 333–344 (2010)
8. The National Research Council (NRC): Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, ??? (2011)
9. Panserat, S., Kolditz, C., Richard, N., Plagnes-Juan, E., Piumi, F., Esquerré, D., Médale, F., Corraze, G., Kaushik, S.: Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *British Journal of Nutrition* **100**(5), 953–967 (2008)
10. Leaver, M.J., Villeneuve, L.A., Obach, A., Jensen, L., Bron, J.E., Tocher, D.R., Taggart, J.B.: 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**(1), 299 (2008)
11. Morais, S., Pratoomyot, J., Taggart, J.B., Bron, J.E., Guy, D.R., Bell, J.G., Tocher, D.R.: Genotype-specific responses in atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC genomics* **12**(1), 255 (2011)
12. Tacchi, L., Secombes, C.J., Bickerdike, R., Adler, M.A., Venegas, C., Takle, H., Martin, S.A.: Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics* **13**(1), 363 (2012)
13. Xue, X., Hixson, S.M., Hori, T.S., Booman, M., Parrish, C.C., Anderson, D.M., Rise, M.L.: Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver transcriptome response to diets containing camelina sativa products. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **14**, 1–15 (2015)
14. Panserat, S., Hortopan, G., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerre, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., et al.: Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* **294**(1), 123–131 (2009)
15. Geay, F., Ferrarresso, S., Zambonino-Infante, J.L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C.L., Mazurais, D.: Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC genomics* **12**(1), 1 (2011)
16. Le Boucher, R., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Kerneis, T., Goardon, L., Labbe, L., Chatain, B., Bothaire, M.J., Larroquet, L., Médale, F., et al.: Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PLoS one* **7**(9), 44898 (2012)
17. Callet, T., Médale, F., Larroquet, L., Surget, A., Aguirre, P., Kerneis, T., Labbé, L., Quillet, E., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., Dupont-Nivet, M.: Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLOS ONE* **12**(10), 1–21 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0186705
18. Overturf, K., Vallejo, R.L., Palti, Y., Barrows, F.T., Parsons, J.E.: Microarray analysis of differential utilization of plant-based diets by rainbow trout. *Aquaculture international* **20**(2), 213–232 (2012)
19. Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M.N., Schrama, J.W., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Kaushik, S.J., Panserat, S., Médale, F.: The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS One* **8**(12), 83162 (2013)
20. Quillet, E., Dorson, M., Le Guillou, S., Benmansour, A., Boudinot, P.: Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & shellfish immunology* **22**(5), 510–519 (2007)
21. Thivend, P., Mercier, C., Guilbot, A.: Determination of starch with glucoamylase. *Methods in carbohydrate chemistry* **6**, 100–105 (1972)
22. Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G., et al.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**(1), 497–509 (1957)
23. Kekic, H., Ivanc, A.: A new direct method for counting fish blood cells. *Ichthyologia* **14**, 55–58 (1982)
24. Grinde, B., Lie, Ø., Poppe, T., Salte, R.: Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* **68**(4), 299–304 (1988)
25. Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A.: Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nature protocols* **4**(1), 44–57 (2009)

26. Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A.: Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* **37**(1), 1–13 (2009)
27. R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2015). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
28. Kauffmann, A., Gentleman, R., Huber, W.: arrayqualitymetrics—a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* **25**(3), 415–416 (2009)
29. Smyth, G.K.: Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R., Huber, W. (eds.) *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, pp. 397–420. Springer, New York (2005)
30. Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al.: The miq guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. *Clinical chemistry* **55**(4), 611–622 (2009)
31. Pfaffl, M.W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time rt–pcr. *Nucleic acids research* **29**(9), 45–45 (2001)
32. Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., Alberti, A., et al.: The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature communications* **5** (2014)
33. Lazzarotto, V., Corraze, G., Larroquet, L., Mazurais, D., Médale, F.: 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**(12), 2079–2092 (2016)
34. Salem, M., Silverstein, J., Rexroad, C.E., Yao, J.: Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *BMC genomics* **8**(1), 328 (2007)
35. Vilhelmsson, O.T., Martin, S.A., Médale, F., Kaushik, S.J., Houlihan, D.F.: Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* **92**(1), 71–80 (2004)
36. Dobby, A., Martin, S., Blaney, S., Houlihan, D.: Protein growth rate in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) is negatively correlated to liver 20s proteasome activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **137**(1), 75–85 (2004)
37. Overturf, K., Welker, T., Barrows, F., Towner, R., Schneider, R., LaPatra, S.: Variation in rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*, to biosynthesize eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid when reared on plant oil replacement feeds. *Journal of the World Aquaculture Society* **44**(3), 326–337 (2013)
38. Leaver, M.J., Taggart, J.B., Villeneuve, L., Bron, J.E., Guy, D.R., Bishop, S.C., Houston, R.D., Matika, O., Tocher, D.R.: Heritability and mechanisms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid deposition in the flesh of atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **6**(1), 62–69 (2011)
39. Morais, S., Taggart, J.B., Guy, D.R., Bell, J.G., Tocher, D.R.: Hepatic transcriptome analysis of inter-family variability in flesh n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content in atlantic salmon. *BMC genomics* **13**(1), 410 (2012)
40. Jordal, A.-E.O., Torstensen, B.E., Tsoi, S., Tocher, D.R., Lall, S.P., Douglas, S.E.: Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *The Journal of nutrition* **135**(10), 2355–2361 (2005)
41. Tocher, D.R.: Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science* **11**(2), 107–184 (2003)
42. Liland, N.S., Espe, M., Rosenlund, G., Waagbø, R., Hjelle, J.I., Lie, Ø., Fontanillas, R., Torstensen, B.E.: High levels of dietary phytosterols affect lipid metabolism and increase liver and plasma tag in atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *British Journal of Nutrition* **110**(11), 1958–1967 (2013)
43. Kortner, T.M., Björkhem, I., Krasnov, A., Timmerhaus, G., Krogdahl, Å.: Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *British Journal of Nutrition* **111**(12), 2089–2103 (2014)
44. Torstensen, B.E., Espe, M., Stubhaug, I., Lie, Ø.: Dietary plant proteins and vegetable oil blends increase adiposity and plasma lipids in atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *British Journal of Nutrition* **106**(5), 633–647 (2011)
45. Médale, F., Le Boucher, R., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Aubin, J., Panserat, S.: Plant based diets for farmed fish. *INRA Productions animales* **26**(4), 303–315 (2013)
46. Moon, T.W.: Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **129**(2), 243–249 (2001)
47. Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A.: Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish physiology and biochemistry* **35**(3), 519–539 (2009)
48. Marandel, L., Seilliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., Panserat, S.: New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail. *Physiological genomics* **47**(7), 253–263 (2015)
49. Montero, D., Izquierdo, M.: Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*, 439–486 (2010)
50. Petropoulos, I.K., Thompson, K.D., Morgan, A., Dick, J.R., Tocher, D.R., G Bell, J.: Effects of substitution of dietary fish oil with a blend of vegetable oils on liver and peripheral blood leucocyte fatty acid composition, plasma prostaglandin e2 and immune parameters in three strains of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition* **15**(6), 596–607 (2009)
51. De Santis, C., Bartie, K.L., Olsen, R.E., Taggart, J.B., Tocher, D.R.: Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **15**, 1–11 (2015)

Additional Files

Additional file 1 — Primers sequences

Sequence of primers used for gene expression analysis by real-time PCR.

Additional file 2 — Results of the three enrichment analyses (DAVID)

GO terms found significantly enriched (Cut-off: p-value \leq 0.01 ; Benjamini \leq 0.1).

Additional file 3 — List of genes identified as potential molecular markers

Genes differentially expressed between the 3 isogenic lines related to metabolism and immunity. The "genotype effect" refers to genes whose expression differed between lines when they were fed with the V diet. The "diet effect" refers to the effect of the V diet for each isogenic line ("up"=gene was up-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet; "down"=gene was down-regulated when fed the V diet in comparison to the control diet).

Publication : les principaux résultats à 6 mois

Au cours de cette expérimentation, plusieurs **caractères** ont été étudiés :

- Les trois lignées isogéniques ont eu de fortes différences de performance de croissance lorsqu'elles ont été nourries avec l'aliment V ou M restreint après 6 mois d'alimentation, et les poissons des lignées AB1h et R23h étaient en moyenne plus gros que ceux de la lignée A22h (+19,6%, P-value < 0,001). À l'inverse, aucune différence n'a été détectée lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M *ad libitum* ($17,8 \pm 0,2$ g). Au sein de chaque lignée, les poids des poissons nourris avec l'aliment M restreint n'étaient pas significativement différents de ceux nourris avec l'aliment 100% V.
- Les quantités d'aliment consommé n'étaient pas significativement différentes entre les trois lignées après 6 mois d'alimentation, lorsque celles-ci ont été nourries avec l'aliment 100% V.
- Des différences dans la capacité des poissons des trois lignées à utiliser l'aliment V ont cependant été révélées, puisque les poissons AB1h avaient une efficacité alimentaire significativement supérieure à celles des poissons A22h lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V (+5,0%, P-value < 0,01).
- Les poissons R23h avaient en moyenne de moins bonnes capacités à digérer l'amidon lorsque les poissons étaient nourris avec cet aliment.
- Aucune différence n'a été détectée entre les trois lignées nourries avec l'aliment V pour les paramètres plasmatiques et immunitaires.

La comparaison des transcriptomes hépatiques a permis de révéler un grand nombre de marqueurs potentiels liés à la capacité des poissons à grandir avec des aliments 100% V.

- Seulement 231, 237 et 145 sondes ont été identifiées comme des marqueurs potentiels liés à des différences de quantité d'aliment consommé, pour les comparaisons R23h *versus* AB1h, R23h *versus* A22h et AB1h *versus* A22h, respectivement. Aucune GO n'a été significativement enrichie dans aucune des trois listes de potentiels marqueurs.
- 575, 1770 et 2937 sondes ont été identifiées comme de potentiels marqueurs de la capacité à utiliser l'aliment V, pour les comparaisons R23h *versus* AB1h, R23h *versus* A22h et AB1h *versus* A22h, respectivement.
 - ▶ Les marqueurs potentiels qui différenciaient la lignée A22h des deux autres lignées sur leur capacité à grandir avec l'aliment V (liste des GO enrichies en annexe viii) étaient notamment associés à la **production d'énergie** (Cycle de Krebs, chaîne respiratoire), à de nombreuses voies du **métabolisme** : lipides et cholestérol, glucides, AA, et également à **l'immunité** (listes en annexe ix à xiv).

7.2 Résultats complémentaires : le transcriptome intestinal

La comparaison des transcriptomes intestinaux a permis, comme pour le foie, d'identifier un nombre important de potentiels marqueurs de la capacité à grandir avec l'aliment 100% V (Figure 7.1). De façon similaire à ce qui avait été obtenu dans le foie, peu de marqueurs étaient liés à des différences de quantité d'aliment consommé. En effet, seulement 398, 208 et 163 sondes ont été identifiées pour les comparaisons R23h *versus* AB1h, R23h *versus* A22h et AB1h *versus* A22h, respectivement, et aucun GO n'a été trouvé.

Pour ces mêmes comparaisons, 3526, 578 et 907 sondes ont été identifiées comme de potentiels marqueurs de la capacité à utiliser l'aliment V. Les analyses d'enrichissement ont permis d'identifier de nombreuses GO significativement enrichies dans ces trois listes (Figure 7.2 et annexe xv). Les potentiels marqueurs moléculaires qui différençaient les trois lignées pour leur capacité à utiliser l'aliment V appartenaient majoritairement à des GO de différents compartiments cellulaires (mitochondrie et ribosomes), mais également à différents processus biologiques dont la traduction des ARN en protéines, la maturation et le catabolisme des protéines.

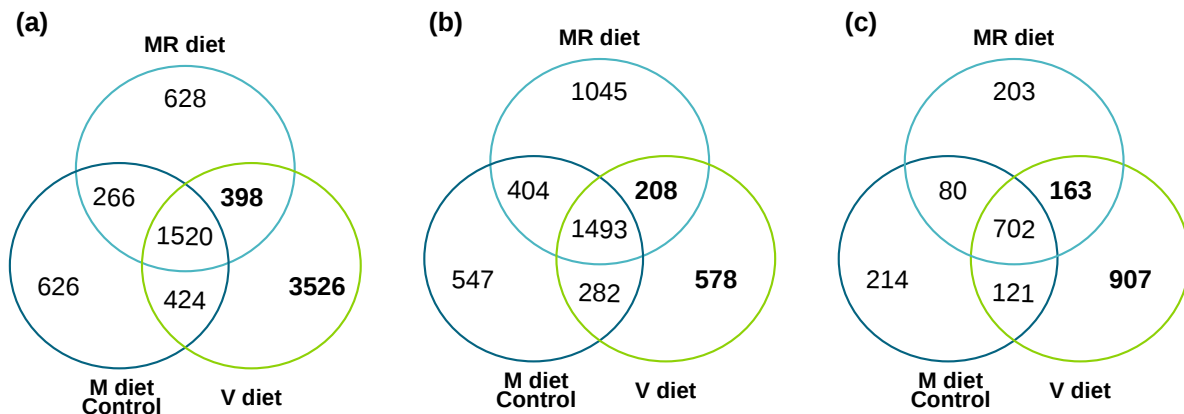


FIGURE 7.1 – Nombre de sondes différemment exprimées pour les comparaisons (a) R23h *versus* AB1h, (b) R23h *versus* A22h, et (c) AB1h *versus* A22h, pour les différentes conditions dans l'intestin distal (Cutoff P-value ajustée <0.05). En gras, les sondes identifiées comme de potentiels marqueurs liés à la capacité des poissons à survivre et grandir avec des aliments V.

7.3 Discussion

Nous avons pu confirmer, comme à court terme, que ces trois lignées isogéniques ont des capacités contrastées pour grandir lorsqu'elles sont nourries avec l'aliment V. En revanche, ces trois lignées ont des performances de croissance similaires lorsqu'elles sont nourries avec un aliment M, et elles représentent donc un excellent modèle biologique particulièrement pertinent pour répondre à notre question scientifique.

Les différences de performance de croissance entre les génotypes de TAC nourries avec des aliments 100% V peuvent provenir, à la fois, de différences de quantité d'aliment consommé et/ou de différences de capacité à utiliser cet aliment. Aucune différence de consommation d'aliment V n'a été détectée entre nos trois lignées et seulement peu de marqueurs potentiels liés à des différences de quantité d'aliment consommé ont été trouvés dans le foie et l'intestin.

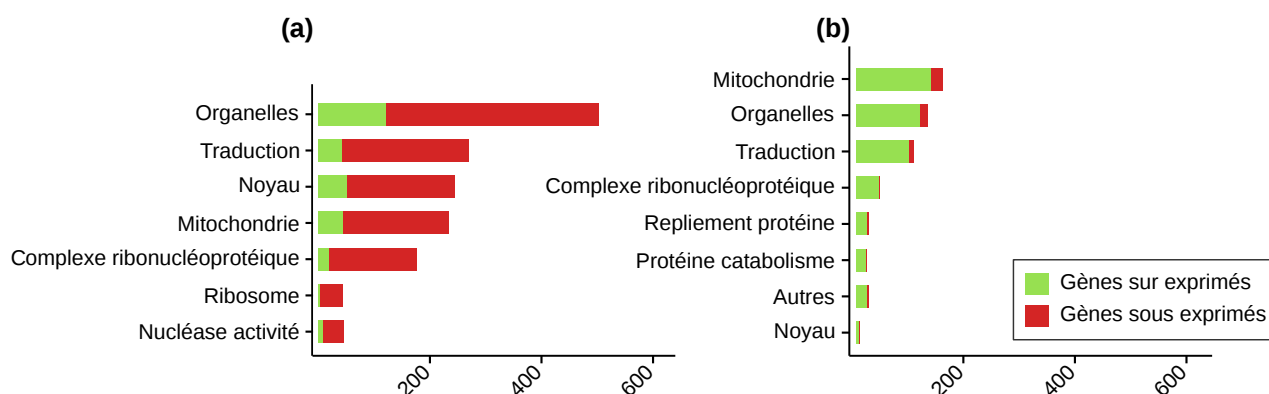


FIGURE 7.2 – Résultats de l'analyse d'enrichissement d'ontologies de gènes pour les sondes identifiées comme potentiels marqueurs de la capacité à utiliser l'aliment V grâce aux comparaisons (a) R23h versus AB1h et (b) AB1h versus A22h (Cutoff P-value<0.01 ; Benjamini<0.1). Chaque graphique représente le nombre de sondes différentiellement exprimées entre les lignées, pour chaque catégorie d'ontologies de gènes. Avec en vert, les sondes dont le fold-change était supérieur à 0 en comparant l'expression chez les lignées (*i.e.* gènes sur-exprimés) ; et en rouge, les sondes dont le fold-change était inférieur à 0 en comparant l'expression chez les lignées (*i.e.* gènes sous-exprimés).

En revanche, les poissons de la lignée AB1h et dans une moindre mesure R23h sont plus aptes à utiliser l'aliment V en comparaison des poissons de la lignée A22h. Grâce aux comparaisons des transcriptomes de ces trois lignées, de nombreux marqueurs de la capacité à utiliser les aliments V ont été identifiés dans le foie et l'intestin et expliquent les capacités contrastées des trois lignées isogéniques pour utiliser l'aliment 100% V après 6 mois d'alimentation. Ces différences pourraient être à l'origine des disparités de croissance observées entre les TAC nourries avec des aliments V.

7.3.1 Des différences globales

De manière générale, les transcriptomes hépatiques et intestinaux des poissons, quel que soit leur fond génétique, ont été fortement modifiés par l'aliment V, mais les trois lignées ont été affectées à des degrés plus ou moins importants.

Transcriptome intestinal

Alors que l'expression de 41,3% des gènes a été modifiée par l'aliment V chez les poissons R23h, l'expression de seulement 12,1% de ces gènes l'a été chez les poissons AB1h. Plus précisément, l'expression de la majorité des gènes affectés a été significativement diminuée par l'aliment V chez les poissons des lignées R23h et A22h (Figure 7.2). Les résultats chez ces deux dernières lignées sont en accord avec les résultats obtenus précédemment chez les salmonidés nourris sans FP (Tacchi *et al.*, 2012) ou sans HP (Morais *et al.*, 2012). Le tissu intestinal des poissons des lignées R23h, et dans une moindre mesure, des poissons A22h semblent donc avoir été particulièrement affecté par l'aliment 100% V. Compte tenu de ces résultats et des résultats de digestibilité, qui ont démontré des capacités plus faibles pour digérer l'amidon chez les poissons R23h nourris avec l'aliment V, on peut faire l'hypothèse que le fonctionnement du TD des poissons R23h a été plus affecté par cet aliment que ceux des autres lignées.

Transcriptome hépatique

Les poissons A22h ont été particulièrement affectés par l'aliment V, à l'inverse des poissons des deux autres lignées. En effet, parmi les 4283 gènes identifiés, l'expression de 70,8% d'entre eux a été modifiée par l'aliment V chez les poissons A22h, contre 44,4% chez les poissons AB1h. L'expression de la majorité des gènes était diminuée par l'aliment V et ils étaient donc plus faiblement exprimés chez les poissons de la lignée A22h. C'est notamment le cas pour ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse protéique. Il est cependant difficile de conclure si la constance de l'expression de ces gènes chez les poissons R23h et AB1h est la cause de la meilleure croissance de ces poissons ou si elle en est le reflet.

Au-delà de ces différences globales, différentes fonctions ont pu être identifiées comme influençant la capacité des poissons à utiliser l'aliment.

7.3.2 Le métabolisme lipidique permet d'expliquer les croissances contrastées à 6 mois

Parmi les marqueurs identifiés liés au métabolisme à 6 mois, un grand nombre appartenait à différentes voies du métabolisme lipidique. La capacité réduite, voire l'incapacité des poissons A22h, à activer certaines voies du métabolisme lipidique (lipogenèse, β -oxydation, synthèse d'AGPI-LC et de cholestérol) pourrait notamment expliquer les croissances plus faibles de ces poissons lorsqu'ils ont été nourris avec des aliments V. C'est particulièrement le cas pour la voie de synthèse des AGPI-LC de la série n-3 (notamment EPA et DHA, absents des aliments V), et une moindre activation de cette voie chez les poissons A22h pourrait influencer de nombreuses voies du métabolisme, en raison du rôle crucial de ces AG dans la structure et la fluidité des membranes cellulaires, mais également différentes voies de l'immunité.

Des différences de l'expression de gènes de la néoglucogenèse ont également été détectées et pourraient aussi partiellement affecter la croissance des poissons. Cependant, des conclusions sont difficiles à tirer car la digestibilité de l'amidon était réduite chez les poissons R23h, et les différences pourraient provenir de la quantité de glucides digestibles, absorbés et métabolisés.

7.3.3 Des différences de croissances liées à l'immunité

Comme à court terme (5 semaines), des variations liées à des mécanismes de l'immunité des poissons pourraient également participer aux différences de performances entre les lignées après 6 mois d'alimentation.

Comme détaillé dans le chapitre précédent, les aliments à base de végétaux sont connus pour altérer différentes composantes de l'immunité *via* la possible présence de facteurs anti-nutritionnels (Krogdahl *et al.*, 2010) ou *via* la modification du profil en AG des aliments. Des différences de sensibilité aux facteurs anti-nutritionnels et/ou à la modification de profil en AG entre les génotypes, pourrait expliquer les différences observées dans l'expression des gènes de l'immunité.

Les résultats du transcriptome intestinal n'ayant pas révélé de différences d'expression des gènes liés à l'immunité entre les trois lignées, comme cela aurait été attendu dans le cas où une des lignées aurait développé des entérites (Martin et Król, 2017), nous pouvons penser que des

Tableau 7.1 – Liste de potentiels marqueurs liés à l'immunité différentiellement exprimés entre les trois lignées lors des différents prélèvements effectués (**Effet du génotype**). Pour l'effet de l'aliment 100 %V : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype		Effet aliment 100%V					
		J0	5 semaines	6 mois	R23h à 5 sem	AB1h A22h	R23h à 6 mois	AB1h A22h	
Complément									
P98093	Complement C3 (C3)	AB1h<A22h		AB1h<A22h		AB1h<A22h	+	+	+
P81187	Complement factor B (CFB)	R23h<A22h		R23h<A22h		R23h<A22h	+	+	ns
P08603	Complement factor H (CFH)	R23h<A22h		R23h<A22h		R23h<A22h	-	-	+
Q03591	Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)	AB1h<A22h		AB1h<A22h		AB1h<A22h	ns	-	+
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (CFHR5)	R23h<AB1h		R23h<AB1h		R23h<A22h	ns	ns	+
Q5R5A4	Complement factor I (CFI)	R23h>A22h		R23h>A22h		R23h<A22h	ns	+	+
P20023	Complement receptor type 2 (CR2)	R23h<AB1h ; R23h<A22h		R23h<AB1h ; R23h<A22h		R23h>A22h R23h>A22h	ns	+	+
Réponse inflammatoire									
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	AB1h<A22h		AB1h<A22h		AB1h<A22h	-	ns	ns
P09034	Argininosuccinate synthase (Ass1)	AB1h<A22h		AB1h<A22h		AB1h>A22h	ns	ns	-
P07589	Fibronectin (FN1)	AB1h<A22h		AB1h<A22h		AB1h<A22h	ns	-	ns
Activité des cytokines									
P59046	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12 (NLRP12)	AB1h<A22h		AB1h<A22h		AB1h < A22h	ns	-	ns

différences de sensibilité à des facteurs anti-nutritionnels contenus notamment dans les farines végétales n'ont pas été à l'origine des différences de performance des poissons. D'ailleurs, ils ont probablement été atténué par les étapes d'extrusion de l'aliment.

En revanche, les poissons AB1h et R23h, ayant de meilleures capacités à activer les voies de synthèse des AGPI-LC tel que l'EPA et le DHA, ils pourraient être moins affectés par les modifications du profil en AG que les poissons A22h, participant ainsi à leur meilleure croissance.

Excepté pour deux gènes du complément (CFHR5 et CR2), aucun des gènes trouvés lors de la comparaison des transcriptomes hépatiques n'était déjà différenciellement exprimé après 5 semaines d'alimentation (Tableau 7.1). De plus, sur les 79 gènes liés à l'immunité différenciellement exprimés entre les lignées à 6 mois, 11 étaient déjà différenciellement exprimés entre les lignées avant que les poissons n'aient été confrontés avec l'aliment (Tableau 7.1). Comme cela a été discuté dans le chapitre précédent (Paragraphe 6.3.4), il est difficile de tirer des conclusions de ces résultats, en raison de la modification du niveau d'expression des gènes en fonction du stade de développement des poissons.

■ ■ ■ Conclusion du chapitre 7

La comparaison des trois lignées isogéniques, ayant des réponses contrastées lorsqu'elles sont nourries avec d'aliment V, nous a permis d'identifier les fonctions liées à la capacité ou l'incapacité de certains génotypes de TAC à utiliser efficacement l'aliment V à "long terme" (6 mois). Alors que des différences de la consommation d'aliment ne semblent pas être la cause des différences de croissance à ce stade, des différences dans la capacité des poissons à activer certaines voies du métabolisme lipidique pourraient expliquer les différences de capacité à utiliser l'aliment V après une période de 6 mois d'alimentation.

8

La lignée sélectionnée

Les objectifs de cette troisième partie étaient de **(i)** vérifier l'efficacité et **(ii)** la spécificité de la sélection faite par l'INRA sur la survie et la croissance avec un aliment 100%V, puis **(iii)** d'identifier les fonctions impliquées dans la capacité à survivre et grandir avec cet aliment V.

Pour répondre à l'objectif (i) et (ii), des poissons issus de la lignée témoin (SY) et des poissons issus de la lignée sélectionnée (SU) ont été nourris dès leur premier repas et pendant 6 mois avec des aliments V ou M. Ces expérimentations ont été répétées trois fois, une première fois avec les poissons de la seconde génération de sélection (expérimentation RS2), une seconde fois avec les poissons de la troisième génération de sélection (expérimentation RS3) et une dernière fois avec les poissons issu de la quatrième génération de sélection (expérimentation RS4). Pour l'expérimentation RS2, en plus des aliments M et V, deux autres aliments ont également été testés : un aliment V_{old} dont la formulation variait de celle de l'aliment V sur plusieurs points (soja, attractant) et un aliment commercial C. Lors de l'expérimentation RS4, deux autres aliments T et V_{alt} , formulés à partir de matières premières alternatives ont aussi été testés (Détail des formules dans le paragraphe 5.1).

Les mortalités et la croissance ont été suivies au cours de ces trois expérimentations et l'efficacité de la sélection a été estimée grâce aux calculs des gains génétiques. Afin de comprendre les origines de l'amélioration des performances des poissons sélectionnés (adaptation à l'aliment V en lui-même, adaptation au manque d'HP et de FP ou adaptation globale pour de meilleure capacité à grandir), le calcul des gains génétiques spécifiques a été effectué pour les différents aliments testés (Détails paragraphe 5.3.2).

Pour répondre à l'objectif (iii), l'estimation de la quantité d'aliment consommé et l'efficacité alimentaire, ainsi que l'analyse de caractères relatifs à la nutrition (digestibilité, rétention des nutriments et profil en AG des poissons entiers) ont été effectuées lors de l'expérimentation RS3.

Chapitre 8. La lignée sélectionnée

Les résultats obtenus après trois générations de sélection (RS3) ont fait l'objet d'une publication scientifique "**Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits**", parue dans Plos One (Paragraphe 8.1). Les résultats sur l'efficacité de la sélection après deux et quatre générations sont présentés en résultats complémentaires (Paragraphe 8.2). L'ensemble de ces résultats est discuté dans la troisième partie du chapitre (Paragraphe 8.3).

Pour ce chapitre, le terme "SU" désigne les poissons de la lignée sélectionnée, avec SU-2, SU-3 et SU-4, les poissons issus de la seconde, troisième et quatrième génération de sélection, respectivement. Le terme "SY" désigne, quant-à-lui, les poissons de la lignée témoin.

Pour chacune de ces lignées :

SUi-V et SYi-V désignent les poissons nourris avec l'aliment 100% et SUi-M et SYi-M ceux nourris avec l'aliment M, avec "i", la génération étudiée.

SU2-C et SY2-C désignent les poissons nourris avec l'aliment commercial et SU2-V_{old} et SY2-V_{old} ceux nourris avec l'aliment V_{old} lors de l'expérimentation RS2.

SU4-V_{alt} et SY4-V_{alt} désignent les poissons nourris avec l'aliment V_{alt} et SU4-T et SY4-T ceux nourris avec l'aliment T, lors de l'expérimentation RS4.

8.1 Publication scientifique

RESEARCH ARTICLE

Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits

Thérèse Callet^{1,2}, Françoise Médale², Laurence Larroquet², Anne Surget², Pierre Aguirre², Thierry Kerneis³, Laurent Labbé³, Edwige Quillet¹, Inge Geurden², Sandrine Skiba-Cassy², Mathilde Dupont-Nivet^{1*}

1 UMR GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, **2** UMR NuMéA, INRA, St-Pée-sur-Nivelle, France, **3** PEIMA, INRA, Sizun, France

* mathilde.dupont-nivet@inra.fr



OPEN ACCESS

Citation: Callet T, Médale F, Larroquet L, Surget A, Aguirre P, Kerneis T, et al. (2017) Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. PLoS ONE 12(10): e0186705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705>

Editor: Rafael Vazquez-Duhalt, Department of Bionanotechnology, MEXICO

Received: July 28, 2017

Accepted: October 5, 2017

Published: October 23, 2017

Copyright: © 2017 Callet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was carried out within the framework of the AGREENFISH project (project ANR-13-ADAP-001) funded by ANR, the French research agency.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

In the context of limited marine resources, the exponential growth of aquaculture requires the substitution of fish oil and fishmeal, the traditional components of fish feeds by terrestrial plant ingredients. High levels of such substitution are known to negatively impact fish performance such as growth and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as in other salmonids. In this respect, genetic selection is a key enabler for improving those performances and hence for the further sustainable development of aquaculture. We selected a rainbow trout line over three generations for its ability to survive and grow on a 100% plant-based diet devoid of both fish oil and fishmeal (V diet) from the very first meal. In the present study, we compared the control line and the selected line after 3 generations of selection, both fed either the V diet or a marine resources-based diet (M diet). The objective of the study was to assess the efficiency of selection and the consequences on various correlated nutritional traits: feed intake, feed efficiency, digestibility, composition of whole fish, nutrient retention and fatty acid (FA) profile. We demonstrated that the genetic variability present in our rainbow trout population can be selected to improve survival and growth. The major result of the study is that after only three generations of selection, selected fish fed the V diet grew at the same rate as the control line fed the M diet, whilst the relative reduction of body weight was 36.8% before the selection. This enhanced performance on the V diet seems to be mostly linked to a higher feed intake for the selected fish.

Introduction

Aquaculture is one of the fastest growing animal production sectors. Its expansion is a mixed blessing as it allows for the provision of half of all fish consumed by humans worldwide, but

significantly increases the need for fishmeal (FM) and fish oil (FO), traditional components of aquaculture feed [1]. This is particularly true for high trophic level fish such as rainbow trout which are large consumers of FO and FM. Aquaculture reliance on both FM and FO must be reduced to enable the further sustainable development of aquaculture, and there are several reasons for this. Fisheries for small pelagic fish highly affect marine ecosystems, and the apparition of fisheries quotas led to the stabilization of FM and FO production [2]. The high demand for FO and FM along with their limited availability affects the supply and demand balance and leads to higher prices, which are no longer viable for aquaculture production [3]. Finally, some of the small pelagic fish used for FM and FO production can be used to feed people [4]. Today, terrestrial plant-based products (vegetable oil, VO and vegetable meal, VM) are some of the most common components used to replace FO and FM due to their high availability and lower cost [5].

The transition towards plant-based diets is highly challenging and the effects of plant ingredients have been extensively studied [6, 7]. Feed formulations have been drastically improved in recent times, allowing substitution rates as high as 80% since first-feeding [8]. Nevertheless, the total substitution of marine ingredients still negatively impacts survival and growth rates in salmonids [9, 10]. Despite being formulated to meet fish nutrient requirements, there exist various differences in nutrient composition between traditional marine resources-based and plant-based diets, which may impact the two main determinants of growth, feed intake and feed efficiency, as well as other nutritional traits. Among these differences, we can point to the fatty acid (FA) profile since plant-based diets are usually richer in omega-6 FA and lack the very-long chained highly unsaturated omega-3 FA (such as EPA or DHA) [11]. Plant-based diets are also characterized by the presence of carbohydrates that are poorly assimilated by carnivorous fish [12], and anti-nutritional factors (ANF) that affect fish feed intake, feed efficiency, metabolism and health [13–15]. Finally, plant-based diets are also known to highly impair feed intake [6, 16].

In parallel to studies which sought to improve diet formulation, others focused on improving the performance of fish fed diets devoid of marine ingredients through genetic selection [17]. Various studies have demonstrated the existence of genetic variability in growth of rainbow trout populations when fed increasing proportions of plant products in feedstuffs [18–21]. Some genotypes seem better able to accept and use these diets than others. Some of these studies have found a significant interaction between diet and genotype for growth [20, 21] as well as for feed intake and feed efficiency [22]. This positive interaction reveals that families selected in previous breeding programs, which perform best with traditional diets, are not necessarily performing their best when fed plant-based diets. These results emphasize the need to develop breeding programs specific to plant-based diets. However, research on these breeding programs are typically focused on FM replacement [23–26] in salmonids.

Thus our team addressed the question of replacement of both FM and FO, and a sequential upward selection was made on the ability to survive and grow with a plant-based diet completely devoid of marine ingredients (both FO and FM) distributed at the very first meal [27]. After only one generation of selection, genetic progress was measured for growth rate, biomass and survival [27]. The objectives of the present study were to assess the efficiency of selection after 3 generations of selection, and to better understand the origins of the progress as well as the consequences of the selection. To answer these questions, we analyzed

1. the efficiency of selection on selected traits: the growth and the survival of rainbow trout
2. the effect of the selection on the correlated nutritional traits: feed efficiency, feed intake, digestibility, composition of whole fish including FA content and nutrient retention.

Table 1. Principles of selection for improved survival and grow with a 100% plant-based diet.

Base population	Number of breeders (Sires x Dams)	Initial number of fish	Proportion of selected fish	Diet
Year 1 (2007): SU-1				
SY	44 x 32	15000 fish	3.90%	Diet V-1
Year 3 (2009): SU-2				
SU-1	45 x 40	10000 fish	4.50%	Diet V-1
Year 6 (2011): SU-3				
SU-2	45 x 40	10000 fish	4.90%	Diet V

SY refers to the INRA-Synthetic strain. SU-1, SU-2 and SU-3 refer to the selected line obtained after one, two and three generations of selection, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t001>

Materials and methods

Selection principles

The base population is the INRA-Synthetic strain (SY), a domesticated strain maintained in the experimental PEIMA facilities (INRA, Sizun, France) fed over generations with a commercial diet, containing a mix of marine and plant ingredients. Breeding is made with a large number of breeders and without artificial selection in order to maintain the genetic variability. From this SY line, a new line (SU) was selected during three generations, for its enhanced ability to survive and grow when fed a plant-based diet totally devoid of fish oil (FO) and fishmeal (FM) (Table 1) [27]. The first generation was issued from a full factorial cross among SY parents. Fish obtained from this cross, were fed from the first-feeding stage with a plant-based diet completely devoid of marine products. The same V-1 diet was used for the first and second generation selections and a different plant-based diet was used for the third (V diet). The two plant-based diets (V-1 and V) were totally devoid of marine products which were replaced by a blend of vegetable meals (wheat, fava bean, corn, soybean, lupin and peas) and vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils)(Table 2). The two plant-based diets were supplemented with amino acids to meet rainbow trout essential amino acid requirements, and with a mineral and vitamin mix.

Selection was obviously made among the surviving fish, thus survival was the first selected trait. Three to five sortings on fish fork length were carried out between the second and the fourteenth month after the first feeding. The final proportion of selected fish ranged from 3.9% (first generation) to 4.9% (third generation). After the last sorting (14 months), selected fish were fed a commercial diet (B MEGA 20, “Le Gouessant”) to ensure a normal reproduction, and thus prevent any selection on fish reproductive capacity with the V diet. Indeed, Lazarotto *et al.* [28] showed that rainbow trout females fed all their life with a 100% plant-based diet have very heterogeneous reproductive performances. The commercial diet formulated with a blend of FM, FO and plant ingredients, contains 40% of crude protein and 28% of crude fat. The shift on a commercial diet was made after the last sorting, and this diet should not thus influence the selection. Each new generation was obtained from a full factorial cross between selected fish (at least 44 sires * 32 dams).

Evaluation of response to selection

To assess the efficiency of selection and its effect on correlated nutritional traits, a 7-month feeding trial was performed on fish issued from the third generation of selection. For each line, the selected (SU) and the control (SY), 3600 eggs were obtained through within line mating (18 dams and 31 sires for each line). Eyed eggs from the 2 lines were randomly distributed into

Table 2. Ingredients, proximal composition of the experimental diets V-1 [27], V, and M, and fatty acid composition of the M and V (2mm) experimental diets (DM: dry matter).

	V-1 diet	V diet	M diet
Ingrédients (%)			
Fishmeal (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	0	0	65
Extruded whole wheat (SudOuest Aliment, France)	0	4	21
Fava bean (CP)	0	10	0
Corn gluten (CP 60; Inzo, France)	25	17	0
Wheat gluten (CP 70; Roquette, France)	23.9	17	0
Soybean meal (CP 48; Inzo, France)	20.8	12	0
White lupin seed meal (Terrena, France)	7	5	0
Extruded peas (Aquatex, Sotexpro, France)	0	12.5	0
Fish oil (Southern hemisphere, Sopropêche, France)	0	0	11
Rapeseed oil (Daudruy, France)	6.2	6	0
Linseed oil(Daudruy, France)	3.7	3.6	0
Palm oil(Daudruy, France)	2.4	2.4	0
Soy-lecithin (Louis François, France)	2	2	0
L-Lysine (Eurolysine)	1.5	0.5	0
L-Methionine (Evonik, Germany)	0	0.5	0
CaHPO ₄ .2H ₂ O (18%P; 22%Ca)	3.5	3	0
Min. and Vit. premix, INRA ^a	2	3	3
Attractant mix ^b	0	1.5	0
Composition (% DM)			
Dry matter	94.1	96.9	97.6
Crude protein	50.5	51.4	50.1
Crude fat	16.2	18.5	19.4
Starch	-	9.6	14.1
Ash	5.6	6.5	12.7
Energy (kJ/g DM)	23.2	23.6	22.6
Fatty acid composition (% of total fatty acids)			
Saturated	16.3	19.8	39.2
MUFA	40.7	39.0	29.5
n-6 PUFA	22.5	24.0	4.7
→ 18:2 n-6 (LA)	22.2	24.0	3.2
n-3 PUFA	20.6	17.1	19.3
→ 18:3 n-3 (ALA)	20.6	17.1	1.1
→ 20:5 n-3 (EPA)	0.0	0.0	9.5
→ 22:6 n-3 (DHA)	0.0	0.0	5.2

^aMineral premix (g or mg kg⁻¹ diet): calcium carbonate (40% Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60%Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75%), 0.4 mg; zinc sulphate (36%Zn), 0.4 g; copper sulphate (25% Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33%Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30%Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA); And Vitamin premix (IU or mg kg⁻¹ diet): DL- α tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15,000 IU; DL-cholecalciferol, 3,000 IU; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1,000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2,000 mg (UPAE, INRA).

^bAttractant mix: glucosamine, 0.5 g; taurine, 0.3 g; betaine, 0.3 g; glycine, 0.2 g; alanine, 0.2 g.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t002>

12 tanks (0.25m³) at 19 days post fertilization (dpf), with an average of 600 eyed eggs per tank and maintained at a constant water temperature of 11.4°C, under artificial photoperiod condition (from 8 am to 8pm). From the first feeding (41 dpf) and for a period of 7 months (197 dpf), three batches were fed with a 100% plant-based diet completely devoid of marine products (V diet; SU-V, SY-V). The three other batches for each line were fed with a control marine resources-based diet (M diet; SU-M and SY-M). The V diet was similar as the diet used for the third generation of selection, and the M diet was primarily composed of FM, FO and also contained whole wheat in order to render the diets nearly isoproteic, isolipidic and isoenergetic. Both diets were extruded. Formulation and composition of the two experimental diets are presented in Table 2, along with the fatty acid composition. The V diet was rich in omega-6 long chain FA (n-6 PUFA) due to the presence of linoleic acid (18:2 n-6, LA). While the M diet contained both eicosapentaenoic acid (20:5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6 n-3, DHA), the V diet was completely devoid of these two fatty acids but contained alpha-linolenic acid (18:3 n-3, ALA), which is the precursor of EPA and DHA. Each diet was distributed automatically over 8 hours throughout the day and rations were adjusted according to biomass for each tank in order to meet satiation. Pellet size evolved during the experiment to adapt to fish body size, but composition remained unchanged.

Data collection. The rearing experiment was divided into two distinct periods, the first from the first feeding (41 dpf) to 153 dpf and a second from 153 to 197 dpf. During the first period, it was not possible to accurately measure feed intake because the size of the pellets, adapted to the size of fish mouth, were too small to allow a precise recording of uneaten pellets. During the second period (from 153 to 197 dpf), uneaten pellets were collected daily after each distribution. Estimation of uneaten and consumed quantities allowed for the estimation of the feed intake and feed efficiency.

Growth and survival rates. Since 19 dpf, mortality was recorded daily for each tank during the experiment. To monitor growth rate, two or three random samplings of 50 fish in each tank were performed at 61, 78, 99, 118, 133, 153, 174 and 197 dpf.

Feed intake and feed efficiency. Daily feed intake (DFI) and feed efficiency (FE) were calculated as follows:

$$DFI = \frac{NI}{(BW_f^{0.8} \times BW_i^{0.8})^{0.5} \times 44} \tag{1}$$

$$FE = \frac{BW_f - BW_i}{NI} \tag{2}$$

with BW_i and BW_f the mean body weight (in g wet weight) at the beginning (153 dpf) and at the end (197 dpf) of the period, and NI the net feed intake (in g dry matter (DM)).

Whole body composition, nutrient retention and fatty acid profile. In order to analyze the composition of whole fish, nutrient retention, and fatty acid composition, fish were anaesthetized and sampled (10 whole body fish per tank) at the beginning and at the end of the second period (153 and 197 dpf). Fish were individually weighed, frozen and stored at -20°C for further biochemical analyses (detailed below).

Nutrient retention was calculated for X, with X standing for lipids, protein or energy as follows:

$$Retention = \frac{BW_f \times X_f - BW_i \times X_i}{NI_x} * 100 \tag{3}$$

where X_i and X_f represent the initial and final carcass content in nutrient (in g) and NI_X the nutrient X intake (in g DM)

Measure of digestibility. At the end of the feeding trial, juveniles were randomly sampled and transferred to the experimental INRA facility of Saint-Pée-sur-Nivelle (France) in order to analyze apparent coefficient of digestibility (ACD). Fish were maintained at a constant temperature of 17°C in a thermoregulated system. Groups of 15 juveniles weighing on average 120 g from the 4 different conditions (SU-M, SU-V, SY-M and SY-V) were maintained in 60L cylindrical tanks equipped with an automatic faeces collector (3 tanks per condition). Fish were hand-fed twice a day to visual satiation with either the V or the M diet enriched with 1% Cr2O3, as an inert marker. The faeces were automatically collected over 23 days and stored daily at -20°C for further biochemical analyses (detailed below).

The apparent digestibility were calculated as:

$$AD_{drymatter} = 100 - \left(100 * \frac{Cr2O3_{diet}}{Cr2O3_{faeces}} \right) \tag{4}$$

$$AD_X = 100 - \left(100 * \frac{X_{faeces}}{X_{diet}} * \frac{Cr2O3_{diet}}{Cr2O3_{faeces}} \right) \tag{5}$$

where X corresponds to protein, lipid, starch or energy.

Biochemical analysis of diets, fish and faeces. Diets, previously reduced to powder, fish samples previously lyophilized after moisture estimation (2 pools of 5 whole fish samples), and faeces previously lyophilized were analyzed. Dry matter content (DM) was measured after drying samples (5g) at 105°C for 24 h. Protein content was estimated by the Kjeldahl method (Nx6.25, Kjeldahl Nitrogen Analyser 2000, Fison Instruments). Gross energy of the samples was measured after combustion in an adiabatic bomb calorimeter. Starch content was measured according to the method described by Thivend et al. [29]. Total lipid extraction was performed according to Folch *et al.* [30], to assess final lipid content.

To analyze the fatty acid (FA) profile, an acid-catalyzed transmethylation was performed from 100 mg of lipids extracted according to Shantha and Ackman [31], to prepare fatty acid methyl esters (FAME). FAME were analyzed with a Varian 3900 gas chromatograph and identified with reference to a known standard mixture (Sigma, St Louis, MO, USA). The results were expressed for each FA as a percentage of total lipids extracted and as quantities (in mg/100g tissue) for both 20:5 n-3 FA (EPA) and 22:6 n-3 FA (DHA).

Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using the R software (version 3.2.5) [32]. When needed, data were transformed in order to meet assumptions of variance analysis. A logarithmic transformation was used for mean body weights and a logit transformation was used for proportions (survival rate, composition of whole fish, nutrient retention and FA profile). For each parameter, the effect of the diet, the selection and the interaction between diet and selection were assessed using an analysis of variance. If the analysis of variance revealed a significant effect (cut-off p-value<0.01), a Tukey's range test was also performed in order to detect which groups differed from each other (cut-off p-value<0.01).

Finally, for body weight and survival, the genetic gain for each diet ($gain_V$ and $gain_M$) which is the average trait improvement of selected fish in comparison to the control, were

calculated to evaluate the efficiency of the selection, as follows:

$$Gain_V = 100 * \frac{X_{SU-V} - X_{SY-V}}{X_{SY-V}} \quad (6)$$

$$Gain_M = 100 * \frac{X_{SUM} - X_{SY-M}}{X_{SY-M}} \quad (7)$$

With $Gain_V$, the gain when fish were fed with the V diet and $Gain_M$ when fish were fed with the M diet. Positive genetic gains reflect higher performance in the selected fish, and thus confirmed the efficiency of the selection. In the case where selected fish perform better than the control, irrespective of the diet (fed the M or V diet), it is essential to calculate the specific gain for the V diet (specific V gain), as follows:

$$Gain_{V_{specific}} = Gain_V - Gain_M \quad (8)$$

A positive specific V gain reveals a higher genetic gain when fish were fed the V diet than when fed the M diet. The higher the gain, the higher the selection is specific to the V diet. A positive interaction between the effect of diet and the effect of the selection is also used as an indicator of the selection specificity, as it reveals a significant difference between the genetic gain obtained for fish fed the M and the V diets.

Ethical statement

Experimentation was conducted in the INRA experimental facilities (Peima facilities, Sizun, France and UMR Numéa, St-Pée-sur-Nivelle, France) authorized for animal experimentation by the French veterinary service which is the competent authority (B 29-277-02 and A 64-495-1). The experiments were in strict accordance with EU legal frameworks related to the protection of animals used for scientific research (Directive 2010/63/EU) and according to the National Guidelines for Animal Care of the French Ministry of Research (decree n°2013-118, february 1st, 2013). The scientists in charge of the experimentation received training and personal authorization (N° B64 10 003 and A29 102).

In agreement with ethical committees “Comité d’Ethique Aquitaine Poissons Oiseaux” (C2EA-73) and “Comité d’Ethique Finistérien en Expérimentation Animale” (C2EA-74), the experiment reported here does not need approval by a specific ethical committee since it implies only classical rearing practices with all diets used in the experiment formulated to cover the nutritional requirements of Rainbow trout [33]. During the experiment, fish were daily monitored. If any clinical symptoms (i.e. morphological abnormality, restlessness or uncoordinated movements) were observed, fish were sedated by immersion in 2% benzocaine solution and then euthanized by immersion in a 6% benzocaine solution (anesthetic overdose) during 3 minutes.

Results

Mean body weights and survival rate before the 1st feeding

Egg weight (0.07 ± 0.0 at 0 dpf) was not significantly different between the two lines SU and SY (P -value > 0.05). Concerning survival, from hatching time to first feeding (41 dpf), there was a small but significant effect of the selection. Fish from the selected lines SU had a significantly lower survival rate than fish from the control SY line ($96.3 \pm 0.17\%$ and $98.5 \pm 0.15\%$, respectively, p -value < 0.001).

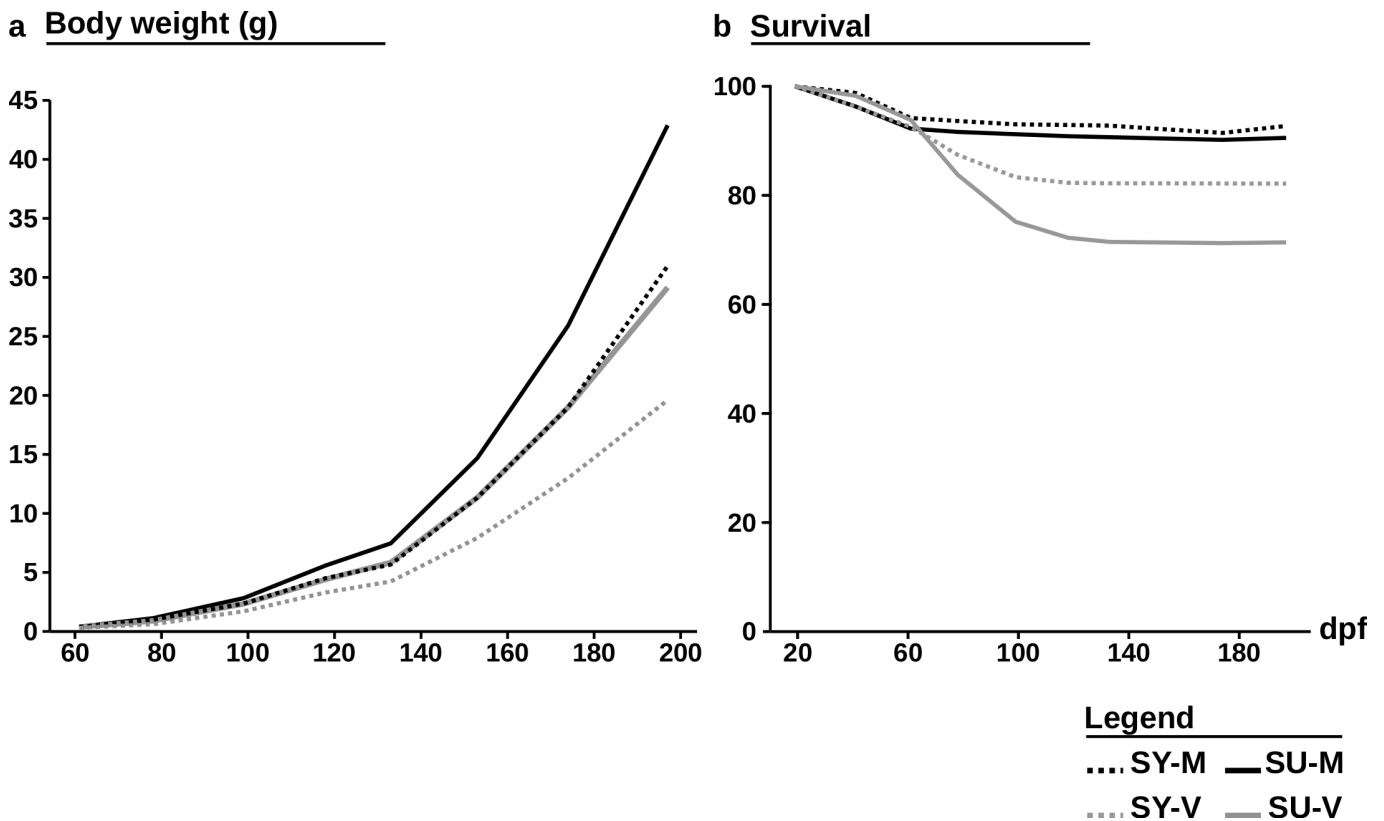


Fig 1. Growth and survival performance. (a) Body weights and (b) survival rate of the control (SY) and selected (SU) fish fed the M diet or the V diet (SY-M, SU-M, SY-V, SU-V) obtained for the period 1 and period 2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.g001>

Growth performance and survival rate during experiment

After 7 months of feeding, fish reached a body weight of 42.9 ± 1.0 g for SU-M, 31.0 ± 0.2 g for SY-M, 29.4 ± 0.6 g for SU-V and 19.6 ± 0.2 g for SY-V. Body weights and survival rates obtained during the experiment are presented in Fig 1. Results of the statistical analysis on mean body weight are presented in Table 3. At each date, there was an effect of both the diet and the selection. While, the V diet diminished fish body weight, the selection increased it. Interestingly, there were no significant differences between the mean body weight of SU-V fish and SY-M fish from 78 dpf until the end of the trial.

The positive M and V genetic gains obtained for body weight (Fig 2) reflect the efficiency of the selection throughout the experiment. The specific V gain increased from 19.7% to 33.0% at 78 dpf and then decreased to 10.2% (197 dpf). This positive result, along with the significant interaction between diet and selection (61, 78, 99 and 153 dpf) reflect the specificity of the selection.

Results of the statistical analysis on survival are presented in Table 4. After first feeding, survival rate of fish fed the V diet dropped significantly and finally stabilized at $82.2 \pm 3.3\%$ for SU-V and $71.4 \pm 2.7\%$ for SY-V at 197 dpf, while the survival rate for fish fed the M diet remained stable (SU-M = $90.5 \pm 0.3\%$, SY-M = $92.7 \pm 0.3\%$ at 197 dpf). From 78 dpf, there was a strong effect of the diet. A positive interaction between the selection and the diet appeared at 118 dpf, and reveal the efficiency and the specificity of the selection. Post-hoc tests revealed

Table 3. Results of the statistical analysis on mean body weight.

	SY-M	SU-M	SY-V	SU-V	Statistical analysis		
					Diet	Selection	Diet×Selection
Period 1 from 41 to 153 dpf							
61	0.4±0.0ab	0.4±0.0a	0.3±0.0c	0.4±0.0b	<0.001	<0.001	<0.001
78	1.0±0.0ab	1.1±0.0a	0.6±0.0c	0.9±0.0b	<0.001	<0.001	<0.01
99	2.4±0.0b	2.8±0.0a	1.7±0.0c	2.3±0.0b	<0.001	<0.001	<0.01
118	4.5±0.0b	5.6±0.1a	3.3±0.1c	4.4±0.1b	<0.001	<0.001	<i>ns</i>
133	5.7±0.1b	7.5±0.1a	4.2±0.1c	5.8±0.1b	<0.001	<0.001	<i>ns</i>
153	11.3±0.2b	14.7±0.2a	7.9±0.1c	11.3±0.2b	<0.001	<0.001	<0.01
Period 2 from 153 to 197 dpf							
174	19.0±0.1b	25.9±0.5a	13.0±0.3c	19.0±0.4b	<0.001	<0.001	<i>ns</i>
197	31.0±0.2b	42.9±1.0a	19.6±0.2c	29.1±0.6b	<0.001	<0.001	<i>ns</i>

Mean body weight in g (mean±standard error) of the control (SY) and selected (SU) fish fed the M diet or the V diet (SY-M, SU-M, SY-V, SU-V) during the experiment and their statistical analyses for the effects of the diet, of the selection and of the interaction between diet and selection (cutoff P-value<0.01). Different letters indicate significant differences between groups assessed with a post-hoc test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t003>

that SU-V had a significant higher survival rate than SY-V (P-values<0.01), while no differences were recorded between SY-M and SU-M fish (P-values>0.05).

Feed intake, feed efficiency

The quantity of feed ingested for each batch was measured precisely during a 44 day period, which allowed us to estimate the feed intake and then the feed efficiency per batch (Fig 3). Concerning both the feed intake and the feed efficiency, there was a significant effect of the

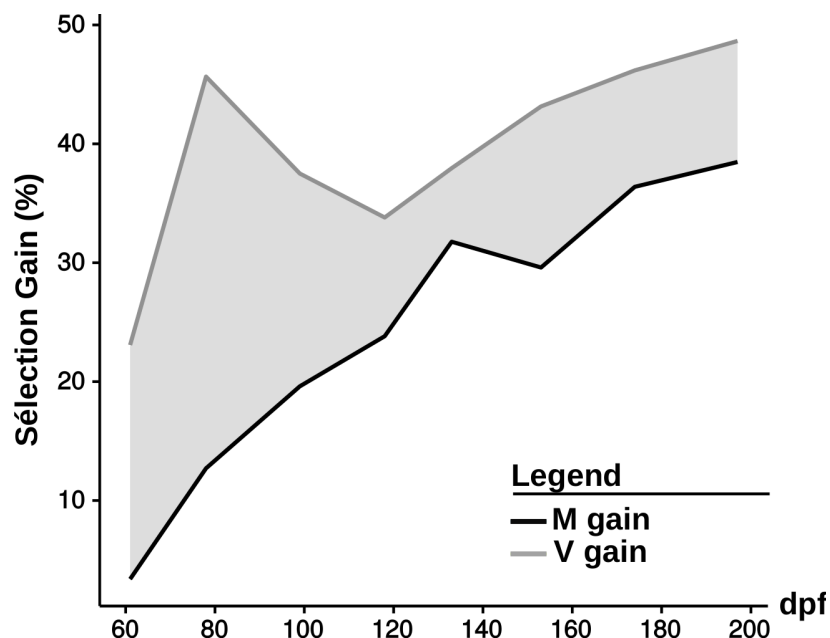


Fig 2. Selection gain obtained after three generation of selection. Selection gain obtained for mean body weights (%) for fish fed with the V diet (green line) and fish fed the M diet (blue line). The difference between the two curves represent the specific gain for plant-based diet.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.g002>

Table 4. Results of the statistical analysis on survival.

	SY-M	SU-M	SY-V	SU-V	Statistical analysis		
					Diet	Selection	Diet×Selection
Period 1 from 41 to 153 dpf							
41	98.8±0.2a	96.3±0.1b	98.3±0.2a	96.3±0.4b	-	<0.001	-
61	94.2±0.3	92.2±0.7	93.8±0.8	92.6±0.6	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
78	93.6±0.4a	91.6±0.5ab	83.8±1.9c	87.4±1.7bc	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
99	93.0±0.3a	91.2±0.5a	75.2±2.6b	83.3±2.9b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
118	92.9±0.3a	90.8±0.4a	72.2±2.8c	82.3±3.2b	<0.001	<i>ns</i>	<0.01
133	92.8±0.3a	90.7±0.3a	71.5±2.7 c	82.2±3.3b	<0.001	<i>ns</i>	<0.01
153	92.7±0.3a	90.5±0.3a	71.4±2.7 c	82.2±3.3b	<0.001	<i>ns</i>	<0.01
Period 2 from 153 to 197 dpf							
174	92.7±0.3a	90.5±0.3a	71.4±2.7c	82.2±3.3b	<0.001	<i>ns</i>	<0.01
197	92.7±0.3a	90.5±0.3a	71.4±2.7c	82.2±3.3b	<0.001	<i>ns</i>	<0.01

Survival (mean±standard error) of control (SY) and selected (SU) fish fed the M diet or the V diet (SY-M, SU-M, SY-V, SU-V) during the experiment and their statistical analyses for the effects of the diet, of the selection and of the interaction between diet and selection (cutoff P-value<0.01). Different letters mean significant differences between groups assessed with a post-hoc test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t004>

diet (P-value<0.001) and the selection (P-values<0.001), but no significant interaction. The V diet significantly lowered the feed intake, while the selection significantly increased it. Interestingly, the SU-V fish had a higher feed intake than the SY-M fish (P-value<0.01). Similarly, the V diet and the selection significantly lowered the feed efficiency.

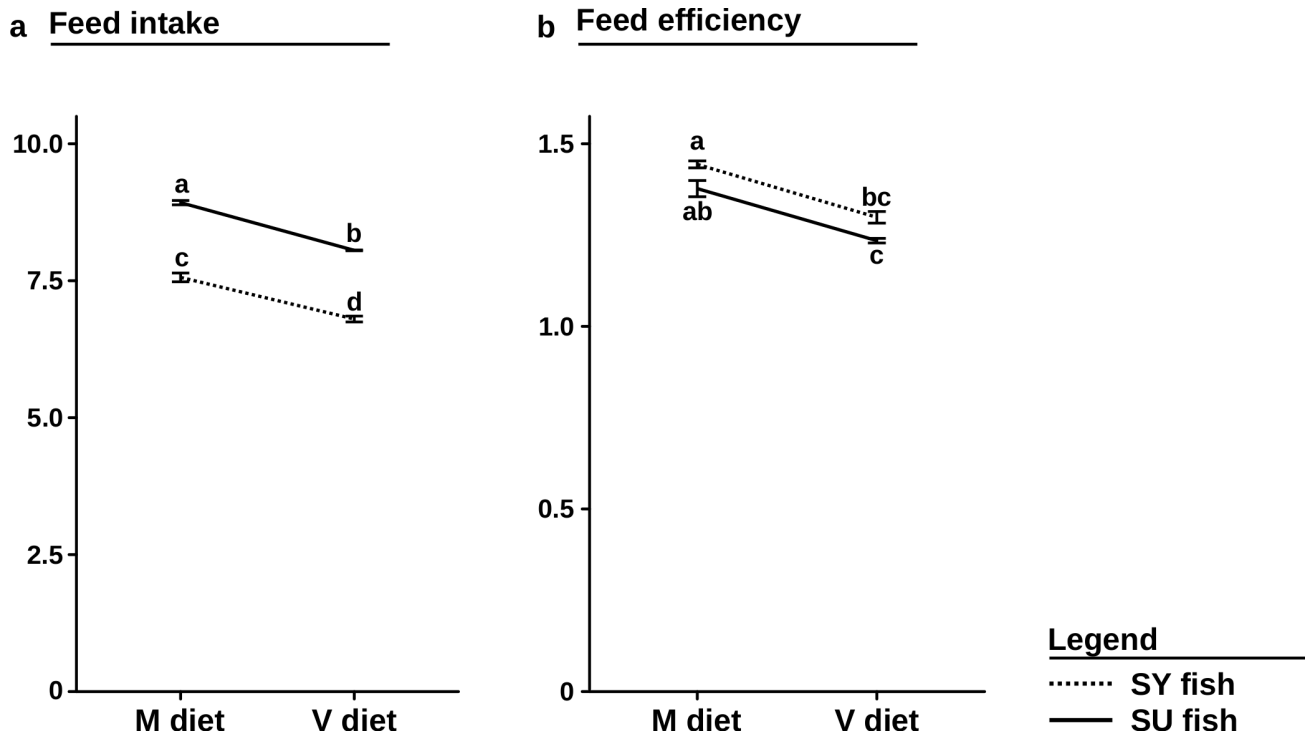


Fig 3. Results of the statistical analysis on feed intake and feed efficiency. (a) Mean feed intake and (b) feed efficiency (mean ± standard error) estimated during the second period of 44 days (from 153 to 197 dpf) for control and selected fish fed the M diet or the V diet (SU-M, SU-V, SY-M, SY-V). Different letters mean significant differences (P-value<0.01) between the four groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.g003>

Table 5. Results of the statistical analysis on apparent digestibility.

	SY-M	SU-M	SY-V	SU-V	Statistical analysis		
					Diet	Selection	Diet×Selection
Moisture	83.5±0.0a	83.9±0.3a	81.4±0.1b	81.7±0.2b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Lipid	97.2±0.1a	97.4±0.0a	95.3±0.0b	95.8±0.0b	<0.001	<0.01	<i>ns</i>
Protein	91.5±0.1b	91.2±0.3b	96.7±0.1a	96.8±0.1a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Energy	91.4±0.1a	91.7±0.2a	88.4±0.2b	88.7±0.1b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Starch	98.0±0.3b	99.3±0.0a	91.1±0.6c	93.5±0.4c	<0.001	<0.001	<0.01

Average apparent digestibility of nutrients and energy (%) (mean ± standard error) for control and selected fish fed the M diet or the V diet (SU-M, SU-V, SY-M, SY-V) during 23 days and their statistical analyses for the effects of the diet, of the selection and of the interaction between diet and selection (cutoff P-value<0.01). Different letters indicate significant differences between groups assessed with a post-hoc test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t005>

Nutrient apparent digestibility

Apparent digestibility coefficients (ADC) and the associated statistical results are presented in Table 5. For each nutrient, there was a strong diet effect. The V diet significantly decreased the ADC of moisture, lipid, energy and starch. In contrast, the ADC for proteins was higher in fish fed the V diet. Concerning lipids, there was a significant effect of the selection. However, differences were small and post-hoc testing did not detect any differences between SY-M and SU-M (P-value>0.01); nor between SY-V and SU-V (P-value>0.01). For starch, there was a significant effect of the selection and an interaction. SU fish had significantly higher starch ADC values when fed the M diet (P-value<0.001), but no significant differences were detected when fish were fed the V diet (P-value = 0.13).

Nutrient retention, composition of whole fish and fatty acid profile

Results of composition of whole body and nutrient retention are presented in Table 6. There was a significant diet effect. The V diet enhanced the whole lipid content and energy (at 153 dpf only). Selection had no significant effect on any of these parameters.

Both the diet and the selection affected the efficiency of protein retention. Fish fed the V diet retained less protein than fish fed the M diet (P-value<0.001). And on average, the selection negatively affected the protein retention of the SU fish. However further testing did not reveal any differences between SY-M and SU-M (P-value>0.01), or between SY-V and SU-V (P-value>0.01).

Finally, the V diet highly affected the fatty acid profile at both time points (P-values<0.001, Table 7). While the V diet decreased the overall proportion of saturated FA and n-3 PUFA, the overall proportion of mono-unsaturated fatty acid (MUFA) and n-6 PUFA fatty acids was increased. Specifically, both the linoleic acid (LA) and the linolenic acid (ALA), the V diet increased their proportions.

Concerning EPA and DHA, the V diet significantly decreased their proportions on whole fish body content. The selection also affected their proportion at 197 dpf (P-values<0.01). For EPA, no differences were observed when fish were fed the M diet (P-value = 0.35) but SY-V fish tended to have a higher EPA proportion than SU-V (P-value = 0.01). A similar pattern was observed for DHA. While no differences were observed when fish were fed the M diet (P-value = 0.25), SY-V tended to have higher final DHA proportion than SU-V (P-value = 0.07).

When EPA and DHA were considered in term of absolute content in whole fish (Table 8), there was an effect of the diet (P-values<0.001), and an effect of the interaction for EPA at 153 dpf (P-values<0.001). While the V diet decreased the EPA and DHA amount in both lines, the

Table 6. Results of the statistical analysis on composition of whole fish and nutrient retention.

	SY-M	SU-M	SY-V	SU-V	Statistical analysis		
					Diet	Selection	Diet×Selection
Composition of whole fish at 153 dpf							
Moisture	73.5±0.3	73.4±0.1	72.8±0.4	72.4±0.2	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Lipid	2.9±0.1b	2.9±0.0b	3.1±0.1ab	3.4±0.1a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Protein	13.9±0.1	13.8±0.1	14.0±0.2	13.7±0.1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Energy	6.8±0.1b	6.7±0.0b	7.1±0.1ab	7.5±0.1a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Composition of whole fish at 197 dpf							
Moisture	71.8±0.2	70.7±0.3	70.9±0.6	69.8±0.1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Lipid	3.3±0.1b	3.6±0.1ab	4.0±0.2a	4.1±0.1a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Protein	15.5±0.1	15.6±0.1	15.2±0.1	15.2±0.1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Energy	7.2±0.1	7.7±0.1	7.6±0.2	8.0±0.1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Nutrient retention (% Digestible intake)							
Lipid	27.3±0.9	29.4±0.6	33.4±2.2	31.4±0.4	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Protein	51.8±0.2a	49.6±0.6a	41.7±0.6b	40.3±0.4 b	<0.001	<0.01	<i>ns</i>
Energy	52.0±0.3	54.0±0.5	49.4±2.2	49.2±0.3	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Average initial (at 153 dpf) and final (at 197 dpf) composition of whole fish (%) and nutrient retention (%) (mean ± standard error) for control and selected fish fed the M diet or the V diet (SU-M, SU-V, SY-M, SY-V) and their statistical analyses for the effects of the diet, of the selection and of the interaction between diet and selection (cutoff P-value<0.01). Different letters indicate significant differences between groups assessed with a post-hoc test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t006>

Table 7. Results of the statistical analysis on FA profile.

	SY-M	SU-M	SY-V	SU-V	Statistical analysis		
					Diet	Selection	Diet×Selection
Fatty acid profile at 153 dpf							
Σ Saturated	35.9±0.7a	38.9±0.5a	22.0±0.4b	22.3±0.9b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Σ MUFA	38.5±0.1b	38.1±0.2b	42.8±0.2a	42.5±0.2a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Σ n-6 PUFA	7.2±0.1b	7.2±0.1b	22.5±0.1a	22.3±0.4a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→18:2 n-6 (LA)	2.7±0.0b	2.6±0.0b	18.8±0.0a	18.8±0.3a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Σ n-3 PUFA	15.0±0.7	12.3±0.5	12.2±0.2	12.3±0.6	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→18:3 n-3 (ALA)	0.6±0.0b	0.6±0.0b	7.3±0.1a	7.6±0.2a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→20:5 n-3 (EPA)	5.8±0.2a	5.0±0.2a	0.5±0.0b	0.5±0.1b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→22:6 n-3 (DHA)	5.6±0.4a	4.2±0.2a	1.0±0.1b	1.1±0.2b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Fatty acid profile at 197 dpf							
Σ Saturated	37.2±1.1a	39.5±0.4a	21.8±0.5b	23.3±0.2b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Σ MUFA	35.6±0.5b	36.0±0.7b	44.0±0.2a	44.8±0.8a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Σ n-6 PUFA	7.5±0.2b	7.3±0.1b	22.0±0.1a	21.0±0.3a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→18:2 n-6 (LA)	3.1±0.1b	3.0±0.0b	18.8±0.1a	18.3±0.2a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Σ n-3 PUFA	16.4±0.9a	14.3±0.3ab	11.8±0.2c	10.5±0.5bc	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→18:3 n-3 (ALA)	0.8±0.0b	0.8±0.0b	7.8±0.2a	7.4±0.3a	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→20:5 n-3 (EPA)	5.7±0.1a	5.2±0.0a	0.4±0.0b	0.3±0.0c	<0.001	<0.01	<i>ns</i>
→22:6 n-3 (DHA)	6.9±0.7a	5.7±0.2a	0.8±0.1b	0.6±0.0b	<0.001	<0.01	<i>ns</i>

Fatty acid composition (% of total FA) at 153 dpf and at 197 dpf (mean±standard error) for control and selected fish fed the M diet or the V diet (SU-M, SU-V, SY-M, SY-V) and their statistical analyses for the effects of the diet, of the selection and of the interaction between diet and selection (cutoff P-value<0.01). Different letters indicate significant differences between groups assessed with a post-hoc test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t007>

Table 8. Results of the statistical analysis on EPA and DHA content.

	SY-M	SU-M	SY-V	SU-V	Statistical analysis		
					Diet	Selection	Diet×Selection
At 153 dpf							
20:5 n-3 (EPA)	168.3±5.1a	143.8±5.0b	14.2±1.1c	16.0±1.9c	<0.001	<i>ns</i>	<0.01
22:6 n-3 (DHA)	161.5±11.9a	120.1±5.1a	32.4±3.7b	36.4±7.7b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
At 197 dpf							
20:5 n-3 (EPA)	188.7±3.4a	189.2±0.6a	14.8±0.5b	12.2±0.8b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
22:6 n-3 (DHA)	228.9±22.6a	206.8±8.6a	32.9±2.1b	25.5±1.2b	<0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>

EPA and DHA content (mg/100g tissue) at 153 dpf and at 197 dpf (mean±standard error) for control and selected fish fed the M diet or the V diet (SU-M, SU-V, SY-M, SY-V) and their statistical analyses for the effects of the diet, of the selection and of the interaction between diet and selection (cutoff P-value<0.01). Different letters indicate significant differences between groups assessed with a post-hoc test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t008>

SY line had a higher EPA content than that of the SU when fed the M diet (P-value<0.01) at 153 dpf.

Responses of all the nutritional traits affected by the V diet and/or the selection are summarized in Table 9.

Discussion

In the current context where aquaculture reliance on marine products must be reduced, we have selected a line of rainbow trout for its ability to survive and grow with a 100% plant-based

Table 9. Summary of the different nutritional traits affected by the plant-based diet and by the selection (in bold).

	Effect of the V diet for each line		Effect of the selection for each diet	
	SY-V vs SY-M	SU-M vs SU-V	SU-M vs SY-M	SU-V vs SY-V
Final BW	- 36.8%	- 32.2%	+ 38.4%	+ 48.5%
Survival	- 23.0%	- 9.2%	<i>ns</i>	+ 15.2%
Feed intake	- 10.5%	- 9.0%	+ 17.1%	+ 19.1%
Feed efficiency	- 7.1%	- 14.3%	0.0%	-7.7%
Digestibility				
→ Protein digestibility	+ 5.7%	+ 6.1%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ Starch digestibility	- 7.0%	- 5.8%	+ 1.3%	<i>ns</i>
→ Lipid digestibility	- 2.0%	- 1.6%	<i>ns</i>	+ 0.5%
Retention				
→ Lipid retention	+ 22.3%	+ 6.8%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ Protein retention	- 19.5%	- 18.8%	- 4.2%	<i>ns</i>
FA Profile (197 dpf)				
→ Lipid content	+ 21.2%	+ 13.9%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ Saturated FA	- 41.4%	- 41.0%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ MUFA	+ 23.6%	+ 24.4%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ n-6 PUFA	+ 193.3%	+ 187.7%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ n-3 PUFA	- 28.1%	- 26.6%	<i>ns</i>	<i>ns</i>
→ EPA	-93.0%	- 94.0%	<i>ns</i>	- 25.0%
→ DHA	-88.4%	- 89.5%	<i>ns</i>	- 25.0%
EPA and DHA content (153 dpf)				
→ EPA (mg/100g tissue)	- 91.6%	- 88.9%	- 14.6%	<i>ns</i>
→ DHA (mg/100g tissue)	- 79.9%	- 69.7%	- 25.6%	<i>ns</i>

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.t009>

diet from the first feeding. We will first discuss the effect of such an extreme diet completely devoid of marine products, then the efficiency of the selection and its indirect consequences.

Incorporation of VO and VM affects fish performance

The present results confirmed that rainbow trout growth and survival are highly affected when fed a 100% plant-based diet since the early first-feeding, as it was previously shown [9, 10]. The majority of the nutritional traits studied were highly impaired by the V diet, in both lines. This decreased growth performance was first associated with a reduced feed intake (-9.0% for SU and -10.5% for SY line) in accordance with previous studies on plant-based diet replacement [34–36]. Causes of feed intake reduction with a plant-based diet is not well understood in fish and could be linked to either a change in feed palatability or a negative feedback due to the nutritional quality of the V diet [37]. Second, feed efficiency was reduced for both SU-V (-14.3%) and SY-V (-7.1%) as reported before with a plant-based diet [38]. Reduced feed efficiency may stem from reduced nutrient digestibility. Both starch and lipid digestibility were reduced with the V diet, thus explaining the lower digestibility for energy. In contrast, protein digestibility was high and in line with known values as the V diet was formulated with highly digestible protein concentrate [33, 34]. Unknown nutrient deficiencies could also lead to decreased performance of fish fed a plant-based diet [33]. Although the experimental V diet was formulated to meet known nutrient requirements for rainbow trout, the large reduction in protein retention when fish were fed the V diet (-19.5% for SY fish, and -18.8% for SU fish) suggests an amino acid imbalance. Finally, anti-nutritional factors (ANF) present in plant-based diets are known to be one of the major factors affecting nutrient utilization [13–15] and could be a cause for these decreases in performance. Despite being formulated with a blend of vegetable meals followed by extrusion to avoid the effects of such components, some remaining ANFs could have affected fish capacity to properly use nutrients.

Whole body composition and whole FA profile were also highly affected by the V diet for both SU and SY lines. Fish fed the V diet, irrespective of the lines, had higher fat content than fish fed the M diet, as it was previously observed when rainbow trout were fed plant-based diets [28, 39, 40]. Those differences are linked with higher lipid retention observed in fish fed the V diet, although differences were not significant due to the high heterogeneity in SY-V group. Finally, both SY-V and SU-V FA profiles were highly impaired, and reflected the FA profile of the V diet as previously shown in rainbow trout [41] and in salmon [42–44]. However, significant amounts of EPA and DHA were found in fish whole body, even though fish were fed with a diet completely devoid of these two FA since their first feeding, confirming previous results which demonstrated the ability of rainbow trout to neo-synthesise EPA and DHA from ALA [45].

Selection improves survival and growth

The major finding of the present study is that after only 3 generations of selection, selected fish fed the V diet (SU-V) reached a similar final body weight as the control fish fed the marine resources-based diet (SY-M), along with an improved survival at early stage (Fig 1). These results are very promising as only three generations were needed to overcome the major detrimental effect of the V diet on growth (-36.8% in the SY line at 197 dpf). Yamamoto *et al.* found a similar result with amago salmon selected for their ability to use a fishmeal-free diet, which reached the same body weight as control fish fed a marine resources-based diet after 3 generations of selection. In contrast to other terrestrially farmed animals, genetic gains obtained per generation in fish are expected to be large thanks to high fecundity, and an

important genetic and phenotypic variation [46]. This was the case in different breeding programs where rainbow trout were selected for rapid growth [47–50].

An analysis of the observed genetic gains allows for the efficiency and specificity of the selection to be evaluated. Interestingly, the gain obtained for body weight varied within the experiment and could be explained by the long time it takes for the SY-V fish to die. At the beginning of the trial, a portion of the control fish that were fed the V diet (SY-V) did not accept the V diet and remained small, thus increasing the disparities between the mean body weight of the two lines fed the V diet, explaining the observed peak. Once these fasting SY-V fish started to die, the disparity between mean body weights among the different groups narrowed, reducing the specific V gain.

Nevertheless, the genetic gain obtained for the V diet confirmed the results recorded after the first generation of selection [27] and confirmed the efficiency of the selection for both body weight and survival with the V diet devoid of marine resources. While the selection was really specific to the V diet for the survival, the specificity was inferior for the body weight as SU-M body weights were also improved. These results are in line with what has been observed after the first generation of selection [27] but differ from those obtained by Overturf *et al.* [23] where rainbow trout was selected on the ability to use a fishmeal-free diet. In this latter study, the growth performance of the selected fish fed the standard diet was also improved, but selected fish fed the plant-based diet reached a higher body weight than the selected fish fed the standard diet. The two experimental diets used for the selection were extremely different. Our diet was completely devoid of both FM and FO, and was thus more extreme. Due to these differences, the selection seemed to have improved different traits between Overturf's study and ours.

Lastly, looking at the evolution of the genetic gain over generations allows the gains obtained between the first generation of selection [27] and the third to be compared. Concerning body weight, the genetic gain obtained with the V diet averaged 30.4% in the first generation (from 60 to 193 dpf) and 39.0% in the third one (from 41 to 197 dpf, removing the peak at 73 dpf). Concerning survival, the genetic gain obtained with the V diet was equal to 16.2% at 193 dpf in the first generation of selection and 15.1% at 197 dpf in the third. These results could indicate a limited improvement for survival and a slower one for body weight made since the first generation.

However, these results should be interpreted cautiously as the absolute growth performance of the control line fed the V diet (SY-V) was higher during the third generation than it was in the first (Fig 4). Inconsistent performance between generations in the control line (SY) could be attributed to environmental cues, as has been demonstrated in seabass which are very sensitive to their environment when fed a complete plant-based diet from a very young stage [51]. However, our data do not allow for an adequate assessment of the effect of environment on SU-V and SY-V. Further, it is possible that an interaction between environmental cues and the line (SU-V and SY-V) may also exist. Where the interaction between environmental cues and the genotype would have been null, the genetic gain would have been comparable. However, in the case of a significant interaction, genetic gain would have been either over-estimated (SU-V more positively affected) or under-estimated (SY-V more positively affected). Diet must be considered as a potential environmental factors, as the blend of vegetable meals used for the selection was modified between the second and the third generations (diet V-1 and diet V, see Table 1). In addition, the quality of raw products may vary over time, which could also impact the composition of the diet. To better define the problem, more data spanning several generations are necessary to fully understand if one or both lines fed the V diet were affected by the diet evolution or other environmental factors.

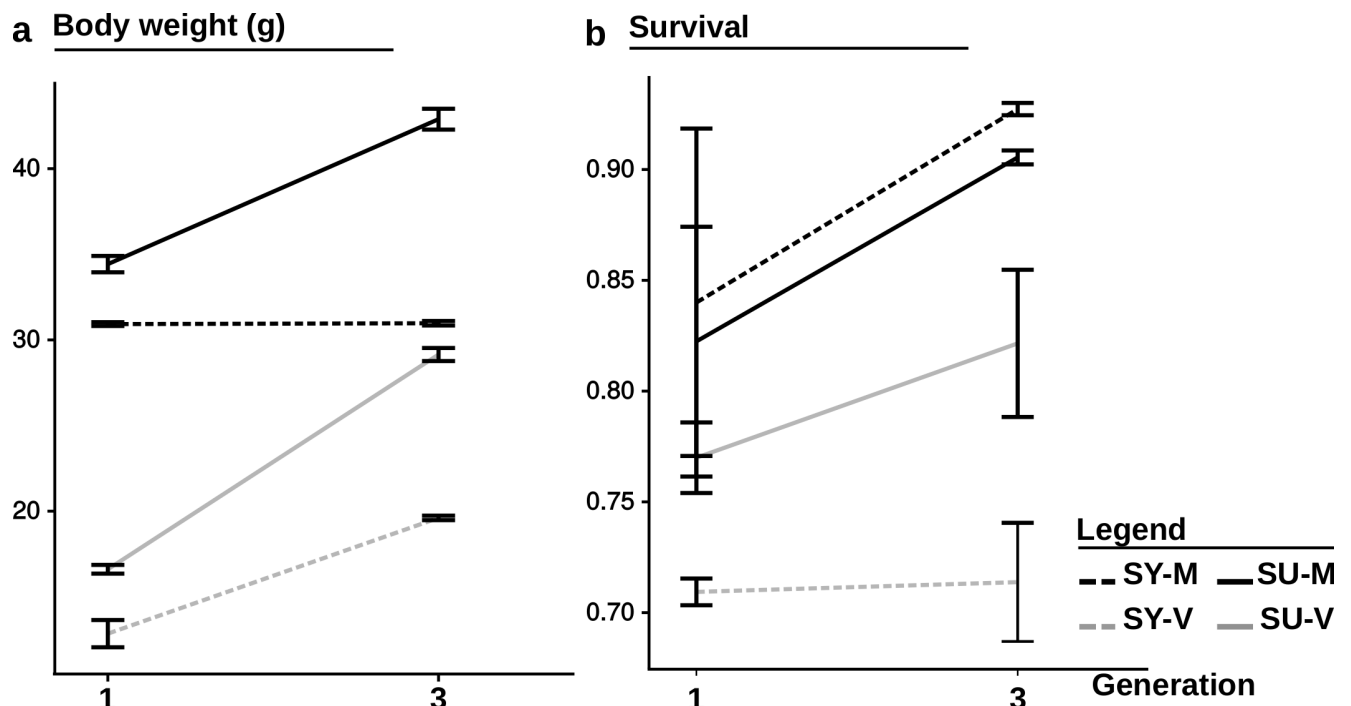


Fig 4. Performance comparison between the first and third generation of selection. Evolution of (a) mean body weights and (b) survival between the first and the third generation of selection for the 4 different conditions (SU-M, SY-M, SU-V and SY-V), at 193 dpf for the first generation, and 197 dpf for the third one.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705.g004>

High genetic progress linked to higher feed intake

To understand the increased growth performance of the selected line, feed intake and feed efficiency (the two main determinants of growth rate), were estimated during a 44-day feeding trial. We found that improved performance was related to a higher feed intake rather than to an improved feed efficiency (Fig 3). The selection significantly improved feed intake, but it was not specific to the V diet and SU fish ate on average 18.2% more than SY fish, irrespective of the diet. This result explains the general genetic gain observed for both SU-M and SU-V, which could suggest a selection on fish with a higher eating capacity. Surprisingly, selected fish fed the V diet ate significantly more than control fish fed the M diet (SU-M), and it cannot be excluded that the selection has also improved fish resilience to plant components. These results support the findings of Yamamoto *et al.* who showed that increased fish performance was attributed to a higher feed intake, irrespective of the diet [24–26]. This result highlights the fact that acceptance of the plant-based diet is a major step impeding the replacement of fish oil and fishmeal, and can be significantly improved by selection.

Selection has indirect consequences on feed efficiency, starch digestibility, protein retention and EPA/DHA content

The observed trend toward a reduced feed efficiency in the SU line was opposite to what we would have expected. Yet, the selection seems to slightly improve the lipid and starch digestibility. The differences with respect to the digestibility of lipids seem too small to have had any biological impacts (+0.5%). The starch digestibility was significantly improved in SU fish when fed the M diet (+1.3%, P-value<0.001), but no difference was observed when fish were fed the

V diet (P-value = 0.13). rainbow trout, like other carnivorous fish, digested starch poorly due to the low activity of the alpha-amylase [52]. However, experimental diets were formulated with gelatinized starch, and starch digestibility was already high. This result is thus quite surprising. Measurement of alpha-amylase activity between the two lines should be performed to determine if it is responsible for the improvement in the digestibility of starch.

In contrast, the selection negatively affected the overall protein retention and the SU-M tended to retain 4.2% less protein than SY-M (P-value = 0.06). Surprisingly protein retention was not affected when fish were fed the V diet (P-value = 0.24). In contrast, Overturf *et al.* found an improvement of protein retention in their selected line of rainbow trout in comparison with the control one after 4 generations of selection [23], linked in part to the improvement of ANFs tolerance [53]. In the present study, protein retention was affected when fish were fed the M diet, and thus the observed differences were not only a result of the potentially negative impact of ANFs on the intestine. Thus, the differences between the selected and the control lines are not yet explained.

Finally, the selection did not counteract the well-known effects of the V diet on the FA profile, nor the whole fish lipid content. But, the selection did negatively impact the proportion of EPA and DHA in the whole body of SU-V fish as well as the EPA content of SU-M fish. These two FA play essential roles and EPA or DHA deficiencies are known to affect growth in rainbow trout [54]. In addition to being used as a source of energy like other fatty acids, EPA is a precursor for eicosanoids, whereas DHA plays important structural and functional roles in cell membranes [55]. When fish are fed a plant-based diet, the use of EPA for energy production is usually restrained [56].

First, selection could have negatively affected SU fish EPA and DHA biosynthesis capacity, in contrast to what would have been expected as SU-V fish growth improved. Second, the selection could have impacted the level of EPA used for energy production. However, our experimental design does not make it possible to answer this question. EPA and DHA are beneficial for the human consumer, as these two FA play various important roles in human health [57]. A finishing period where fish are fed a marine resources-based diet are considered to restore EPA and DHA levels in fish [6]. It is thus essential to test whether the selection affected the capacity to biosynthesize these FA for both those fish fed the V diet as well as the classic marine resource-based diet. Further analyses are first needed after further generation of selection to confirm this result, and second to test both the expression and activity of elongase and desaturase, enzymes responsible for EPA and DHA synthesis and whole fish EPA and DHA content for fish at market size. Finally, these results highlight the importance to take into account n-3 PUFA profile during breeding program, as previous studies had shown that it is a highly heritable trait in salmon [58].

Conclusion

The results obtained for the third generation rainbow trout selected for their growth on a V diet confirm that selection has successfully improved both the mean body weight and survival of the selected versus control fish fed the V diet. SY-V fish now reach the same final body weight as control fish fed the M diet.

In the present study, we were able to attribute the better growth performance of the selected line to a higher feed intake. This result confirms that acceptance of a plant-based diet, one of the major steps impeding the total replacement of marine ingredients, can be improved by selection [26]. The reluctance of fish to eat plant-diets remains poorly understood. Hence, the potential to lower sensitivity to plant-diet components through selection, leading to higher feed intake, requires further investigation. The two lines used in this study are a good models to work on.

Aside from feed intake, the selection had a limited effect on other nutritional traits in comparison with the diet effect. But the effect of the selection will increase with generations of selection, while the dietary effect should remain stable. It is therefore essential to carefully monitor its consequences such as the EPA/DHA biosynthesis capacity, but also its consequences on traits which were affected by the selection only when fish were fed the M diet (protein retention and starch digestibility).

Finally, the feed intake of the selected line was improved similarly when fish were fed the M or the V diets. Our study did not allow us to identify a specific nutritional trait that was significantly improved when fish were fed the V diet only, which could explain the higher genetic gain recorded for those fish. Other traits such as the immune parameters or the microbiota should also be explored in future generations as they are also known to influence the performance of fish fed a plant-based diet.

Supporting information

S1 File. ARRIVE guidelines checklist.
(PDF)

Acknowledgments

We thank F. Sandres and F. Terrier for manufacturing the experimental diets (INRA, Donzaq, France), and J. Almany for language editing.

Author Contributions

Conceptualization: Françoise Médale, Edwige Quillet, Mathilde Dupont-Nivet.

Formal analysis: Thérèse Callet, Laurence Larroquet, Anne Surget, Pierre Aguirre.

Funding acquisition: Françoise Médale, Mathilde Dupont-Nivet.

Investigation: Thérèse Callet, Laurence Larroquet, Anne Surget, Pierre Aguirre, Thierry Kerneis, Laurent Labbé.

Project administration: Mathilde Dupont-Nivet.

Supervision: Françoise Médale.

Validation: Françoise Médale, Mathilde Dupont-Nivet.

Visualization: Thérèse Callet.

Writing – original draft: Thérèse Callet.

Writing – review & editing: Françoise Médale, Edwige Quillet, Inge Geurden, Sandrine Skiba-Cassy, Mathilde Dupont-Nivet.

References

1. Fisheries, FAO. Aquaculture Department (2016) The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.
2. Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 2000; 405(6790):1017–1024. <https://doi.org/10.1038/35016500> PMID: 10890435
3. Tacon AG, Hasan MR, Metian M. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. 2011;.
4. Cashion T, Le Manach F, Zeller D, Pauly D. Most fish destined for fishmeal production are food-grade fish. *Fish and Fisheries*. 2017;.

5. Tacon AG, Metian M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*. 2008; 285(1):146–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
6. Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. 2009; 1(1):10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
7. Collins SA, Øverland M, Skrede A, Drew MD. Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*. 2013; 400:85–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.006>
8. Medale F, Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Quillet E, Aubin J, Panserat S. Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. *INRA Productions animales*. 2013; 26(4):303–315.
9. Panserat S, Hortopan G, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, et al. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*. 2009; 294(1):123–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.013>
10. Drew MD, Ogunkoya AE, Janz DM, Van Kessel AG. 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*. 2007; 267(1):260–268. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.002>
11. Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. The lipids. *Fish nutrition*. 2002; 3:181–257.
12. Kamalam BS, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*. 2016; <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>
13. Francis G, Makkar HP, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. 2001; 199(3):197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
14. Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*. 2007; 38(6):551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
15. Krogdahl A, Penn M, Thorsen J, Refstie S, Bakke AM. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*. 2010; 41(3):333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
16. Refstie S, Helland SJ, Storebakken T. Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 1997; 153(3):263–272. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00025-2)
17. Gjedrem T, Robinson N, Rye M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*. 2012; 350:117–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.008>
18. Palti Y, Silverstein JT, Wieman H, Phillips JG, Barrows FT, Parsons JE. Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2006; 255(1):548–556. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.029>
19. Quinton CD, Kause A, Koskela J, Ritola O. Breeding salmonids for feed efficiency in current fishmeal and future plant-based diet environments. *Genet Sel Evol*. 2007; 39:431–446. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-39-4-431> PMID: 17612482
20. Pierce LR, Palti Y, Silverstein JT, Barrows FT, Hallerman EM, Parsons JE. Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype × diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2008; 278(1):37–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.017>
21. Le Boucher R, Quillet E, Vandeputte M, Lecalvez JM, Goardon L, Chatain B, et al. Plant-based diet in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): Are there genotype-diet interactions for main production traits when fish are fed marine vs. plant-based diets from the first meal? *Aquaculture*. 2011; 321(1):41–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.010>
22. Dupont-Nivet M, Médale F, Leonard J, Le Guillou S, Tiquet F, Quillet E, et al. Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fish-meal at early growth. *Aquaculture*. 2009; 295(1):15–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.031>
23. Overturf K, Barrows FT, Hardy RW. Effect and interaction of rainbow trout strain (*Oncorhynchus mykiss*) and diet type on growth and nutrient retention. *Aquaculture Research*. 2013; 44(4):604–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03065.x>
24. Yamamoto T, Okamoto H, Furuita H, Murashita K, Matsunari H, Iwashita Y, et al. Growth performance and physiological condition of F1 amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* juveniles obtained

- from broodstock with selective breeding for growth on a low fish-meal diet. *Fisheries Science*. 2014; 80(3):569–579. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0707-0>
25. Yamamoto T, Murashita K, Matsunari H, Oku H, Furuita H, Okamoto H, et al. Selectively bred juvenile F2 amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* fed a low fishmeal diet exhibit growth comparable to unselected juveniles fed a fishmeal-based diet. *Fisheries Science*. 2015; 81(1):83–93. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0817-8>
 26. Yamamoto T, Murashita K, Matsunari H, Oku H, Furuita H, Okamoto H, et al. Amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* juveniles selectively bred for growth on a low fishmeal diet exhibit a good response to the low fishmeal diet due largely to an increased feed intake with a particular preference for the diet. *Aquaculture*. 2016; 465:380–386. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.030>
 27. Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, Kerneis T, Goardon L, Labbe L, et al. Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PloS one*. 2012; 7(9):e44898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044898> PMID: 23028667
 28. Lazzarotto V, Corraze G, Leprevost A, Quillet E, Dupont-Nivet M, Médale F. Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PloS one*. 2015; 10(2):e0117609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117609> PMID: 25658483
 29. Thivend P, Mercier C, Guilbot A. Determination of starch with glucoamylase. *Methods in carbohydrate chemistry*. 1972; 6:100–105.
 30. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol Chem*. 1957; 226(1):497–509. PMID: 13428781
 31. Shantha N, Ackman R. Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n—3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1990; 533:1–10. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82182-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82182-9)
 32. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; 2015. Available from: <https://www.R-project.org/>.
 33. The National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press; 2011.
 34. Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*. 1995; 130(2):177–186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6)
 35. Espe M, Lemme A, Petri A, El-Mowafi A. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture*. 2006; 255(1):255–262.
 36. Torstensen B, Espe M, Sanden M, Stubhaug I, Waagbø R, Hemre GI, et al. Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture*. 2008; 285(1):193–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.025>
 37. Geurden I, Cuvier A, Gondouin E, Olsen R, Ruohonen K, Kaushik S, et al. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & behavior*. 2005; 85(2):107–114. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.03.010>
 38. De Francesco M, Parisi G, Médale F, Lupi P, Kaushik SJ, Poli BM. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2004; 236(1):413–429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.006>
 39. Burel C, Boujard T, Corraze G, Kaushik SJ, Boeuf G, Mol KA, et al. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture*. 1998; 163(3):325–345. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00241-5)
 40. Kaushik S, Coves D, Dutto G, Blanc D. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 2004; 230(1):391–404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)
 41. Caballero M, Obach A, Rosenlund G, Montero D, Gisvold M, Izquierdo M. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 2002; 214(1):253–271. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00852-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00852-3)
 42. Bell JG, Tocher DR, Henderson RJ, Dick JR, Crampton VO. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of nutrition*. 2003; 133(9):2793–2801. PMID: 12949367

43. Bell JG, Henderson RJ, Tocher DR, Sargent JR. Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids*. 2004; 39(3):223–232. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1223-5> PMID: 15233400
44. Torstensen BE, Bell JG, Rosenlund G, Henderson RJ, Graff IE, Tocher DR, et al. Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(26):10166–10178. <https://doi.org/10.1021/jf051308i> PMID: 16366711
45. Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*. 2003; 11(2):107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>
46. Gjedrem T, Kolstad K. Development of breeding programs for aquatic species should be given high priority. *World Aquaculture*. 2012; 43(3):10.
47. Kincaid H, Bridges W, Von Limbach B. Three generations of selection for growth rate in fall-spawning rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*. 1977; 106(6):621–628. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1977\)106%3C621:TGOSFG%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1977)106%3C621:TGOSFG%3E2.0.CO;2)
48. Kause A, Ritola O, Paananen T, Wahlroos H, Mäntysaari EA. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2005; 247(1):177–187. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.023>
49. Janhunen M, Kause A, Vehviläinen H, Järvisalo O. Genetics of microenvironmental sensitivity of body weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for improved growth. *PLoS one*. 2012; 7(6): e38766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038766> PMID: 22701708
50. Leeds TD, Vallejo RL, Weber GM, Gonzalez-Pena D, Silverstein JT. Response to five generations of selection for growth performance traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2016; 465:341–351. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.036>
51. Le Boucher R, Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Quillet E, Ruelle F, Vergnet A, et al. Genotype by diet interactions in European sea bass (*L.*): nutritional challenge with totally plant-based diets. *Journal of animal science*. 2013; 91(1):44–56. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5311> PMID: 23100583
52. Bergot F, Breque J. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture*. 1983; 34(3–4):203–212. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90203-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90203-X)
53. Venold FF, Penn MH, Krogdahl Å, Overturf K. Severity of soybean meal induced distal intestinal inflammation, enterocyte proliferation rate, and fatty acid binding protein (Fabp2) level differ between strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2012; 364:281–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.035>
54. Glencross BD. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*. 2009; 1(2):71–124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>
55. Tocher DR. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*. 2010; 41(5):717–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>
56. Turchini GM, Francis DS. Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and β -oxidation) in rainbow trout fed fish oil-or linseed oil-based diets. *British Journal of Nutrition*. 2009; 102(1):69–81. <https://doi.org/10.1017/S0007114508137874> PMID: 19123959
57. Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2000; 71(1):171S–175S. PMID: 10617967
58. Leaver MJ, Taggart JB, Villeneuve L, Bron JE, Guy DR, Bishop SC, et al. Heritability and mechanisms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid deposition in the flesh of Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2011; 6(1):62–69.

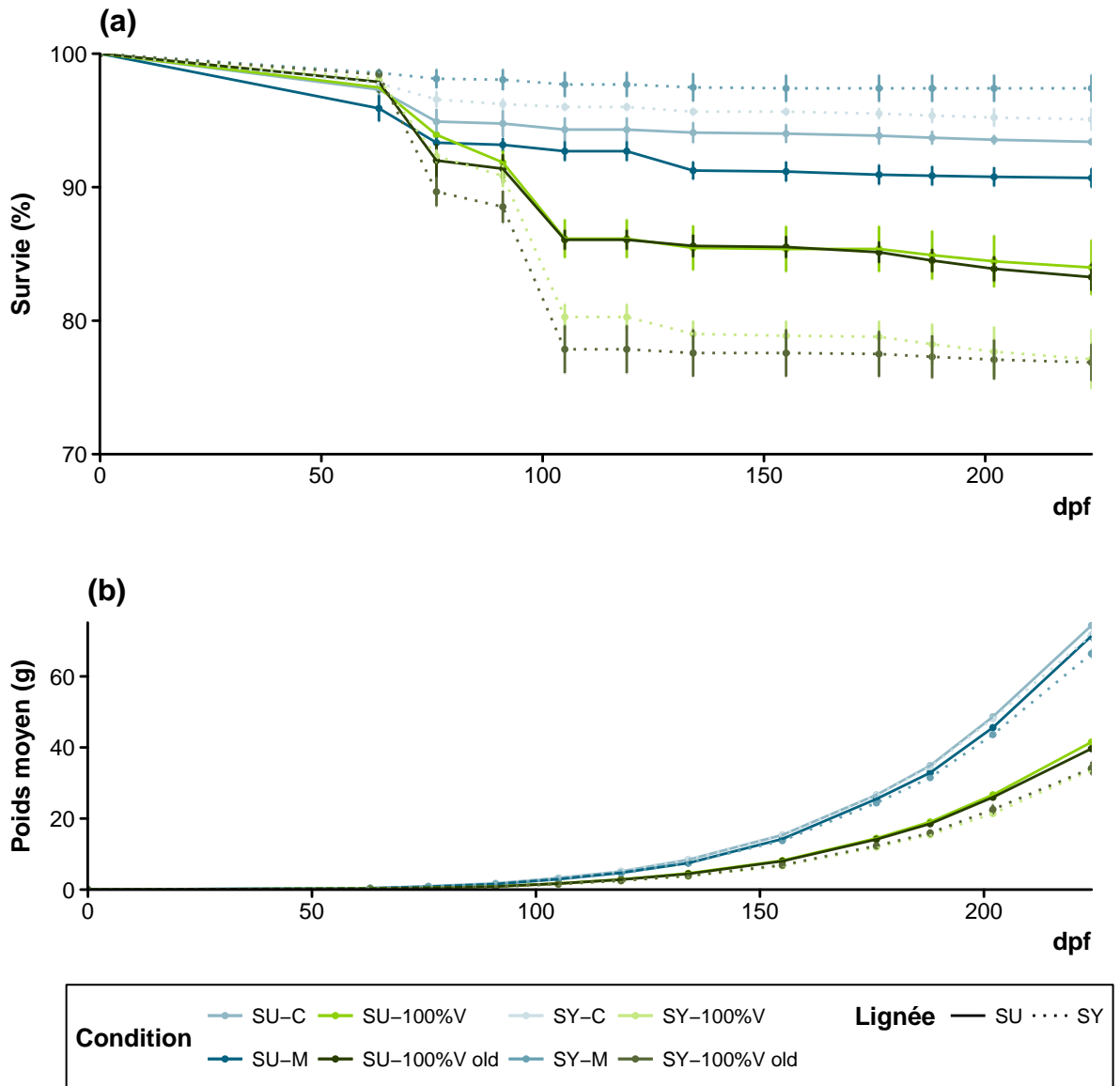


FIGURE 8.1 – (a) Taux de survie et (b) poids moyens des deux lignées, témoin (SY, ligne pointillée) et sélectionnée (SU-2, ligne pleine) après deux générations de sélection, nourries avec un aliment M, un aliment commercial C ou des aliments 100 % V (V et V-old, formulé sans attractant).

Publication : les principaux résultats en RS3

- **L'aliment 100% V** a négativement affecté les performances des poissons SY et SU-3. La survie et le poids moyen des poissons SY-V étaient en moyenne 23,0% et 36,8% inférieurs à ceux des poissons SY-M à 197 dpf.
 - La diminution simultanée de la prise alimentaire (-10,5%), de l'efficacité alimentaire (-7,1%), de la digestibilité des lipides (-2,0%) et de l'amidon (-7,0%) et de la rétention des protéines (-19,5%) étaient à l'origine des baisses de performances des poissons nourris avec l'aliment 100% V.
- **La sélection** a permis d'améliorer, à la fois la survie et la croissance des poissons. Pour la survie, aucune différence n'a été détectée entre les poissons SU-3-M et SY-M. Concernant les poissons nourris avec l'aliment V, les taux de survie ont chuté à partir de 78 dpf, mais plus faiblement chez les poissons sélectionnés SU-3-V. Dès le début de l'expérimentation et jusqu'à la fin de l'expérimentation, les poids moyens des poissons SU-3-M et SU-3-V étaient significativement supérieurs à ceux des poissons non sélectionnés SY-M et SY-V, respectivement. De façon remarquable, les poissons SU-3-V ont rattrapé les poissons témoins SY-M en terme de croissance, puisqu'aucune différence significative de poids n'a été révélée lors de cette expérimentation.
 - Les meilleures performances des poissons SU-3 ont été attribuées à une augmentation de la quantité d'aliment consommé, quel que soit l'aliment distribué. Aucun caractère liés à la nutrition (digestion, rétention) n'a été amélioré par la sélection.
 - La sélection a cependant diminué les proportions d'EPA et de DHA des poissons SU-3-V, ainsi que la quantité totale d'EPA des poissons SU-3-M, en comparaison de celles des poissons SU-3-M et SY-M, respectivement.

8.2 Résultats complémentaires : efficacité de la sélection après deux et quatre générations de sélection

8.2.1 Seconde génération de sélection

En seconde génération, les taux de survie et la croissance des poissons témoins (SY) et sélectionnés (SU-2), nourris avec les aliments expérimentaux M, C, V et V_{old} sont présentés dans la figure 8.1 (Détails des analyses statistiques en annexe xvi et xvii).

L'utilisation d'aliments 100% V (V ou V_{old}) a négativement affecté les performances des poissons SY et SU-2. La survie et le poids moyen des poissons SY-V étaient en moyenne 20,8% et 50,9% inférieurs à ceux des poissons SY-M à 202 dpf. Aucune différence n'a été détectée, ni pour les taux de survie, ni pour les poids moyens, entre les poissons SY-M et SY-C, tout au long de l'expérimentation. Les performances de survie et de croissance des poissons nourris avec l'aliment M, très riche en HP et en FP, sont donc comparables à celles des poissons nourris avec un aliment commercial. De façon similaire, aucune différence n'a été révélée entre les poissons SY-2- V_{old} et SY-V au cours des 6 mois d'alimentation.

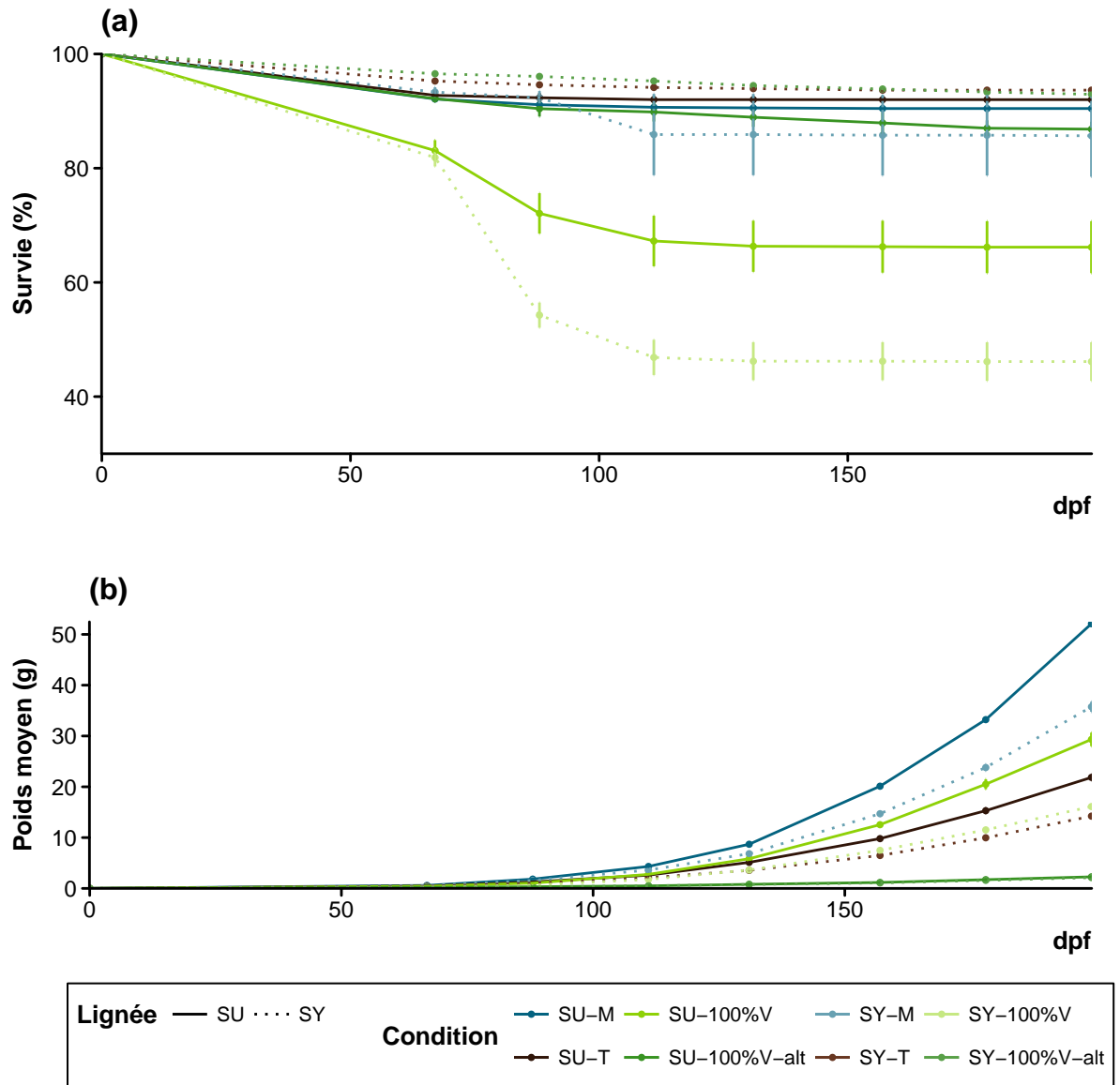


FIGURE 8.2 – (a) Taux de survie et (b) poids moyens des deux lignées, témoin (SY, ligne pointillée) et sélectionnée (SU-4, ligne pleine) après quatre générations de sélection, nourries avec un aliment M, un aliment 100 % V ou deux aliments alternatifs T et V_{alt} .

La sélection a permis d'améliorer la survie et la croissance des poissons, mais de façon différente selon l'aliment distribué.

- Lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment C, aucune différence n'a été détectée entre les poissons SU-2-C et SY-C, ni pour la survie, ni pour le poids moyen.
- Lorsque les poissons étaient nourris avec l'aliment M, les taux de survie des poissons SU-M étaient, de façon surprenante significativement inférieurs à ceux des poissons sélectionnés SY-M. Aucune différence entre les poids moyens des poissons SU-2-M et SY-M n'a été détectée au cours de l'expérimentation.
- Lorsque les poissons étaient nourris avec les aliments V et V_{old} , les taux de survie ont chuté à partir de 76 dpf, mais de façon moindre pour les poissons sélectionnés SU-2-V et SU-2- V_{old} . Finalement, les poids des poissons SU-2-V et SU-2- V_{old} étaient en moyenne supérieurs à ceux des poissons SY-V et SY- V_{old} , respectivement.

8.2.2 Quatrième génération de sélection

En quatrième génération, les taux de survie et la croissance des poissons témoins (SY) et sélectionnés (SU-4), nourris avec les aliments expérimentaux M, V, T et V_{alt} sont présentés dans la figure 8.2 (Détails des analyses statistiques en annexe xviii et xix).

L'utilisation d'aliment sans HP ni FP (100% V, V_{alt} et T) a négativement affecté les performances des poissons SY et SU-4.

- Lorsque les poissons témoins ont été nourris avec l'aliment 100% V, leurs poids moyens étaient en moyenne 54,9% inférieurs à ceux des poissons SY-M à 199 dpf. Lors de cette expérimentation, la survie des poissons nourris avec l'aliment V a chuté de façon importante lors de la phase précoce et le taux de survie des poissons SY-V était très inférieur à celui des poissons SY-M (-40,2%).
- Pour les deux aliments alternatifs, les poids moyens des poissons SY-T et SY- V_{alt} ont également été négativement affectés par l'aliment et ils étaient en moyenne 60,2% et 94,0% inférieurs aux poids des poissons nourris avec l'aliment M à 199 dpf (SY-M). Aucune différence de survie n'a été détectée entre les poissons SY-T, SY- V_{alt} et SY-M.

La sélection a permis d'améliorer la survie et la croissance, mais les résultats dépendent fortement de l'aliment distribué.

- Lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M, aucune différence n'a été détectée entre les taux de survie des poissons SU-4-M et SY-M. Les poids moyens des poissons SU-4-M étaient significativement supérieurs à ceux des poissons SY-M à partir de 111 dpf.
- Lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V, les taux de survie ont chuté à partir de 67 dpf, mais dans une moindre mesure pour les poissons sélectionnés SU-4-V. Dès 64 dpf, les poissons SU-4-V avaient en moyenne un poids supérieur à ceux des poissons SY-V. De plus, pour deux des dates de mesures (157 et 178 dpf), les poissons SU-4-V

ont rattrapé les poissons témoins SY-M en terme de poids. En d'autres termes, aucune différence significative n'a été révélée entre les poids moyens de ces poissons pour ces deux dates. Ce n'est toutefois pas le cas pour les autres dates testées, ainsi les poissons SY-M étaient en moyenne plus gros que les poissons SU-4-V.

- Lorsque les poissons ont été nourris avec les aliments alternatifs, T et V_{alt} , les taux de survie des poissons sélectionnés et des poissons témoins (SU-4-T ; SU-4- V_{alt} et SY-T ; SY- V_{alt}) n'étaient pas significativement différents. Alors que les poids moyens des poissons SU-T étaient significativement supérieurs à ceux des poissons SY-T, aucune différence entre les poissons SU-4- V_{alt} et les poissons SY- V_{alt} n'a été trouvée.

8.3 Discussion

8.3.1 Effet des aliments V et d'autres aliments alternatifs

Bien que l'objectif principal de ces trois expérimentations ait été de tester l'efficacité de la sélection, nous avons également pu approfondir les connaissances sur les effets des aliments V, distribués dès le premier repas, sur la lignée témoin (SY) lors des trois expérimentations.

Effets délétères des aliments V sur la survie et la croissance

Nous avons pu confirmer les effets négatifs des aliments 100% V, notamment sur la survie qui a chuté 60 à 70 jours après le début de l'expérimentation, soit environ une vingtaine de jours après le premier repas, alors que celle des poissons nourris avec un aliment M est restée stable (Callet *et al.* 2017 et figures 8.1 et 8.2). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par Le Boucher *et al.* (2012) et confirme l'intérêt de s'intéresser aux phases précoces de croissance où une discrimination forte s'effectue sur les alevins nourris avec un régime 100%V.

La croissance a également été négativement impactée puisque les poissons de la lignée témoin nourris avec l'aliment 100%V étaient presque deux fois moins gros que les témoins nourris avec l'aliment M à 6 mois (-48,2% en moyenne sur les différentes générations à 6 mois).

Une baisse de la consommation d'aliment semble expliquer en partie la diminution des performances des TAC nourris avec un aliment 100 % V, comme nous l'avons démontré sur les TAC de la troisième génération de sélection. Cependant, les données obtenues après deux générations de sélection (RS2) vont dans un sens inverse puisque l'ajout d'un attractant n'a pas permis d'améliorer ni la survie, ni la croissance des poissons de la lignée témoin.

D'importantes variations entre les années

Bien que la lignée témoin, SY, ait été élevée dans des conditions similaires au fil des ans (pisciculture, température et qualité de l'eau), les performances de cette lignée ont varié de façon importante entre ces trois expérimentations et plus particulièrement quand les poissons ont été nourris avec l'aliment 100%V. Après 6 mois d'alimentation (à 202, 197 et 199 dpf), 77,7%, 71,3%et 46,1% des poissons SY-V avaient survécu et avaient atteint des poids moyens

de 21,4g, 19,6g et 16,1g, après respectivement, deux, trois et quatre générations de sélection (Figure 8.3).

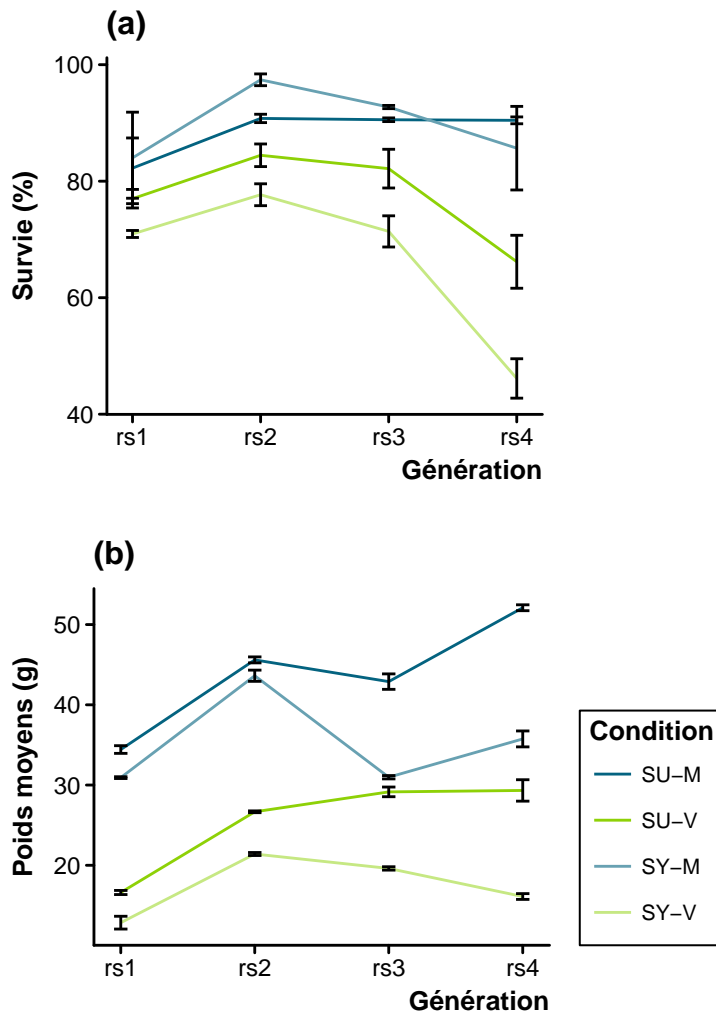


FIGURE 8.3 – Variation des performances de (a) Survie et (b) Croissance pour les quatre générations (à 193, 202, 197 et 199 dpf). Les données après une génération de sélection ont été extraites de la publication scientifique correspondante (Le Boucher *et al.*, 2012).

l'amélioration des aliments (ajout d'attractant), pourraient toutefois également être à l'origine des variations des performances des poissons de la lignée témoin.

Les effets des aliments alternatifs chez les TAC de quatrième génération

Deux aliments alternatifs (T et V_{alt}) ont été testés lors de l'expérimentation RS4 en plus de l'aliment 100% V. La comparaison de leurs effets avec ceux de l'aliment 100% V sur la survie et la croissance a également pu être étudiée.

Chez cette lignée témoin, les reproductions ont été effectuées de façon à maximiser la variabilité génétique et limiter toute sélection au cours du temps. Les différences observées seraient donc attribuables à différents facteurs environnementaux et potentiellement à des facteurs liés à l'aliment, notamment à la qualité des matières premières utilisées qui peut varier d'une année à l'autre. Par exemple, la présence de mycotoxines dans des farines végétales peut fortement affecter la survie des poissons. C'est notamment une des hypothèses proposées pour expliquer la chute des taux de survie des poissons nourris avec l'aliment V lors des phases précoces en RS4 (Figure 8.2).

Les expérimentations effectuées en seconde génération de sélection n'ont pas permis de mettre en évidence des différences entre les performances des poissons SY nourris avec deux aliments V différents (V et V_{old}). Les modifications au cours des générations dans la formule des aliments en raison de problèmes d'approvisionnement et/ou de

La comparaison des taux de survie des poissons SY nourris avec ces deux aliments dépourvus d'HP et de FP avec ceux des aliments 100% V est rendue difficile par les mortalités particulièrement importantes des poissons nourris avec l'aliment 100% V lors de la phase précoce en raison d'une possible contamination par des mycotoxines.

Concernant la croissance, les poids des poissons SY-T étaient inférieurs à ceux des poissons SY-V. Ce résultat est surprenant car l'aliment T est formulé avec des PAT, matières premières riches en protéines digestibles. Des taux excessifs de PAT dans cet aliment (45,0%) ou la présence de chitine dans la farine d'insecte (Henry *et al.*, 2015) pourraient expliquer ces performances décevantes. Avec l'aliment V_{alt} , les poissons n'ont pas grossi et ont atteint seulement 2g après les 6 mois d'alimentation, alors qu'ils consommaient l'aliment normalement d'après les observations visuelles (T.Kerneis, Communication personnelle).

Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires afin d'affiner les connaissances sur ces matières premières alternatives pour tirer profit de leurs qualités nutritionnelles et détecter leurs taux limites d'incorporation.

8.3.2 La sélection a permis d'obtenir une lignée avec de meilleures capacités à survivre et grandir

Efficacité de la sélection

Grâce à ces trois expérimentations, nous avons démontré l'efficacité de la sélection pour la survie et la croissance et confirmons ainsi les résultats obtenus après une seule génération de sélection (Le Boucher *et al.*, 2012).

Concernant la survie, la sélection a permis d'améliorer significativement les performances des poissons nourris avec les aliments 100% V et cela pour chaque génération. Après 6 mois d'alimentation, les taux de survie ont été améliorés de 8,7% et 8,8% pour les aliments V et V_{old} après deux générations de sélection à 202 dpf, de 15,2% après trois générations de sélection à 197 dpf et de 43,4% après quatre générations de sélection à 199 dpf (Figure 8.4).

La sélection a également amélioré les poids moyens de 24,6% et 15,3% pour les aliments V et V_{old} respectivement après deux générations de sélection à 202 dpf, de 48,5% après trois générations de sélection à 197 dpf et de 82,1% après quatre générations de sélection à 199 dpf (Figure 8.5).

Évolution de la sélection

Bien que ces quatre expérimentations successives conduites dans des conditions similaires aient permis de créer un jeu de données original, il est toutefois difficile de comparer les données brutes obtenues pour analyser l'évolution de la sélection. En effet, nous avons prouvé des effets importants de différents facteurs environnementaux sur les performances des poissons de la lignée témoin SY (Figure 8.3, détaillés dans le paragraphe 8.3.1) et en comparant les performances des poissons des lignées sélectionnées entre générations, il est impossible de distinguer les effets de la sélection des effets environnementaux.

Cependant, en faisant l'hypothèse que les deux lignées, SY et SU, ont été affectées de façon similaire par les facteurs environnementaux, la comparaison des progrès génétiques obtenus nous permet d'étudier l'évolution de la réponse à la sélection en supprimant les différences

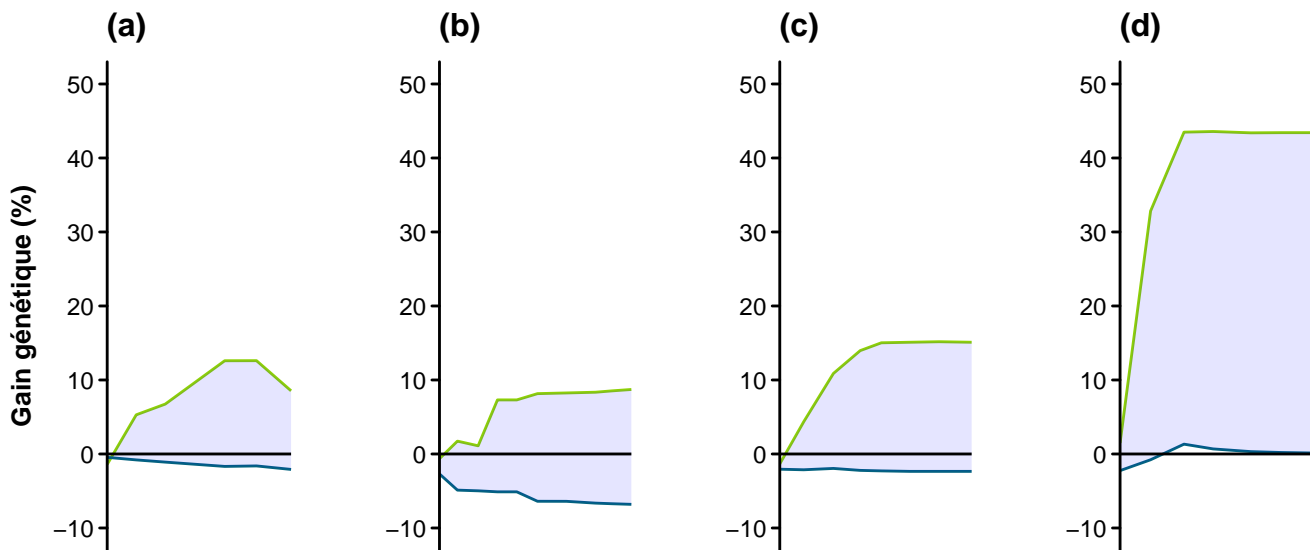


FIGURE 8.4 – Gains génétiques obtenus au cours du temps (de 60 dpf à 200 dpf), **(a)** en RS1 (réponse à la sélection après une génération), **(b)** en RS2, **(c)** en RS3 et **(d)** en RS4 pour la survie. Pour chaque expérimentation, les gains_V sont représentés par la courbe verte, les gains_M par la courbe bleue. La zone grisée entre les deux courbes représente le gain génétique spécifique de l'aliment V. Les données pour RS1 ont été extraites de la publication scientifique correspondante (Le Boucher *et al.*, 2012).

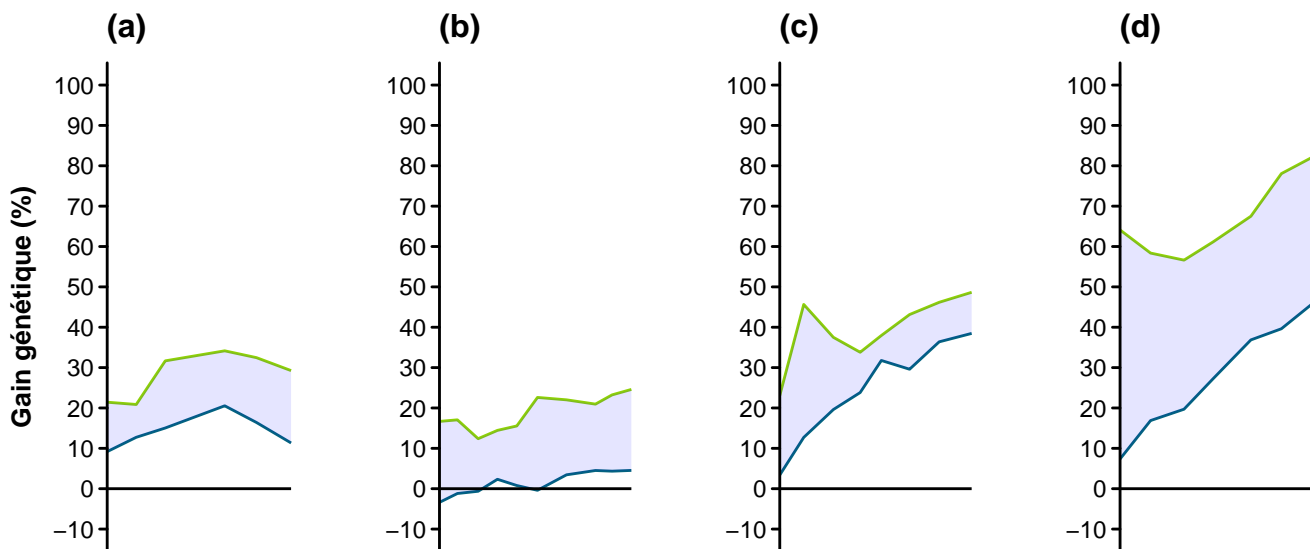


FIGURE 8.5 – Gains génétiques obtenus au cours du temps (de 60 dpf à 200 dpf), **(a)** en RS1 (réponse à la sélection après une génération), **(b)** en RS2, **(c)** en RS3 et **(d)** en RS4 pour le poids moyens. Pour chaque expérimentation, les gains_V sont représentés par la courbe verte, les gains_M par la courbe bleue. La zone grisée entre les deux courbes représente le gain génétique spécifique de l'aliment V. Les données pour RS1 ont été extraites de la publication scientifique correspondante (Le Boucher *et al.*, 2012).

dues à des facteurs environnementaux (Figures 8.4 et 8.5). Nous pouvons ainsi conclure qu'à l'exception de la seconde génération de sélection où les gains génétiques ont été plus faibles en comparaison de ceux obtenus après une seule génération de sélection, les progrès génétiques se sont accumulés au fil des générations de sélection.

Il faut cependant rester prudent dans nos conclusions car, dans le cas où l'hypothèse de départ ne serait pas respectée, les gains génétiques obtenus pourraient être sur-estimés ou sous-estimés. L'augmentation du nombre de générations de sélection permettra d'augmenter l'effet de la sélection et il sera alors plus facile de discerner l'effet de la sélection des effets de l'environnement.

Spécificité de la sélection

Les aliments utilisés en aquaculture évoluent rapidement. Pour cette raison, il est important de s'intéresser à la spécificité de la sélection, afin de discerner si les poissons se sont adaptés spécifiquement à l'aliment utilisé pour la sélection ou s'ils sont également capables de survivre et grandir avec des aliments qui pourront être utilisés dans les années futures.

Survie

Concernant la survie, les gains spécifiques sont très importants (en grisé sur la figure 8.4) et la sélection semble avoir été entièrement spécifique de la composition de l'aliment V (*i.e.* poissons adaptés spécifiquement à cet aliment V). Ce résultat n'est pas surprenant car les taux de survie des poissons nourris avec les autres aliments testés (M, T et V_{alt}) étaient très importants, proches de 95%, et n'ont donc pas pu être améliorés par la sélection.

Croissance

Pour la croissance, une partie de la sélection n'était pas spécifique de l'aliment V puisqu'après trois et quatre générations de sélection, les croissances des poissons nourris avec l'aliment M SU-M ont également été améliorées.

Les gains obtenus avec l'aliment V ont été, cependant plus importants et les gains spécifiques sont positifs. Une partie de la sélection est donc spécifique de l'aliment V. En d'autres termes, les poissons sélectionnés SU ont de meilleures performances que les poissons SY car ils se sont adaptés, en partie, à cet aliment.

Les résultats obtenus après quatre générations de sélection permettent d'affiner les hypothèses proposées lors de l'expérimentation RS3 (Paragraphe 8.1 et Callet *et al.* 2017). En effet, la sélection a également amélioré les performances des poissons nourris avec l'aliment T (Figure 8.6). Bien que ces gains restent inférieurs à ceux obtenus avec l'aliment V (Gains T = 53,6% ver-

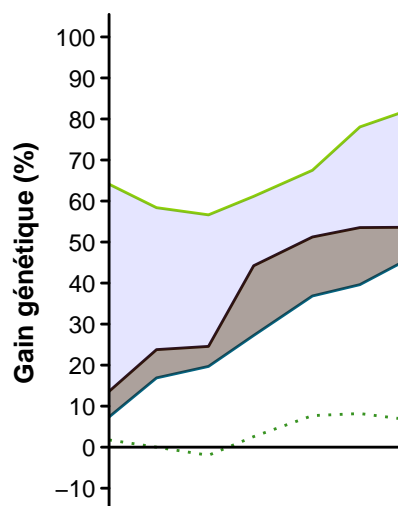


FIGURE 8.6 – Gains génétiques obtenus lors de l'expérimentation RS4 lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M (courbe bleu), avec l'aliment V (courbe verte claire), avec l'aliment T (courbe marron) et avec l'aliment V_{alt} (Courbe verte pointillée). Les zones grisées représentent les gains génétiques spécifiques, avec en gris le gain spécifique pour l'aliment V et en marron le gain spécifique pour l'aliment T.

sus Gains V = 82,1%, à 199 dpf), une part de l'adaptation des poissons SU est donc basée sur la capacité des poissons à se passer d'HP et de FP. Finalement, la sélection n'a que très faiblement amélioré les performances des poissons nourris avec l'aliment V_{alt} (Gain V-alt = 6,7% *versus* Gain V = 82,1%, à 199 dpf), mais ce résultat semble lié à aux effets délétères de l'aliment, qui ne couvre pas les besoins des poissons et ne nous permet donc pas de discuter de la spécificité de la sélection.

8.3.3 Fonctions liées à la capacité à survivre et grandir avec l'aliment 100 % végétal

En analysant différents caractères liés à la nutrition lors de l'expérimentation RS3, il a été possible d'identifier en partie l'origine des progrès génétiques obtenus grâce à la sélection (Paragraphe 8.1 et Callet *et al.* 2017). L'augmentation de la consommation d'aliment, quel que soit l'aliment distribué, explique en partie les meilleures performances de la lignée sélectionnée. La sélection aurait ainsi favorisé des poissons hyperphagiques ou tout du moins de "gros mangeurs" ce qui explique la part non spécifique de l'adaptation à l'aliment (Paragraphe 8.3.2). Ces résultats sont en accord avec les résultats trouvés chez les salmonidés sélectionnés pour leur capacité à grandir avec des aliments pauvres en FP, où la prise alimentaire a également été améliorée (Overturf *et al.*, 2013a; Yamamoto *et al.*, 2014, 2015, 2016). Aucun autre caractère n'ayant été amélioré par la sélection lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V, l'origine des gains spécifiques obtenus avec l'aliment V n'a pas été élucidée à ce jour.

■ ■ ■ Conclusion du chapitre 8

Grâce à ces différentes expérimentations, nous avons pu confirmer l'efficacité de la sélection après deux, trois et quatre générations de sélection. Bien que les très bons résultats obtenus en troisième génération n'aient été que partiellement confirmés après quatre générations de sélection, les analyses des progrès génétiques ont permis de montrer que les progrès génétiques semblent s'être accumulés en troisième et quatrième générations de sélection. La lignée sélectionnée s'est donc rapidement adaptée à l'aliment V. De plus, à la vue des gains spécifiques obtenus, nous confirmons l'importance de sélectionner les TAC sur des aliments V, puisqu'une partie du progrès réalisé est liée spécifiquement à la composition de cet aliment. Bien que l'amélioration de la prise alimentaire explique en partie les meilleures performances des poissons sélectionnés, elle ne permet pas d'expliquer tout le progrès obtenu.

9

La lignée sélectionnée : expression de gènes

L'objectif de cette dernière partie était de comparer les stratégies mises en place chez les deux types de lignées de TAC étudiées, pour grandir avec des aliments V. Pour cela, l'expression de gènes identifiés comme de potentiels marqueurs grâce aux trois lignées isogéniques (Chapitre 6 et 7) et représentatifs des différentes voies trouvées, a été mesurée sur les lignées témoin (SY) et sélectionnée issue de la troisième génération de sélection (SU-3).

9.1 Expression de gènes liés à la perception et à la consommation d'aliment

Après cinq semaines d'alimentation, des gènes liés à la consommation d'aliment ont été trouvés différemment exprimés entre deux des lignées isogéniques (Chapitre 6). Nous avons donc souhaité analyser l'expression de certains de ces gènes chez les lignées témoin (SY) et sélectionnée (SU-3) dont les performances contrastées lorsqu'elles sont nourries avec l'aliment V sont en partie liées à des différences de quantités d'aliment consommé (Paragraphe 8.1). Aucun échantillon n'ayant été prélevé à court terme chez ces lignées (Figure 5.4 dans le chapitre 5), les analyses ont été effectuées sur les ARN extraits des cerveaux prélevés après 6 mois d'alimentation.

Ni l'aliment, ni la sélection n'ont affecté l'expression de ces gènes chez les deux lignées SY et SU après 6 mois d'alimentation (Tableau 9.1).

L'expression de gènes codants pour d'autres neuropeptides connus pour être impliqués dans la régulation de la prise alimentaire a également été mesurée. Seules les expressions de NPY et *Agrp* ont été affectées par la sélection (Tableau 9.2). L'expression de ces deux gènes était en moyenne plus importante chez les poissons sélectionnés.

Chapitre 9. La lignée sélectionnée : expression de gènes

Tableau 9.1 – Résultats des analyses statistiques de l'expression des gènes de la perception et de la régulation de la prise alimentaire, trouvés à 5 semaines, mesurée sur les cerveaux prélevés après 6 mois d'alimentation chez les lignées témoin et sélectionnée (QPCR).

Gènes	Aliment	Sélection	Aliment×Sélection
Prise alimentaire			
POMCB	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
GRM8	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Perception			
ugt2a1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
GNAT3	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Gαq	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Tableau 9.2 – Résultats des analyses statistiques de l'expression de gènes supplémentaires impliqués dans la régulation de la prise alimentaire mesurée sur les cerveaux prélevés après 6 mois d'alimentation chez les lignées témoin et sélectionnée (QPCR).

Gènes	Aliment	Sélection	Aliment×Sélection
CART	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CRF	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
NPY	<i>ns</i>	0,04	<i>ns</i>
POMCA1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Agrp	0,06	0,01	<i>ns</i>

9.2 Expression de gènes liés à différentes voies du métabolisme

Après 6 mois d'alimentation, plusieurs marqueurs de la capacité à utiliser l'aliment V ont été identifiés dans le foie. Un certain nombre était impliqué dans différentes voies du métabolisme des lipides (β -oxydation, lipogenèse, synthèse du cholestérol, synthèse des AGPI-LC), du métabolisme azoté et du métabolisme des glucides. L'expression de gènes de ces diverses voies a également été mesurée sur les ARN extraits des foies prélevés après 6 mois d'alimentation chez les lignées témoin (SY) et sélectionnée (SU-3).

Alors que l'aliment a affecté l'expression d'un grand nombre de ces gènes, la sélection n'a que eu que très peu d'effets (Tableau 9.3). Concernant l'aspartate aminotransferase (**GOT2**), alors que l'aliment V a augmenté son expression chez les poissons de la lignée témoin, l'aliment V l'a diminué chez les poissons de la lignée sélectionnée. Concernant la phosphoenolpyruvate carboxykinase (**PCK1**), premier gène de la néoglucogenèse, alors qu'aucune différence d'expression n'a été détectée entre les lignées lorsqu'elles ont été nourries avec l'aliment M, son expression était moins importante chez les poissons sélectionnés en comparaison des poissons témoins lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V.

9.2 Expression de gènes liés à différentes voies du métabolisme

Tableau 9.3 – Résultats des analyses statistiques de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (lipogénèse : FAS, synthèse des AGPI-LC : ELOVL2-5-6, Δ 6-9, β -oxydation : HOAD, Synthèse d'eicosanoïdes : PTGES2), la synthèse du cholestérol, le métabolisme azoté et la néoglucogénèse (G6pcb2.a, PCK1) mesurée sur les foies prélevés après 6 mois d'alimentation chez les lignées témoin et sélectionnée (QPCR).

Gènes	Aliment	Sélection	Aliment×Sélection
Lipide			
FAS	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
ELOVL 2	<0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
ELOVL 5	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
ELOVL 6	<0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Δ 6	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Δ 9	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
HOAD	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
PTGES2	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Cholestérol			
LXR	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
HMGCS	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
HMGCR	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
FDPS	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
LSS	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
MVD	< 0,05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
EBP	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CYP51A1	< 0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
TM7SF2	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
DHCR24	< 0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Métabolisme azoté			
CDO	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CSAD	<0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
SHMT	<0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
GOT1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
GOT2	<i>ns</i>	<0,05	0,5
SARDH	<0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Glucides			
G6pcb2.a	0,6	<i>ns</i>	<i>ns</i>
PCK1	<0,01	<i>ns</i>	<0,05

9.3 Expression de gènes liés à l'immunité

Que ce soit après 5 semaines ou après 6 mois d'alimentation, les différences de croissance des trois lignées isogéniques étaient liées à des différences d'expression de gènes de l'immunité (Chapitre 6 et 7). L'expression de certains de ces gènes a aussi été mesurée sur les ARN extraits des foies prélevés après 6 mois d'alimentation chez les lignées témoin (SY) et sélectionnée (SU-3) (Tableau 9.4).

Concernant deux des gènes codant pour le Complément C3, leur expression n'a pas été modifiée par l'aliment V chez la lignée témoin, alors que ces deux gènes ont été significativement surexprimés chez la lignée sélectionnée par l'aliment V. Finalement, le gène codant pour le facteur B du complément (CFB-2) a été significativement moins exprimé chez la lignée sélectionnée, quel que soit l'aliment.

Tableau 9.4 – Résultats des analyses statistiques de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire mesurée sur les cerveaux prélevés après 6 mois d'alimentation chez les lignées témoin et sélectionnée (QPCR).

Gènes	Aliment	Sélection	Aliment × Sélection
C3-1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C3-3	<0,01	<i>ns</i>	0,09
C3-4	<0,01	<i>ns</i>	0,09
CFB-1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CFB-2	0,5	<0,01	<i>ns</i>
LCII	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

■ ■ ■ Conclusion du chapitre 9

L'expression de seulement une minorité de gènes, mesurée par qPCR, était significativement différente entre les lignées témoin et sélectionnée. Ces résultats seront mis en parallèle avec les autres résultats trouvés au cours de la thèse dans la discussion générale du manuscrit.

4

Discussion générale

10	Discussion générale	177
10.1	Intérêts et limites	
10.2	Diversité des mécanismes	
11	Conclusion générale et perspectives	193

Dans l'objectif de réduire la dépendance de l'aquaculture envers les matières premières d'origine marine pour assurer le développement durable de la filière, les huiles de poisson (HP) et les farines de poisson (FP) ont progressivement été remplacées par des matières premières végétales (Tacon et Metian, 2008). Afin de réussir la transition vers des aliments moins riches en HP et en FP, notamment pour les salmonidés dont la truite arc-en-ciel (TAC) qui est le poisson le plus produit par l'aquaculture française, deux approches ont été développées au cours du temps.

Des recherches en nutrition ont d'abord été menées afin de faire évoluer les formules avec des taux d'inclusion d'huiles et farines végétales de plus en plus élevés et des taux de HP et de FP de plus en plus faibles (Tacon et Metian, 2008). Plus récemment, des recherches en génétique ont exploré la possibilité de sélectionner des poissons sur leurs performances de survie et de croissance lorsqu'ils sont nourris avec des aliments entièrement composés de produits végétaux (V) et totalement dépourvus de matières premières d'origine marine. Les résultats de ces recherches ont démontré que certains génotypes de TAC sont plus aptes que d'autres à survivre et grandir avec des aliments à forts taux de végétaux (Le Boucher *et al.*, 2012). Cependant, très peu d'études ont cherché à comprendre ce qui différencie ces génotypes.

L'objectif de la thèse était de mettre en évidence les verrous biologiques liés à l'utilisation d'aliments fortement substitués et d'identifier les fonctions et les mécanismes mis en place par les génotypes qui utilisent plus efficacement ces aliments, en combinant des approches de génétique et de nutrition. Pour cela, nous avons étudié, *via* des approches complémentaires (avec ou sans *a priori*), les réponses de différents génotypes de TAC nourries dès leur premier repas avec un aliment 100% V, totalement dépourvu d'HP et de FP. Identifier les fonctions et les mécanismes impliqués dans l'efficacité d'utilisation des aliments V permettrait à la fois d'améliorer les compositions des aliments et de proposer des critères de sélection pour de futurs programmes de sélection.

10.1 Intérêts et limites du protocole expérimental

10.1.1 Deux aliments expérimentaux extrêmes

La majorité de nos études a été conduite avec deux aliments expérimentaux, M et V. Ces deux aliments ont été formulés pour amplifier les contrastes afin (i) d'étudier les verrous liés au remplacement total et conjoint des HP et des FP et (ii) d'accentuer les différences entre les génotypes étudiés :

- **L'aliment M** a été formulé avec des taux élevés d'HP et de FP, qui n'ont plus cours actuellement.
- **L'aliment V** était quant-à-lui complètement dépourvu d'HP et de FP et était composé d'un mélange d'huiles et de farines végétales. L'utilisation de l'aliment 100% V distribué depuis le premier repas reste un défi et particulièrement lors des phases précoces (Le Boucher *et al.*, 2012).

L'aliment 100% V a été formulé pour couvrir les besoins nutritionnels des TAC avec des matières premières de haut de gamme sans se soucier du coût pour pouvoir faire la preuve de concept. Cet aliment n'est donc pas représentatif des aliments aujourd'hui utilisés en aquaculture. Cependant, les résultats de nos études pourront être utilisés dans l'avenir pour améliorer les formules alimentaires. En effet, bien que le remplacement complet ne soit pas un objectif à court terme pour la filière piscicole, les taux de remplacement devront être de plus en plus élevés.

Le choix de travailler avec une substitution conjointe et totale, qui fait l'originalité de nos travaux au niveau international, a aussi rendu compliquée l'interprétation de certains résultats, notamment en raison de potentielles interactions entre les composants alimentaires (Torstensen *et al.*, 2008). Il a ainsi été difficile de distinguer si les mécanismes mis en place par certains génotypes étaient liés au remplacement des FP, des HP ou à leur interaction (Paragraphe 10.2.4).

10.1.2 Deux types de lignées originales

Le travail repose sur l'utilisation de deux types de lignées aux caractéristiques complémentaires, ce qui nous a permis d'explorer les caractéristiques génétiques de réponse à l'aliment V.

Trois lignées isogéniques

Les trois lignées isogéniques étudiées lors de cette thèse ont été choisies en raison de leurs performances de croissance lors d'expérimentations préalables (Dupont-Nivet *et al.*, 2009; Geurden *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2016) : les truites ont des croissances similaires lorsqu'elles sont nourries avec un aliment M, mais des croissances différentes lorsqu'elles sont nourries avec l'aliment V.

Ces caractéristiques ont été confirmées lors des expérimentations à court et long terme de la thèse (Chapitre 7 et 8). Alors que les poissons R23h ont été plus performants à court terme, ceux de la lignée AB1h ont été les plus performants à long terme. Quel que soit le stade de vie,

les poissons de la lignée A22h ont été les moins performants, reflétant ainsi leur faible capacité à grandir avec un aliment V.

L'intérêt majeur de ce matériel biologique est la faible variabilité phénotypique au sein de chaque lignée, ce qui nous a permis de trouver de nombreux gènes, potentiels marqueurs de la capacité à survivre et à grandir avec des aliments V. Ces trois lignées représentent donc un matériel unique et très pertinent pour répondre à l'objectif de la thèse.

Une lignée adaptée à l'aliment V

Notre second modèle biologique est une lignée sélectionnée depuis trois générations pour son aptitude à survivre et grandir avec un aliment 100% V, et une lignée témoin qui nous permet d'évaluer les progrès génétiques.

Nous avons pu constater que les TAC de nos deux lignées avaient des performances contrastées quand elles ont été nourries avec un aliment V (Callet *et al.*, 2017). En plus de posséder deux génotypes avec des performances contrastées, nos travaux ont permis de confirmer la possibilité de sélectionner des TAC sur leur capacité à survivre et à grandir avec des aliments 100% V et de tester l'effet de la sélection sur différents caractères liés à la nutrition.

Après trois générations de sélection, les poissons sélectionnés nourris avec l'aliment V ont atteint un poids équivalent aux poissons témoins nourris avec l'aliment M ce qui montre que les TAC se sont donc rapidement adaptées à l'aliment V. Bien que ces résultats n'aient été retrouvés que partiellement après quatre générations de sélection (Chapitre 8), le fait que la lignée sélectionnée nourrie sans ressources marines ait des performances qui approchent ou égalent celles de la lignée témoin nourrie avec un aliment à base de matières premières d'origine marine est particulièrement encourageant pour la durabilité de la filière aquacole.

La comparaison des réponses de ces différentes lignées (isogéniques, sélectionnée et témoin) est un atout important pour identifier les fonctions majeures de l'adaptation à l'aliment V. Cependant, bien que les poissons des différentes lignées aient été élevés dans des conditions similaires, les poissons des trois lignées isogéniques étaient significativement moins gros que les poissons des lignées témoin et sélectionnée (11,5g à 18,3g *versus* 19,6g à 42,9g, à 6 mois). Ces différences de poids pourraient en partie expliquer les différences de résultats trouvées entre les deux types de lignées.

10.1.3 Différents stades étudiés

L'originalité du protocole repose aussi sur des analyses effectuées à différents stades de vie. En effet, les stratégies mises en place par certains génotypes pour survivre et grandir avec les aliments V pourraient varier au cours des cycles de vie, en lien avec les problématiques auxquelles ils doivent faire face. Nous avons donc étudié les réponses des poissons après 6 mois d'alimentation mais aussi lors de la phase précoce qui n'a été que très peu explorée jusqu'à maintenant.

Phase précoce

De faibles quantités de nourriture sont nécessaires pour nourrir les poissons lors de cette phase

et la substitution n'est donc pas un enjeu crucial d'un point de vue économique et environnemental. Les effets des aliments formulés à base de matières premières végétales n'ont été que très peu étudiés lors de ces phases, le remplacement des HP et FP lors des premières semaines de vie n'étant pas un impératif pour la durabilité de l'aquaculture.

Cependant, les semaines suivant la première prise alimentaire représentent une étape critique dans l'utilisation de ces aliments d'un point de vue biologique. Des diminutions significatives des taux de survie sont notamment observées pendant ces phases (Le Boucher *et al.*, 2012; Callet *et al.*, 2017). De plus, des études antérieures ont montré qu'une exposition précoce à un aliment 100% V améliore les performances ultérieures de ces mêmes poissons lorsqu'ils sont à nouveau nourris avec un aliment V 7 mois plus tard (Geurden *et al.*, 2013). Finalement, c'est au cours de ces phases précoces que les interactions génotype \times aliment sont les plus fortes (Le Boucher *et al.*, 2011).

En raison de la petite taille des alevins, l'étude de ces stades a plusieurs limites. Premièrement, à part la survie et le poids, aucun autre caractère phénotypique ne peut être facilement étudié, notamment la consommation d'aliment qui ne peut être quantifié avec précision. De plus, l'analyse de l'expression des gènes a été réalisée sur des alevins entiers, ce qui peut conduire à une dilution de signal (Détails ci-dessous, paragraphe 10.1.4).

10.1.4 Approches avec ou sans *a priori*

Approches sans *a priori*

Nous avons choisi une approche transcriptomique car elle permet d'avoir une vue d'ensemble des profils d'expression d'un grand nombre de gènes, induit par un régime d'alimentaire à un temps "t" chez différents génotypes en une seule expérimentation et pour un coût raisonnable. Cette méthode sans *a priori* nous permet surtout de ne pas nous limiter à l'étude de l'expression des gènes connus et permet donc d'identifier de nouvelles fonctions et de nouveaux gènes dont l'expression contrastée entre génotypes pourrait influencer leurs performances. Ces analyses ont été effectuées chez les trois lignées isogéniques car au sein de chaque lignée isogéniques, les individus partagent le même génotype. Du fait de cette variabilité génétique intra-lignée nulle, la variabilité intra-lignée d'expression des gènes est limitée. Ces caractéristiques ont permis d'augmenter la puissance statistique de l'étude et nous avons ainsi pu trouver des gènes jamais identifiés auparavant, comme par exemple ceux liés à la perception.

Comme toutes les approches, les analyses du transcriptome ont également des désavantages. Bien que la régulation de la transcription soit une étape importante, des niveaux de régulation post-transcriptionnelle existent également et les différences en termes d'expression de gènes sont une approximation des activités des protéines (Vogel et Marcotte, 2012). Elles ne reflètent donc pas toujours le processus biologique fonctionnel (Ghazalpour *et al.*, 2011). À partir des résultats des niveaux d'expression de gènes seulement, les interprétations biologiques doivent être faites prudemment et s'appuyer sur des caractères phénotypiques liés à la fonction. D'autre part, cette technique n'est pas aussi sensible et reproductible que la qPCR et les résultats des analyses transcriptomiques ne sont pas tous confirmés par des analyses de qPCR.

Une autre limite du travail effectué est l'utilisation d'alevins entiers pour étudier les mécanismes à court terme, plutôt que l'analyse de tissus spécifiques. Nous avons fait le choix de travailler sur des alevins entiers pour avoir une vue exhaustive des modifications induites par les régimes alimentaires chez les différents génotypes. Cette approche au niveau animal entier pourrait toutefois masquer des effets. En effet, pour des gènes différenciellement exprimés dans un seul organe (effet de "dilution") ou pour des gènes dont la régulation de l'expression se fait dans des sens opposés dans différents organes (effet "d'annulation"), des signaux pourraient être perdus (Lazzarotto *et al.*, 2016).

Alors que 3094 gènes ont été trouvés à 5 semaines (alevins entiers), 4283 et 4471 ont été trouvés après 6 mois dans le foie et dans l'intestin, ce qui pourrait confirmer qu'il existe effectivement des effets de "dilution" ou des effets "d'annulation" lorsque des alevins entiers sont utilisés. Cependant, même s'il est moindre à 5 semaines d'alimentation, le nombre de gènes trouvés différenciellement exprimés reste important et l'utilisation d'alevins entiers pour l'analyse du transcriptome est donc pertinente. À notre connaissance, aucune étude n'avait encore été consacrée aux réponses moléculaires des différents génotypes pour utiliser l'aliment V chez les salmonidés lors des phases précoces et notre étude est donc la première à s'y intéresser.

Approches avec *a priori*

Des approches avec *a priori* ciblant directement les fonctions dont on pense qu'elles jouent un rôle dans les différences entre génotypes, ont également été utilisées. Ainsi, des caractères liés à la nutrition ont été étudiés chez nos deux types de lignées. L'expression de certains gènes, identifiés *via* l'étude du transcriptome, a également été mesurée par qPCR chez la lignée sélectionnée et la lignée témoin ce qui nous a permis de comparer les stratégies mises en place chez nos deux types de lignées (isogéniques et sélectionnée).

Les approches "gènes candidats" sont des analyses fiables et précises pour évaluer l'expression des gènes. Elles sont cependant coûteuses en termes de temps, notamment en raison du temps nécessaire pour la conception d'amorces spécifiques. Par rapport au grand nombre de gènes trouvés grâce aux analyses transcriptomiques, le nombre de gènes dont l'expression a été mesurée chez la lignée sélectionnée et la lignée témoin a été limité. De plus, aucun prélèvement à court terme (après 5 semaines d'alimentation) n'avait été effectué chez la lignée sélectionnée et témoin. L'expression de certains des gènes trouvés grâce à l'analyse transcriptomique lors de la phase précoce n'a pas pu être testée chez la lignée sélectionnée et la lignée témoin lors de cette période particulièrement importante.

10.2 Une grande diversité de mécanismes pour grandir avec des aliments V ?

En confrontant les réponses de différentes lignées (isogéniques, sélectionnée et témoin) à un aliment 100% V après 5 semaines et 6 mois d'alimentation, nous avons pu explorer la diversité des mécanismes mis en place chez la TAC pour réussir à survivre et grandir avec ces aliments. Nous avons ainsi pu démontrer l'importance de certaines fonctions.

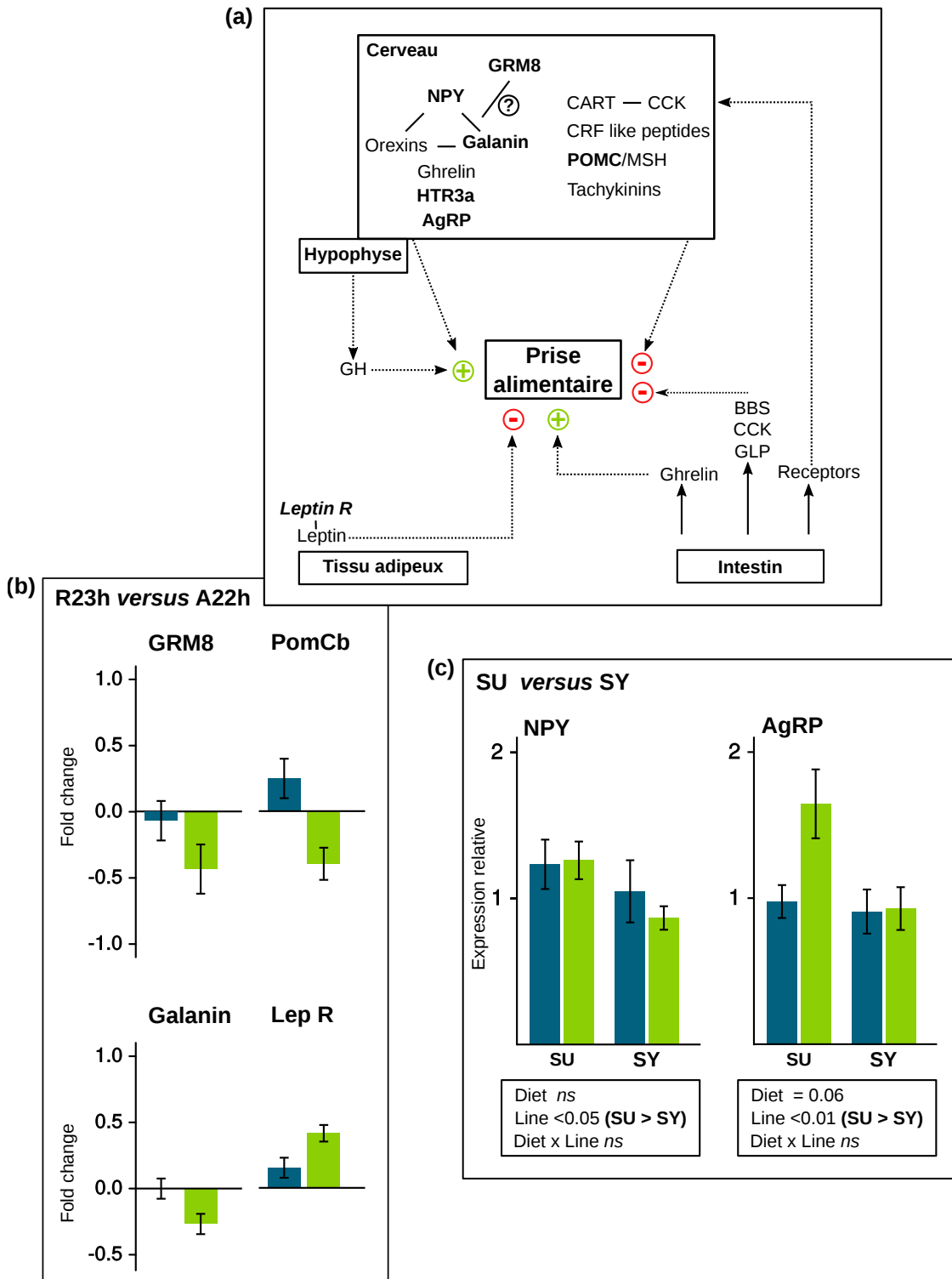


FIGURE 10.1 – Résumé des résultats positifs retrouvés pour la consommation d'aliment lors des différentes expérimentations effectuées pendant la thèse. (a) Schéma récapitulatif des différents facteurs influençant la consommation d'aliment chez les poissons (d'après Volkoff *et al.* 2005). (b) Fold change obtenu entre R23h et A22h pour certains gènes liés à la consommation d'aliment lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M (Bleu) et lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V (Vert), après 5 semaines d'alimentation. (c) Expression relative de deux gènes liés à la consommation d'aliment dans le cerveau après 6 mois d'alimentation, pour les poissons de la lignée sélectionnée (SU) et de la lignée témoin (SY), lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment M (Bleu) et lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V (Vert).

10.2.1 Rôle clef de la consommation d'aliment

Les différents résultats obtenus au cours de la thèse nous incitent à conclure que la consommation d'aliment joue un rôle prépondérant dans la capacité des truites à survivre et grandir avec une alimentation végétale sans ressource marine, notamment lors des phases précoces.

Au cours des phases précoces

L'analyse du transcriptome a permis de révéler des différences d'expression d'un certain nombre de gènes de la perception et de la régulation de la consommation d'aliment chez les trois lignées isogéniques (Chapitre 7 et Figure 10.1). La consommation d'aliment ne peut pas être mesurée directement de façon fiable chez les jeunes stades mais seulement estimée *via* le gain de poids. Cependant, sur la base des données moléculaires et du gain de poids, nous proposons l'hypothèse d'une consommation d'aliment plus importante chez certains génotypes de TAC nourries avec l'aliment V. La raison pourrait être soit une aversion moins grande pour l'aliment V, soit une régulation différente de la consommation d'aliment.

Bien que les croissances des lignées isogéniques aient été significativement différentes, aucune différence de survie n'a été détectée entre les lignées à 75 dpf. La survie des poissons des différentes lignées a chuté seulement à partir de 75 dpf, soit 33 jours après la première alimentation, mais de façon plus importante pour les poissons A22h (Survie A22h = 47,1%, AB1h et R23h = 60,5% à 102 dpf) (Borey *et al.* 2018, *in prep*). La chute de la survie chez ces poissons pourrait être la conséquence d'une consommation d'aliment plus faible. En effet, chez les salmonidés, un retard de la consommation d'aliment est possible sans que cela n'affecte la croissance. Mais, après un certain point (35 jours), à la fois la survie et la croissance des poissons sont significativement affectées (Bilton et Robins, 1973).

Une tendance similaire est observée chez les lignées sélectionnée et témoin puisque la survie des poissons chute également environ 30 jours après le début de l'alimentation mais d'une façon plus importante chez les poissons non sélectionnés. Ces résultats suggèrent également une différence de consommation l'aliment entre les poissons sélectionnés et les poissons témoins qui pourrait alors expliquer la grande différence de poids observée à cette période.

À plus long terme

Après 6 mois d'alimentation, des résultats contraires sont trouvés pour les deux types de lignées étudiées. En effet, chez les lignées isogéniques, des différences de consommation d'aliment ne semblent pas être à l'origine des performances contrastées lorsque elles sont nourries avec l'aliment V (Chapitre 8). Nous ne pouvons cependant pas exclure que des différences de consommation d'aliment à court terme aient pu fortement influencer les performances des poissons à long terme. En effet, bien qu'il ait été prouvé que des phases de croissance compensatrice, période de croissance rapide après une période de jeûne, existent chez les TAC (Ali *et al.*, 2003), le retard du début de l'alimentation chez les salmonidés peut affecter la croissance à plus long terme (jusqu'à 84 jours chez le saumon rouge (Bilton et Robins, 1973)).

Les différences de consommation d'aliment entre les lignées sélectionnée et témoin mesu-

rées entre 153 et 197 dpf suggèrent que les différences de consommation d'aliment soupçonnées à court terme ont persisté à long terme. Les meilleures performances des poissons de la lignée sélectionnée peuvent ainsi être attribuables à une plus forte consommation d'aliment (Callet *et al.*, 2017). Alors que l'expression d'aucun des gènes trouvés grâce aux analyses transcriptomiques à court terme n'était significativement différente entre les poissons des lignées témoin et sélectionnée, des différences ont été détectées pour deux autres gènes impliqués dans la régulation de la consommation d'aliment (Chapitre 9, Tableaux 9.1 et 9.2). Les gènes codants pour les neuropeptides NPY et AgRP étaient plus exprimés chez la lignée sélectionnée (Chapitre 9 et Figure 10.1). Chez les mammifères, ces deux neuropeptides, exprimés par les mêmes neurones de l'hypothalamus situés dans le noyau arqué, ont de très fortes actions orexigéniques, en inhibant les neurones POMC/CART (Figure 10.1). Chez les poissons, alors que l'injection de NPY induit la consommation d'aliment chez la TAC (Aldegunde et Mancebo, 2006), l'effet orexigénique d'AgRP chez les salmonidés n'a pas été démontré clairement (Rønnestad *et al.*, 2017). Les résultats obtenus suggèrent que la sélection a favorisé des poissons hyperphagiques ou tout au moins "gros mangeurs". Bien que l'effet de AgRP sur la prise alimentaire reste à être démontré clairement, ce comportement pourrait résulter de la sur-expression de gènes codant pour des protéines orexigéniques.

L'absence de concordance entre les résultats retrouvés à 5 semaines chez les lignées isogéniques et les résultats trouvés à 6 mois chez les lignées sélectionnée et témoin n'est pas étonnante. En effet, les alevins subissent de nombreux changements morphologiques lors des premières semaines, notamment au niveau des systèmes sensoriels (Youson, 1988; Noakes et Godin, 1988) et au niveau de l'expression de certains des facteurs régulant la consommation d'aliment (Gomes *et al.*, 2015; Kortner *et al.*, 2011). Globalement, le système de régulation de la consommation d'aliment ne semble pas avoir atteint son développement complet lors des phases précoces et un système de régulation différent pourrait être en place lors de ces phases chez les poissons (Rønnestad *et al.*, 2017).

10.2.2 Les étapes de digestion n'influencent que faiblement les performances

Alors que les différences de consommation d'aliment semblent déterminantes pour expliquer les performances contrastées des génotypes de TAC, des différences de capacité à utiliser les aliments V pourraient également en être la cause.

Chez les lignées isogéniques, des différences d'efficacité alimentaire après 6 mois d'alimentation lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V montrent que certains génotypes sont en effet plus aptes à utiliser cet aliment que d'autres (Chapitre 8). Ces différences d'efficacité alimentaire pourraient résulter de différences de sensibilité aux substances à effets anti-nutritionnels présentes dans les aliments V, impactant les étapes de digestion et d'absorption.

En analysant les transcriptomes intestinaux et en mesurant les coefficients d'utilisation digestive, nous avons pu démontrer que les poissons de la lignée R23h pourraient être plus affectés par l'aliment V. Malgré la croissance importante de ces poissons, leur capacité à digérer l'amidon est moindre lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V (Chapitre 8). Ces résultats sont en accord avec d'autres obtenus dans le cadre du projet ANR Agreenfish, qui ont montré que

l'activité de l' α -amylase dans l'intestin et les caeca pyloriques était en effet moindre chez les poissons R23h nourris avec l'aliment V (Borey *et al.* 2018, *in prep*).

L'altération des étapes de digestion et d'absorption des nutriments pourrait provenir d'une détérioration de la structure du tube digestif (TD). Des résultats d'analyses histologiques du TD, elles aussi réalisées dans le cadre du projet Agreenfish, ne montrent cependant pas de différence majeure de la structure du TD des poissons des trois lignées lorsqu'ils sont nourris avec l'aliment V (JH. Lignot, communication personnelle). En effet, mis à part l'épaisseur de l'épithélium moins importante chez AB1h et l'épaisseur de la bordure en brosse plus importante chez A22h dans l'intestin proximal, aucune différence de l'état physiologique de l'épithélium de l'intestin distal n'a été détectée entre les trois lignées nourries avec l'aliment V (JH. Lignot, communication personnelle).

Concernant les deux lignées sélectionnée et témoin, l'efficacité alimentaire était en moyenne inférieure chez les poissons de la lignée sélectionnée. Aucune différence de digestibilité n'a été détectée lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment V (Callet *et al.*, 2017), suggérant que le fonctionnement du TD n'a pas été modifié par la sélection. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les étapes de digestion et d'absorption des nutriments ne représentent donc pas de verrous majeurs pour l'utilisation d'aliments 100% V chez la TAC.

Ces résultats diffèrent des autres études avec des salmonidés sélectionnés sur leur capacité à grandir avec un aliment à base de végétaux puisque dans toutes ces études l'état physiologique de l'intestin distal avait été significativement amélioré grâce à la sélection (Venold *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2016; Abernathy *et al.*, 2017). Cette amélioration de la structure du TD pourrait participer à l'amélioration de son fonctionnement et ainsi conduire à une meilleure utilisation des aliments V. Les différences entre ces études et la nôtre résultent certainement du régime utilisé pour la sélection puisque dans les autres études, seule la FP a été remplacée par des produits végétaux alors que nous avons travaillé avec un régime dépourvu à la fois de farine et d'huile de poisson et contenant relativement peu de soja.

10.2.3 Le métabolisme

Chez les trois lignées isogéniques, les différences d'efficacité alimentaire observées lorsque les poissons sont nourris avec un aliment 100% V, non expliquées par des différences de capacité à digérer et à absorber les nutriments, pourraient provenir de différences dans la régulation du métabolisme. L'analyse du transcriptome à court et long terme, associée à l'étude de différents caractères phénotypiques après 6 mois d'alimentation, est particulièrement appropriée pour étudier cette question.

Métabolisme azoté

À 6 mois, l'expression de nombreux gènes du métabolisme azoté apparaît différente en comparant les transcriptomes hépatiques des trois lignées isogéniques. Parallèlement, une réduction importante de la rétention protéique a été observée chez les lignées sélectionnée et témoin lorsqu'elles ont été nourries avec l'aliment V (Chapitre 8). Ces deux résultats suggèrent un déséquilibre du profil en acides aminés de l'aliment V.

L'expression de certains des gènes trouvés grâce aux analyses transcriptomiques a été mesurée chez la lignée sélectionnée et la lignée témoin mais un seul de ces gènes, GOT2, a été trouvé différentiellement exprimé entre ces deux lignées. Alors que l'expression de GOT2 n'a pas été modifiée par l'aliment V chez les poissons de la lignée sélectionnée, elle a été significativement augmentée chez les poissons de la lignée témoin, comme ce qui avait été observé chez la TAC lors d'un remplacement complet des FP par des farines végétales (Wacyk *et al.*, 2012).

À court terme et à long terme, une modification de l'expression des gènes impliqués dans les voies du métabolisme des acides aminés (AA) soufrés pourrait aussi être impliquée dans les différences de croissance observées (Chapitre 6). La S-adenosylmethionine (SAM), formée à partir de méthionine sous l'action de MAT, est un donneur du groupe méthyl pour de nombreuses molécules (ADN, protéines, ARN, ...). De plus, certains des gènes trouvés différentiellement exprimés sont également impliqués dans la formation de taurine, AA non essentiel synthétisé à partir de la méthionine. Bien que la taurine ne soit pas incorporée dans les protéines, son rôle essentiel pour le fonctionnement du système nerveux, la digestion (formation acide biliaire) et aussi la régulation de certaines voies du métabolisme a été démontré chez les mammifères (Ripps et Shen, 2012; Hoang *et al.*, 2012). Chez les salmonidés, bien que l'effet de la taurine n'ait pas été démontré clairement, il semble que cet AA puisse également impacter diverses voies du métabolisme (Espe *et al.*, 2010, 2012). Les teneurs en AA n'ont pas été mesurées dans nos deux aliments expérimentaux mais les aliments V sont connus pour être pauvres en taurine en comparaison des aliments formulés à base de FP (Liaset et Espe, 2008). Ces différences pourraient donc fortement impacter d'autres voies du métabolisme, à court terme comme à long terme.

Cependant, aucun des gènes impliqués dans la synthèse de taurine n'ont été trouvés différentiellement exprimés entre les deux lignées sélectionnée et témoin après 6 mois d'alimentation (Chapitre 9).

L'ensemble de ces résultats suggère que des différences d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme azoté n'ont pas participé à l'adaptation à l'aliment V de la lignée sélectionnée, alors qu'elles peuvent être impliquées dans les différences observées entre les trois lignées isogéniques.

Métabolisme lipidique

Les voies du métabolisme lipidique (synthèse du cholestérol, lipogénèse, β -oxydation et bioconversion des AGPI-LC) sont les voies dont l'expression des gènes a le plus fortement varié entre les trois lignées isogéniques à long terme (Chapitre 7). Parmi ces voies, la voie de synthèse des AGPI-LC est particulièrement importante car elle permet de produire l'EPA et le DHA qui jouent différents rôles essentiels (production d'énergie pour l'EPA, formation des membranes cellulaires, signalisation, production d'eicosanoïdes) mais qui sont absents des huiles végétales.

L'analyse de l'expression de ces gènes chez les deux lignées, sélectionnée et témoin, était d'autant plus importante que, de façon inattendue, les proportions et les contenus en EPA et en DHA des poissons ont été négativement affectés par la sélection. La sélection pourrait donc avoir altéré les capacités de biosynthèse de ces deux AG et/ou augmenté les quantités d'EPA

oxydées pour la production d'énergie.

De manière surprenante, les résultats d'expression des différents gènes codant pour les désaturases et les élongases, impliqués dans la biosynthèse de ces AGPI-LC, suggèrent très fortement que la capacité de synthèse d'EPA et de DHA n'a pas été modifiée chez la lignée sélectionnée au niveau transcriptionnel, ni lorsque les poissons ont été nourris avec un aliment V, ni lorsqu'ils ont été nourris avec un aliment M.

Chez le saumon, l'existence d'une corrélation forte entre l'abondance des mRNA et l'activité pour la désaturase $\Delta 6$ a été démontrée, mais ce n'est pas le cas pour la désaturase $\Delta 5$ et pour les différentes élongases (Zheng *et al.*, 2005). Les résultats que nous avons obtenus ne permettent donc pas de conclure définitivement sur les capacités de synthèse des poissons sélectionnés puisque des régulations post-traductionnelles pourraient exister pour ces derniers gènes. Il faudrait donc mesurer l'activité de ces enzymes.

D'autres gènes impliqués dans d'autres voies du métabolisme lipidique ont également été retrouvés grâce aux analyses transcriptomiques, dont des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, la lipogenèse et la β -oxydation. Cependant, aucune expression différentielle de ces gènes n'a été détectée entre les deux lignées, sélectionnée et témoin. De plus, la rétention lipidique, qui n'avait été que faiblement diminuée par l'aliment V, n'a pas été améliorée par la sélection. Le métabolisme lipidique ne semble donc pas avoir un rôle incontournable pour l'adaptation à un aliment V des TAC sélectionnées.

Métabolisme des glucides

Les différentes expérimentations effectuées durant la thèse ont permis de montrer qu'il existe une variabilité entre génotypes pour l'expression de gènes du métabolisme glucidique, notamment de la néoglucogenèse, qui pourrait être en lien avec les différences de croissance. Au-delà d'un taux d'environ 20% dans l'aliment, l'amidon provoque chez la TAC une hyperglycémie postprandiale et une altération du métabolisme des glucides qui peuvent négativement impacter les performances de croissance (Hemre *et al.*, 2002). Une altération de la régulation de la néoglucogenèse pourrait en partie être à l'origine de l'hyperglycémie prolongée (NRC, 2011; Marandel *et al.*, 2015). En effet, G6pcb2.a, une copie du gène G6PC impliqué dans cette voie, est sur-exprimée après un repas riche en glucides à l'inverse de ce qui serait attendu puisque cette voie permet de synthétiser du glucose (Marandel *et al.*, 2015).

Certains des gènes de la néoglucogenèse sont différentiellement exprimés entre les différents génotypes étudiés. Concernant les lignées isogéniques, les poissons R23h se distinguent des poissons des deux autres génotypes pour l'expression de la G6pcb2.a et de la PCK1 (Figure 10.2 (a)). Les conclusions sont toutefois difficiles à tirer car les poissons de cette lignée ont une moindre capacité à digérer l'amidon et les différences d'expression des gènes pourraient résulter de la diminution de glucides digérés et donc de la moindre quantité de glucose absorbé (Chapitre 7).

Chez les poissons de la lignée sélectionnée, la régulation de PCK1 n'est pas conforme à ce qui est normalement observé chez la TAC puisque l'expression n'a pas été modifiée lorsque le contenu en amidon a été augmenté (Aliment M). À l'inverse, chez les poissons de la lignée

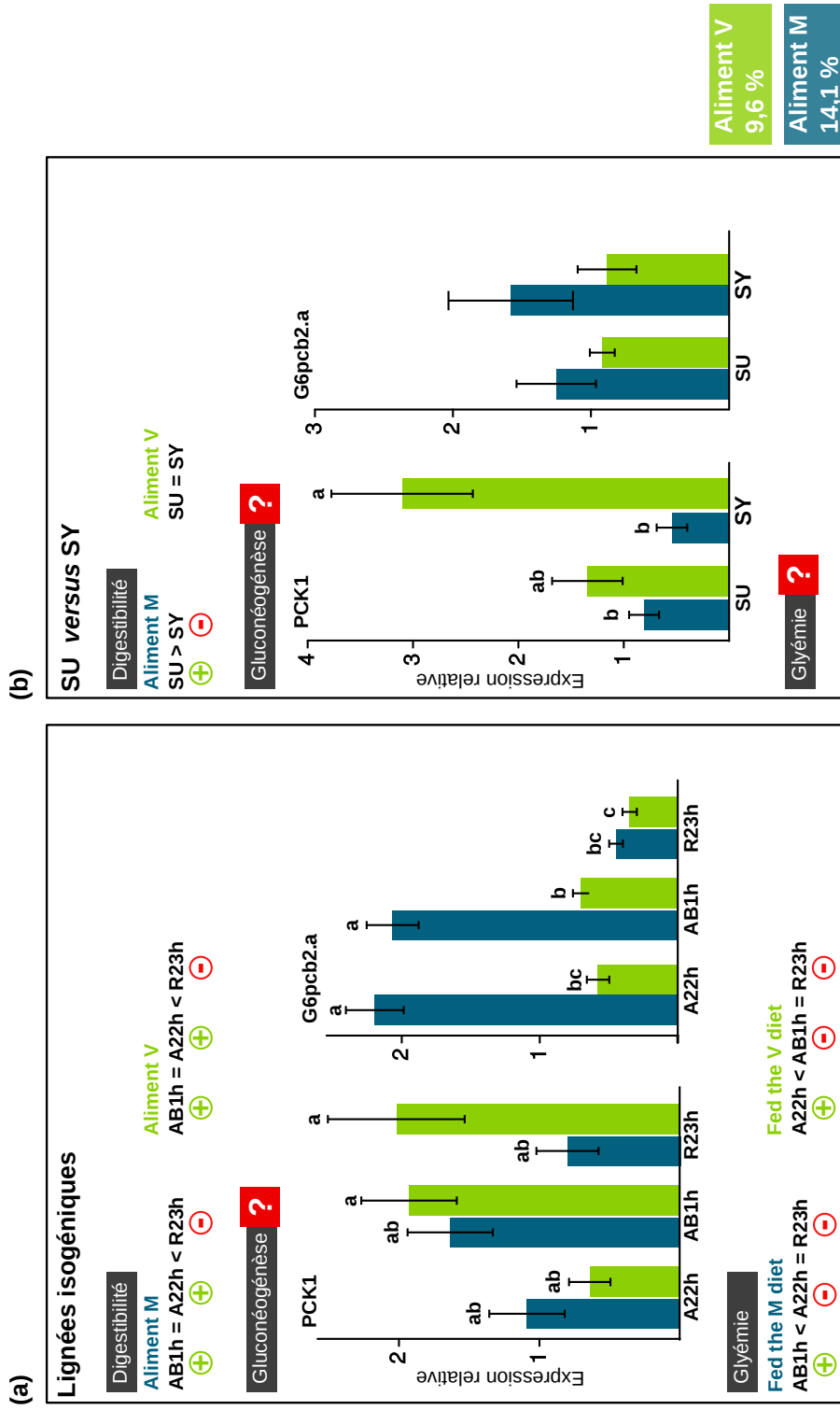


FIGURE 10.2 – Résumé des différents résultats (Digestibilité, qPCR et Glycémie) retrouvés pour le métabolisme des glucides lors des différentes expérimentations effectuées pendant la thèse (a) pour les lignées isogéniques et (b) pour la lignée sélectionnée (SU) et témoin (SY), lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M (Bleu) et lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V (Vert), après 6 mois d'alimentation.

témoin, l'expression de PCK1 a été significativement diminuée (Chapitre 9 et Figure 10.2 (a)). Ces résultats sont surprenants car la diminution de l'expression de ce gène pourrait limiter l'élévation de la glycémie chez ces poissons lorsqu'ils sont nourris avec un aliment riche en glucides et ainsi favoriser la croissance des poissons. Cependant, la glycémie n'ayant pas été mesurée chez ces lignées, des études plus approfondies sont nécessaires pour conclure.

10.2.4 Mécanismes liés à la capacité des poissons à moduler la composante immunitaire

Des différences d'expression chez les deux types de lignées

L'ensemble des résultats des analyses du transcriptome a permis de déduire que l'immunité pourrait contribuer à expliquer les performances contrastées observées entre ces trois lignées isogéniques nourries avec l'aliment V (Chapitre 6 et 7 et Figure 10.3 (a)).

Trois gènes du complément étaient également différentiellement exprimés entre la lignée sélectionnée et la lignée témoin (Chapitre 9 et Figure 10.3 (b)). Ce système joue un rôle clef dans la réponse immunitaire des poissons car il participe à la mise en place de la réponse immunitaire lors de la présence de pathogènes, à leur élimination et à l'initiation de la réponse immunitaire acquise (Boshra *et al.*, 2006). Le complément, composé d'une trentaine de protéines circulant dans le plasma, est divisé en trois voies : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative. L'activation du système de complément par l'une de ces trois voies conduit à l'activation du complément C3 (C3) par clivage, ce qui provoque une cascade de réactions et l'induction de la réponse immunitaire. Le complément B (CFB) participe quant à lui à la voie alternative du complément.

De façon surprenante, le profil d'expression de deux gènes codant pour C3 des poissons sélectionnés, adaptés à l'aliment V, correspond à celui des poissons de la lignée isogénique A22h, poissons ayant la moins bonne croissance avec l'aliment V. Pour ces poissons, l'expression de ces deux gènes a été significativement augmentée avec l'aliment V, suggérant une inflammation (Figure 10.3 (a) et (b)). Concernant le gène codant pour le complément du facteur B, CFB2, son expression n'a pas été influencée par l'aliment V mais la sélection a diminué son expression quel que soit l'aliment distribué (Figure 10.3 (b)).

Nous avons donc démontré lors de cette thèse que la composante immunitaire, notamment les gènes du complément, était impactée différemment en fonction des génotypes. Ces résultats soulèvent deux questions :

- Plusieurs composants de l'aliment V permettent d'expliquer la modulation de l'expression des gènes de l'immunité avec les aliments V, mais comment expliquer que certains génotypes soient plus (ou moins) affectés par l'aliment V ?
- Dans quelles mesures ces différences d'expression de gènes entre génotypes peuvent influencer les performances des poissons ?

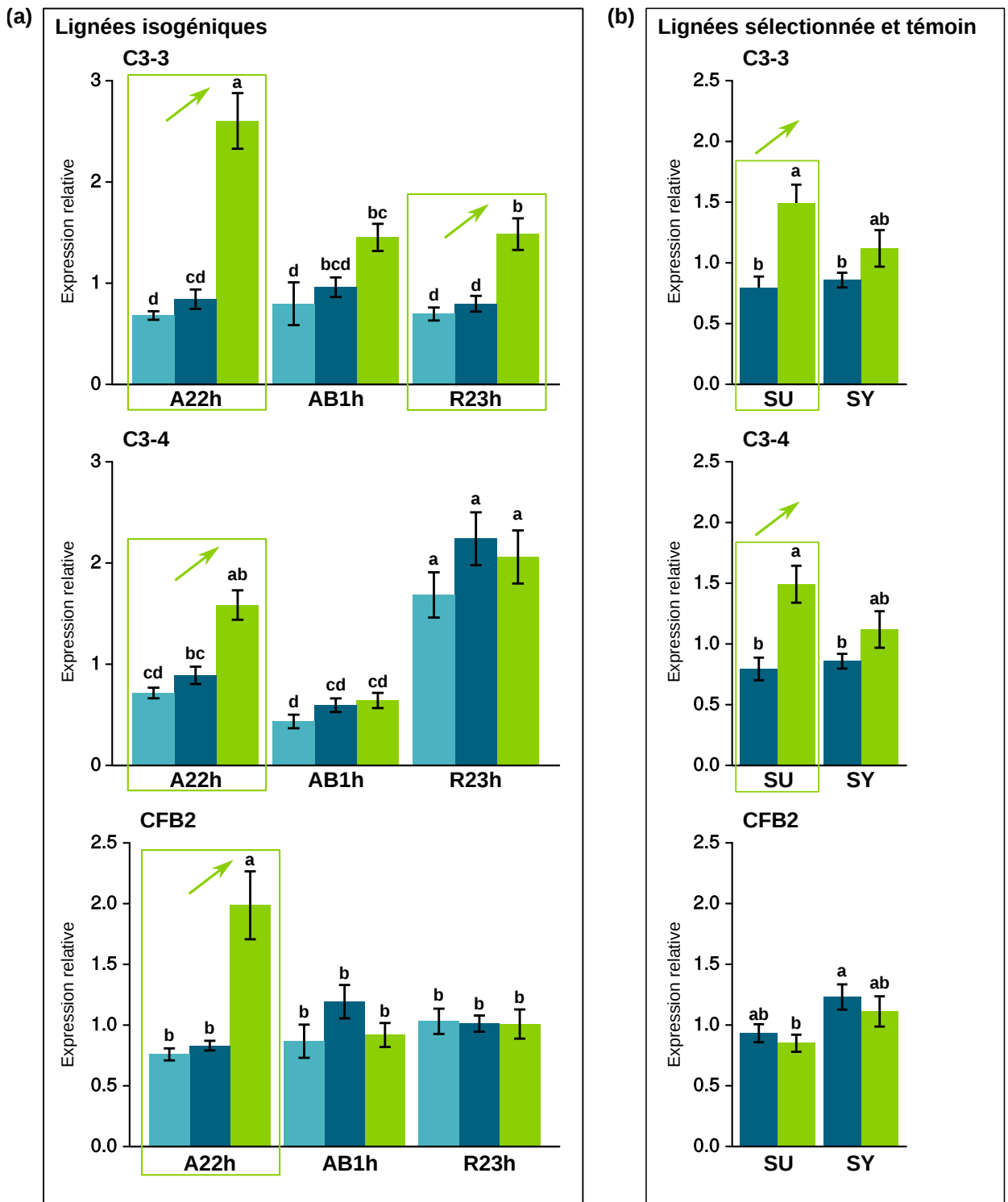


FIGURE 10.3 – Résumé des différents résultats qPCR retrouvés pour les gènes du complément lors des différentes expérimentations effectuées pendant la thèse (a) pour les lignées isogéniques et (b) pour la lignée sélectionnée (SU) et témoin (SY), lorsque les poissons ont été nourris avec l'aliment M (Bleu) et lorsqu'ils ont été nourris avec l'aliment V (Vert), après 6 mois d'alimentation.

L'origine des différences observées entre les génotypes ?

Il est connu que l'alimentation des poissons avec des régimes à base de matières premières végétales d'origine terrestre affecte l'expression de gènes impliqués dans l'immunité en raison de la présence de facteurs anti-nutritionnels dans les farines végétales et/ou de la modification du profil en AG des aliments V (Montero et Izquierdo, 2010; Krogdahl *et al.*, 2015). Les différences d'expression des gènes de l'immunité pourraient donc traduire des capacités divergentes des génotypes à faire face à ces régimes ou à certains de leurs composants.

Chez les lignées isogéniques

Chez les lignées isogéniques, les différences d'expression des gènes de l'immunité dans le foie et l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'EPA et de DHA nous conduisent à conclure que les lignées R23h et AB1h étaient plus aptes à faire face au profil en AG de l'aliment V qui est dépourvu de ces deux AGPI-LC n-3 (Chapitre 7). L'absence de différence d'expression de gènes liés à l'immunité dans l'intestin des trois lignées isogéniques et les faibles différences observées au niveau histologique dans le TD (LH Lignot, communication personnelle) suggèrent que les lignées ne divergent pas sur leur sensibilité aux facteurs anti-nutritionnels.

Chez la lignée sélectionnée

Aucune amélioration de la synthèse d'EPA et de DHA n'a été relevée chez les lignées sélectionnées comme cela avait été le cas pour certaines des lignées isogéniques (Paragraphe 10.2.3). D'autres facteurs pourraient également moduler l'expression des gènes de l'immunité comme la modification du profil en AA, dont certains jouent des rôles clefs dans l'immunité (Oliva-Teles, 2012) ou la modification du microbiote intestinal avec l'aliment V (Gómez et Balcázar, 2007). Ces différents facteurs et leurs interactions devront être explorés à l'avenir.

Quel est l'impact de ces différences sur la survie et la croissance ?

Lors de l'induction d'une réponse immunitaire

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de la modulation de la composante immunitaire sur la résistance à différents pathogènes lorsque les poissons sont nourris avec des aliments V. L'impact du remplacement des HP n'est pas clair : alors que certaines études n'ont pas montré d'effet du remplacement, d'autres ont montré un effet positif ou négatif (Montero et Izquierdo, 2010). De façon similaire, le remplacement des FP peut affecter (Krogdahl *et al.*, 2000) ou non (Bransden *et al.*, 2001) la résistance aux pathogènes. Le remplacement conjoint a été beaucoup moins étudié mais une étude chez le saumon a montré que le remplacement conjoint des HP et des FP pourrait améliorer la réponse immunitaire des poissons confrontés à un virus (Caballero-Solares *et al.*, 2017).

Lors d'une expérimentation réalisée dans le cadre du projet Agreenfish, il a été montré que la résistance à *Flavobacterium psychrophilum* (bactérie responsable de pertes importantes dans les élevages de TAC) a été diminuée lorsque les poissons ont été nourris avec un aliment V. Lorsqu'ils sont nourris avec cet aliment, les poissons de la lignée sélectionnée ont été moins affectés que ceux de la lignée témoin (Dupont-Nivet *et al.*, 2018 *in prep*). Ni l'expression

des gènes de l'immunité, ni les paramètres immunitaires n'ont été mesurés à l'issue de cette infection expérimentale. Cependant, les différences d'expression des gènes du complément C3, rapportées ici (Figure 10.3), pourraient être à l'origine de l'amélioration de la capacité des poissons sélectionnés à résister aux pathogènes. En effet, il a été montré que ce gène est sur-exprimé dans le foie lors d'infection à *Flavobacterium psychrophilum* chez la TAC (Overturf et Lapatra, 2006) et l'étude de deux lignées de TAC, l'une résistante et l'autre sensible, montre que ce gène est plus exprimé chez la lignée résistante (Langevin *et al.*, 2012). L'expression plus importante de C3-3 et C3-4 chez la lignée sélectionnée en comparaison de la lignée témoin lorsqu'elles sont nourries avec l'aliment V pourrait favoriser la résistance et ainsi les performances de cette première en cas d'infection bactérienne.

Lors des phases sans réponse immunitaire

Lors de notre expérimentation, malgré ces différences d'expression des gènes de l'immunité, les paramètres immunitaires mesurés n'étaient pas significativement différents entre les trois lignées isogéniques nourries avec l'aliment V (Chapitre 7). Des résultats similaires sont retrouvés chez les lignées sélectionnée et témoin puisque mis à part le nombre de globules blancs significativement différents entre les lignées (SY-V ≥ SU-V ≥ SU-M = SY-M), aucune autre différence dans les paramètres immunitaires (activité du complément, activité du lysozyme, phagocytose) n'a été détectée (M. Danion, communication personnelle).

Alors qu'il est facile de comprendre que des différences d'expression des gènes liés à l'immunité aient pu favoriser les performances des poissons sélectionnés dans les cas où ils aient été en contact avec des pathogènes (ci-dessus), il est difficile de distinguer dans quelle mesure ces différences d'expression de gènes de l'immunité ont pu impacter la survie et la croissance de la lignée sélectionnée.



11 Conclusion générale et perspectives

En combinant des approches de nutrition et de génétique, le travail de cette thèse a permis d'identifier certaines fonctions pouvant participer à la meilleure capacité de certains génotypes à survivre et grandir avec des aliments 100% V et de constater la grande diversité de stratégies mises en place chez la TAC nourrie avec des aliments 100% V, dépourvus de matières premières d'origine marine. Parmi ces stratégies, certaines semblent génériques car elles ont été retrouvées chez plusieurs génotypes et à différents stades de vies et méritent d'être étudiées plus précisément.

De nouvelles pistes de recherches

La composante immunitaire

En accord avec les résultats obtenus lors d'études précédentes (Geay *et al.*, 2011; Overturf *et al.*, 2012), l'hétérogénéité des réponses de la composante immunitaire de différents génotypes face aux aliments 100% V semble indiquer que cette composante pourrait jouer un rôle majeur dans les variations des performances de survie et de croissance des TAC nourries avec des aliments V. Afin de comprendre dans quelle mesure ces différences d'expression de gènes peuvent affecter la survie et la croissance, il serait nécessaire d'étudier la réponse de ces génotypes à des aliments où seules les HP ou seules les FP sont remplacées pour s'affranchir des interactions existantes entre les différents composants influençant la composante immunitaire.

La consommation d'aliment

La compréhension des mécanismes d'actions des acteurs impliqués dans les différences de consommations d'aliment entre génotypes est capitale. En effet, les connaissances sur le comportement de prise alimentaire des poissons sont faibles, pourtant la consommation

d'aliment semble jouer un rôle clef dans l'adaptation à l'aliment V. Les analyses d'expression par qPCR nous ont permis de détecter des gènes qui pourraient avoir des rôles primordiaux (NPY et AgRP par exemple) et des analyses supplémentaires pourraient être effectuées dans les cerveaux ou des régions spécifiques (hypothalamus) chez nos différentes lignées et à différents stades de vie. Une caractérisation plus fine de ces gènes pourrait également être réalisée grâce à l'émergence de nouvelles techniques d'édition du génome qui peuvent être mises en place sur des espèces non modèles (Edvardsen *et al.*, 2014).

Des pistes pour améliorer l'aliment V

Plusieurs pistes pour améliorer la formulation des aliments utilisés en aquaculture afin de continuer à augmenter les taux d'inclusion des matières premières végétales ont été dégagées grâce au travail de cette thèse.

- Les meilleures capacités à survivre et grandir avec l'aliment V de certains génotypes (lignées isogéniques et lignée sélectionnée) n'étaient pas associées à de meilleures capacités à digérer les nutriments. La formulation et l'extrusion de l'aliment V a permis d'obtenir un aliment de haute digestibilité et les problèmes de digestibilité ne sont plus aujourd'hui un verrou important pour l'utilisation des aliments 100% V par la TAC.
- Bien qu'aucune différence significative n'ait été détectée entre les génotypes étudiés, la diminution de la rétention protéique explique en partie les performances inférieures des poissons nourris avec l'aliment 100% V. Ces résultats suggèrent un déséquilibre du profil en AA, non adapté aux besoins des TAC et soulignent la nécessité de continuer les recherches en nutrition pour ajuster au mieux les profils en AA des aliments V. Le rôle de la taurine pourra être exploré davantage car une déficience en cet AA pourrait avoir des impacts importants sur les autres voies du métabolisme (Espe *et al.*, 2010, 2012).
- Un des points limitant l'utilisation d'aliment 100% V est la modification du profil en AG des poissons. Or les AGPI-LC de la série n-3 contenus dans la chair des salmonidés sont d'une importance majeure pour les consommateurs et la santé publique. Alors que la sélection génétique a permis d'améliorer la survie et la croissance, elle ne semble pas en mesure d'atténuer les effets des aliments V sur le profil en AGPI-LC n-3 des poissons.
 - Pour résoudre ces problèmes, des périodes de finition où les poissons sont nourris avec des aliments contenant de fortes proportions d'HP et de FP pourront être appliquées afin de rétablir les profils en AGPI-LC n-3 de la chair (Torstensen *et al.*, 2005).
 - D'autres matières premières pourront également être utilisées dans l'avenir, comme les microalgues qui contiennent ces AG essentiels. En plus des recherches en nutrition nécessaires pour estimer les taux limites d'inclusion de ces nouvelles matières premières, des progrès techniques sont indispensables pour permettre leur production en quantité importante et à des prix compétitifs.

Des pistes pour la recherche en génétique

Nos résultats montrent que la sélection est une voie rapide d'amélioration des performances de survie et de croissance des TAC nourries avec un aliment 100% V. La sélection avec des aliments V devra donc être utilisée à l'avenir pour continuer de diminuer la dépendance de l'aquaculture aux HP et aux FP. Mais pour cela, il est indispensable de continuer à s'intéresser aux mécanismes sous-jacents de l'adaptation pour (i) déceler ses possibles effets délétères sur des caractères, notamment ceux relatifs à la nutrition (profil en AG) (ii) et identifier l'origine des gains spécifiques obtenus.

En raison du rôle essentiel de l'EPA et du DHA pour les consommateurs, il serait donc pertinent de s'assurer que la sélection n'a pas affecté les capacités de synthèse et/ou de rétention de ces deux AG des poissons nourris avec des aliments V, mais également avec des aliments M car ils pourraient être utilisés lors de périodes de finition. L'analyse de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de ces AG devra être réalisée.

Parallèlement, l'identification de signature de sélections permettrait de connaître les zones du génome affectées par la sélection. En comparant les poissons sélectionnés et les poissons fondateurs, il serait alors possible de trouver des SNP soumis à la sélection. Des fouilles du génome pourraient permettre ensuite d'identifier une liste de gènes soumis à la sélection et de comparer cette liste avec celles trouvées grâce aux analyses du transcriptome. Une connaissance plus approfondie des mécanismes d'adaptation, notamment concernant la consommation d'aliment, permettra de développer de nouveaux critères de sélection (phénotypes fins ou marqueurs génétiques) qui pourront être utilisés dans le futur. Ainsi la sélection pour des aliments V pourra être plus ciblée et encore plus efficace.

Bibliographie

- Jason ABERNATHY, Andreas BREZAS, Kevin R SNEKVIK, Ronald W HARDY et Ken OVERTURF : Integrative functional analyses using rainbow trout selected for tolerance to plant diets reveal nutrigenomic signatures for soy utilization without the concurrence of enteritis. *PLoS One*, 12(7):e0180972, 2017.
- M ALDEGUNDE et M MANCEBO : Effects of neuropeptide y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Peptides*, 27(4):719–727, 2006.
- Jacqueline ALDER, Brooke CAMPBELL, Vasiliki KARPOUZI, Kristin KASCHNER et Daniel PAULY : Forage fish : from ecosystems to markets. *Annual review of environment and resources*, 33, 2008.
- Muhammad ALI, A NICIEZA et Robert J WOOTTON : Compensatory growth in fishes : a response to growth depression. *Fish and fisheries*, 4(2):147–190, 2003.
- P ANTONY JESU PRABHU, Johan W SCHRAMA et Sadasivam J KAUSHIK : Mineral requirements of fish : a systematic review. *Reviews in Aquaculture*, 8(2):172–219, 2016.
- G BAEVERFJORD et Å KROGDAHL : Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine : a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19(5):375–387, 1996.
- Anne Marie BAKKE, Elvis M CHIKWATI, Fredrik F VENOLD, Christian SAHLMANN, Halvor HOLM, Michael H PENN, Marianne OROPEZA-MOE et Åshild KROGDAHL : Bile enhances glucose uptake, reduces permeability, and modulates effects of lectins, trypsin inhibitors and saponins on intestinal tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 168:96–109, 2014.
- Mukundh N BALASUBRAMANIAN, Stephane PANSEERAT, Mathilde DUPONT-NIVET, Edwige QUILLET, Jerome MONTFORT, Aurelie LE CAM, Francoise MEDALE, Sadasivam J KAUSHIK et Inge GEURDEN : Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC genomics*, 17(1):449, 2016.
- J Gordon BELL, R James HENDERSON, Douglas R TOCHER et John R SARGENT : Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil : modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids*, 39(3):223–232, 2004.
- J Gordon BELL, Douglas R TOCHER, R James HENDERSON, James R DICK et Vivian O CRAMPTON : Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of nutrition*, 133(9):2793–2801, 2003.

- JG BELL, JR DICK, AH MCVICAR, JR SARGENT et KD THOMPSON : Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 49(3):665–673, 1993.
- Francoise BERGOT et Jeannine BREQUE : Digestibility of starch by rainbow trout : effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture*, 34(3-4):203–212, 1983.
- Mathieu BESSON, IJM DE BOER, Marc VANDEPUTTE, JAM VAN ARENDONK, E QUILLET, H KOMEN et J AUBIN : Effect of production quotas on economic and environmental values of growth rate and feed efficiency in sea cage fish farming. *PloS one*, 12(3):e0173131, 2017.
- HT BILTON et GL ROBINS : The effects of starvation and subsequent feeding on survival and growth of Fulton channel sockeye salmon fry (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 30(1):1–5, 1973.
- JM BLANC : Interaction between diet and genetic aptitude for weight and growth in juvenile rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 33(8):563–568, 2002.
- H BOSHRA, J LI et JO SUNYER : Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2):239–262, 2006.
- MP BRANSDEN, CG CARTER et BF NOWAK : Effects of dietary protein source on growth, immune function, blood chemistry and disease resistance of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Animal Science*, 73(1):105–113, 2001.
- Christine BUREL et Françoise MÉDALE : Quid de l'utilisation des protéines d'origine végétale en aquaculture ? *OCL*, 21(4):D406, 2014.
- Stephen A BUSTIN, Vladimir BENES, Jeremy A GARSON, Jan HELLEMANS, Jim HUGGETT, Mikael KUBISTA, Reinhold MUELLER, Tania NOLAN, Michael W PFAFFL, Gregory L SHIPLEY *et al.* : The MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4):611–622, 2009.
- LG BUTTLE, AC BURRELLS, JE GOOD, PD WILLIAMS, PJ SOUTHGATE et C BURRELLS : The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80(3):237–244, 2001.
- Albert CABALLERO-SOLARES, Jennifer R HALL, Xi XUE, Khalil ESLAMLOO, Richard G TAYLOR, Christopher C PARRISH et Matthew L RISE : The dietary replacement of marine ingredients by terrestrial animal and plant alternatives modulates the antiviral immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & shellfish immunology*, 64:24–38, 2017.
- Philip C CALDER : Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes : new twists in an old tale. *Biochimie*, 91(6):791–795, 2009.
- Philip C CALDER et Parveen YAQOUB : Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*, 35(3):266–272, 2009.

- Thérèse CALLET, Françoise MÉDALE, Laurence LARROQUET, Anne SURGET, Pierre AGUIRRE, Thierry KERNEIS, Laurent LABBÉ, Edwige QUILLET, Inge GEURDEN, Sandrine SKIBA-CASSY et Mathilde DUPONT-NIVET : Successful selection of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLOS ONE*, 12(10):1–21, 10 2017.
- Tim CASHION, Frédéric LE MANACH, Dirk ZELLER et Daniel PAULY : Most fish destined for fishmeal production are food-grade fish. *Fish and Fisheries*, 2017.
- Hervé CHAVANNE, Kasper JANSSEN, Johann HOFHERR, Franca CONTINI, Pierrick HAFFRAY, Hans KOMEN, Einar Eg NIELSEN, Luca BARGELLONI, Aquatrace CONSORTIUM *et al.* : A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. *Aquaculture International*, 24(5):1287–1307, 2016.
- Bernard CHEVASSUS, Edwige QUILLET, Francine KRIEG, Marie-Gwénola HOLLEBECQ, Muriel MAMBRINI, André FAURÉ, Laurent LABBÉ, Jean-Pierre HISEUX et Marc VANDEPUTTE : Enhanced individual selection for selecting fast growing fish : the "PROSPER" method, with application on brown trout (*Salmo trutta fario*). *Genetics Selection Evolution*, 36(6):643, 2004.
- EM CHIKWATI, C SAHLMANN, H HOLM, MH PENN, Å KROGDAHL et AM BAKKE : Alterations in digestive enzyme activities during the development of diet-induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *Aquaculture*, 402:28–37, 2013.
- Geneviève CORRAZE et Sadasivam KAUSHIK : Alimentation lipidique et remplacement des huiles de poisson par des huiles végétales en pisciculture. *Cahiers Agricultures*, 18 (2-3):112–118, 2009.
- Philippe CURY, Andrew BAKUN, Robert JM CRAWFORD, Astrid JARRE, Renato A QUINONES, Lynne J SHANNON et Hans M VERHEYE : Small pelagics in upwelling systems : patterns of interaction and structural changes in “wasp-waist” ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3):603–618, 2000.
- Philippe M CURY, Ian L BOYD, Sylvain BONHOMMEAU, Tycho ANKER-NILSSEN, Robert JM CRAWFORD, Robert W FURNESS, James A MILLS, Eugene J MURPHY, Henrik ÖSTERBLOM, Michelle PALECZNY *et al.* : Global seabird response to forage fish depletion—one-third for the birds. *Science*, 334(6063):1703–1706, 2011.
- Matilde DE FRANCESCO, Giuliana PARISI, Françoise MÉDALE, Paola LUPI, Sadasivam J KAUSHIK et Bianca M POLI : Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 236(1):413–429, 2004.
- Christian DE SANTIS, Kerry L BARTIE, Rolf E OLSEN, John B TAGGART et Douglas R TOCHER : Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 15:1–11, 2015.

- DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS OF THE UNITED NATIONS : World population prospects : the 2012 revision. *Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat, New York, 2013.*
- Atul R DESAI, Matthew G LINKS, Stephanie A COLLINS, Graeme S MANSFIELD, Murray D DREW, Andrew G VAN KESSEL et Janet E HILL : Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350:134–142, 2012.
- A DOBLY, SAM MARTIN, SC BLANEY et DF HOULIHAN : Protein growth rate in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) is negatively correlated to liver 20S proteasome activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 137(1):75–85, 2004.
- Murray D DREW, Ayoleke E OGUNKOYA, David M JANZ et Andrew G VAN KESSEL : 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 (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 267(1):260–268, 2007.
- Mathilde DUPONT-NIVET, Françoise MÉDALE, Julien LEONARD, Sandrine LE GUILLOU, Franck TIQUET, Edwige QUILLET et Inge GEURDEN : Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture*, 295(1):15–21, 2009.
- Rolf B EDVARDBSEN, Sven LEININGER, Lene KLEPPE, Kai Ove SKAFTNESMO et Anna WARGELIUS : Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation. *PloS one*, 9(9):e108622, 2014.
- P ENES, S PANSEARAT, S KAUSHIK et A OLIVA-TELES : Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish physiology and biochemistry*, 35(3):519–539, 2009.
- Marit ESPE, Ernst M HEVRØY, Bjørn LIASET, Andreas LEMME et Adel EL-MOWAFI : Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 274(1):132–141, 2008.
- Marit ESPE, Andreas LEMME, Alfred PETRI et Adel EL-MOWAFI : Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal ? *Aquaculture*, 255(1):255–262, 2006.
- Marit ESPE, Andreas LEMME, Alfred PETRI et Adel EL-MOWAFI : Assessment of lysine requirement for maximal protein accretion in Atlantic salmon using plant protein diets. *Aquaculture*, 263(1):168–178, 2007.
- Marit ESPE, Raja Mansingh RATHORE, Zhen-Yu DU, Bjørn LIASET et Adel EL-MOWAFI : Methionine limitation results in increased hepatic fas activity, higher liver 18 : 1 to 18 : 0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Amino acids*, 39(2):449–460, 2010.
- Marit ESPE, Kari RUOHONEN et Adel EL-MOWAFI : Effect of taurine supplementation on the metabolism and body lipid-to-protein ratio in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Research*, 43(3):349–360, 2012.

- Timothy E ESSINGTON, Pamela E MORIARTY, Halley E FROEHLICH, Emma E HODGSON, Laura E KOEHN, Kiva L OKEN, Margaret C SIPLE et Christine C STAWITZ : Fishing amplifies forage fish population collapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21):6648–6652, 2015.
- FAO : *The state of world fisheries and aquaculture 2016*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016.
- Jordi FOLCH, M_ LEES, GH SLOANE-STANLEY *et al.* : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1):497–509, 1957.
- FRANCE AGRIMER : *Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2015*. France Agrimer, 2016.
- George FRANCIS, Harinder PS MAKKAR et Klaus BECKER : Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3):197–227, 2001.
- Delbert M GATLIN, Frederic T BARROWS, Paul BROWN, Konrad DABROWSKI, T Gibson GAYLORD, Ronald W HARDY, Eliot HERMAN, Gongshe HU, Åshild KROGDAHL, Richard NELSON *et al.* : Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds : a review. *Aquaculture research*, 38(6):551–579, 2007.
- T Gibson GAYLORD, Frederic T BARROWS, April M TEAGUE, Katherine A JOHANSEN, Ken E OVERTURF et Brian SHEPHERD : Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 269(1):514–524, 2007.
- Florian GEAY, Serena FERRARESSO, Jose L ZAMBONINO-INFANTE, Luca BARGELLONI, Claire QUENTEL, Marc VANDEPUTTE, Sachi KAUSHIK, Chantal L CAHU et David MAZURRAIS : Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC genomics*, 12(1):1, 2011.
- I GEURDEN, A CUVIER, E GONDOUIN, RE OLSEN, K RUOHONEN, S KAUSHIK et T BOUJARD : Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & behavior*, 85(2):107–114, 2005.
- Inge GEURDEN, Peter BORCHERT, Mukundh N BALASUBRAMANIAN, Johan W SCHRAMA, Mathilde DUPONT-NIVET, Edwige QUILLET, Sadasivam J KAUSHIK, Stéphane PANSERAT et Françoise MÉDALE : The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS One*, 8(12):e83162, 2013.
- Inge GEURDEN, Genevieve CORRAZE et Thierry BOUJARD : Self-feeding behaviour of rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Applied animal behaviour science*, 108(3):313–326, 2007.
- Anatole GHAZALPOUR, Brian BENNETT, Vladislav A PETYUK, Luz OROZCO, Raffi HAGOPIAN, Imran N MUNGRUE, Charles R FARBER, Janet SINSHEIMER, Hyun M KANG, Nicholas FURLOTTE *et al.* : Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS genetics*, 7(6):e1001393, 2011.

- Trygve GJEDREM et Morten RYE : Selection response in fish and shellfish : a review. *Reviews in Aquaculture*, 2016.
- Bjarne GJERDE : Growth and reproduction in fish and shellfish. *Aquaculture*, 57(1-4):37–55, 1986.
- T GJØEN, A OBACH, C RØSJØ, BG HELLAND, G ROSEN LUND, E HVATTUM et B RUYTER : Effect of dietary lipids on macrophage function, stress susceptibility and disease esistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(2):149–161, 2004.
- Ana S GOMES, Ann-Elise Olderbakk JORDAL, Kjetil OLSEN, Torstein HARBOE, Deborah M POWER et Ivar RØNNESTAD : Neuroendocrine control of appetite in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) : changes during metamorphosis and effects of feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 183:116–125, 2015.
- Emídio F GOMES, Paulo REMA et Sadasivam J KAUSHIK : Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) : digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 130(2):177–186, 1995.
- Geovanny D GÓMEZ et José Luis BALCÁZAR : A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2):145–154, 2007.
- RJR GRAINGER et Serge M GARCIA : *Chronicles of marine fishery landings (1950-1994) : trend analysis and fisheries potential*. FAO Rome, 1996.
- JA GREEN et RW HARDY : The optimum dietary essential amino acid pattern for rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*), to maximize nitrogen retention and minimize nitrogen excretion. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1):97–108, 2002.
- Min GU, Trond M KORTNER, Michael PENN, Anne Kristine HANSEN et Åshild KROGDAHL : Effects of dietary plant meal and soya-saponin supplementation on intestinal and hepatic lipid droplet accumulation and lipoprotein and sterol metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British journal of nutrition*, 111(3):432–444, 2014.
- Jean GUILLAUME : *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*. Springer Science & Business Media, 2001.
- TJ HARA : Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *Journal of Fish Biology*, 68(3):810–825, 2006.
- G-I HEMRE, TP MOMMSEN et Å KROGDAHL : Carbohydrates in fish nutrition : effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(3):175–194, 2002.
- M HENRY, L GASCO, G PICCOLO et E FOUNTOULAKI : Review on the use of insects in the diet of farmed fish : past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203:1–22, 2015.

- Minh-Hien HOANG, Yaoyao JIA, Hee-jin JUN, Ji Hae LEE, Kwang-Yeon HWANG, Dal-Woong CHOI, Soo-Jong UM, Boo-Yong LEE, Sang-Guan YOU et Sung-Joon LEE : Taurine is a liver X receptor- α ligand and activates transcription of key genes in the reverse cholesterol transport without inducing hepatic lipogenesis. *Molecular nutrition & food research*, 56 (6):900–911, 2012.
- Katheline HUA et Dominique P BUREAU : Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. *Aquaculture*, 356-357:284–301, 2012.
- Da Wei HUANG, Brad T SHERMAN et Richard A LEMPICKI : Bioinformatics enrichment tools : paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1):1–13, 2009a.
- Da Wei HUANG, Brad T SHERMAN et Richard A LEMPICKI : Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1):44–57, 2009b.
- Yasuro IWASHITA, Takeshi YAMAMOTO, Hirofumi FURUITA, Tsuyoshi SUGITA et Nobuhiro SUZUKI : Influence of certain soybean antinutritional factors supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal and liver morphology in fingerling rainbow trout *Onchorynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 74(5):1075–1082, 2008.
- AJ JACKSON : The importance of fishmeal and fish oil in aquaculture diets. *International Aquafeed*, 9(6):18–21, 2006.
- Bernard JALABERT et Alexis FOSTIER : *La truite arc-en-ciel : De la biologie à l'élevage*. Editions Quae, 2010.
- Matti JANHUNEN, Antti KAUSE, Harri VEHVILÄINEN et Otso JÄRVISALO : Genetics of microenvironmental sensitivity of body weight in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) selected for improved growth. *PloS one*, 7(6):e38766, 2012.
- Stuart G JANTZEN, Dan S SANDERSON, Kris R von SCHALBURG, Motoshige YASUIKE, Francesco MARASS et Ben F KOOP : A 44K microarray dataset of the changing transcriptome in developing Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *BMC research notes*, 4(1):88, 2011.
- A-EO JORDAL, Ø LIE et BE TORSTENSEN : Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture Nutrition*, 13(2):114–130, 2007.
- Ann-Elise O JORDAL, Ivar HORDVIK, Maurice PELSERS, David A BERNLOHR et Bente E TORSTENSEN : FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)-general effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 145(2):147–158, 2006.
- Ann-Elise O JORDAL, Bente E TORSTENSEN, Stephen TSOI, Douglas R TOCHER, Santosh P LALL et Susan E DOUGLAS : Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *The Journal of nutrition*, 135(10):2355–2361, 2005.

- Biju Sam KAMALAM, Françoise MEDALE et Stephane PANSEERAT : Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes : New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, 2016.
- Vasiliki S KARPOUZI, Reg WATSON et Daniel PAULY : Modelling and mapping resource overlap between seabirds and fisheries on a global scale : a preliminary assessment. *Marine Ecology Progress Series*, 343:87–99, 2007.
- Kristin KASCHNER, Vasiliki KARPOUZI, Reg WATSON et Daniel PAULY : Forage fish consumption by marine mammals and seabirds. *On the multiple uses of forage fish : from ecosystems to markets. Fisheries Centre Research Reports*, 14(3):33–46, 2006.
- Audrey KAUFFMANN, Robert GENTLEMAN et Wolfgang HUBER : arrayQualityMetrics—a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*, 25(3):415–416, 2009.
- Antti KAUSE, Ossi RITOLA, Tuija PAANANEN, Heli WAHLROOS et Esa A MÄNTYSAARI : Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 247(1):177–187, 2005.
- SJ KAUSHIK, JP CRAVEDI, JP LALLES, J SUMPTER, B FAUCONNEAU et M LAROCHE : Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*. *Aquaculture*, 133(3):257–274, 1995.
- HL KINCAID, WR BRIDGES et B VON LIMBACH : Three generations of selection for growth rate in fall-spawning rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(6):621–628, 1977.
- Viswanath KIRON, Hideo FUKUDA, Toshio TAKEUCHI et Takeshi WATANABE : Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Onchorynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, 111(3):361–367, 1995.
- Trond M KORTNER, Ingemar BJÖRKHEM, Aleksei KRASNOV, Gerrit TIMMERHAUS et Åshild KROGDAHL : Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *British Journal of Nutrition*, 111(12):2089–2103, 2014.
- Trond M KORTNER, Jinni GU, Åshild KROGDAHL et Anne Marie BAKKE : Transcriptional regulation of cholesterol and bile acid metabolism after dietary soyabean meal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *British Journal of Nutrition*, 109(4):593–604, 2013.
- Trond M KORTNER, Ingrid OVERREIN, Gunvor ØIE, Elin KJØRSVIK et Augustine ARUKWE : The influence of dietary constituents on the molecular ontogeny of digestive capability and effects on growth and appetite in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 315(1):114–120, 2011.

- Trond M KORTNER, Stanko SKUGOR, Michael H PENN, Liv Torunn MYDLAND, Brankica DJORDJEVIC, Marie HILLESTAD, Aleksei KRASNOV et Åshild KROGDAHL : Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC veterinary research*, 8(1):1, 2012.
- A KROGDAHL, AM BAKKE-MCKELLEP, KH ROED et G BAEVERFJORD : Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products : effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and igm levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition*, 6(2):77–84, 2000.
- Åshild KROGDAHL, Karina GAJARDO, Trond M KORTNER, Michael PENN, Min GU, Gerd Marit BERGE et Anne Marie BAKKE : Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15):3887–3902, 2015.
- Åshild KROGDAHL, Trygve Berg LEA et Jan J OLLI : Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, 107(1):215–219, 1994.
- Åshild KROGDAHL, Michael PENN, Jim THORSEN, Ståle REFSTIE et Anne Marie BAKKE : Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture : an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3):333–344, 2010.
- Elżbieta KRÓL, Alex DOUGLAS, Douglas R TOCHER, Viv O CRAMPTON, John R SPEAKMAN, Christopher J SECOMBES et Samuel AM MARTIN : Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC genomics*, 17(1):156, 2016.
- Christelle LANGEVIN, Mar BLANCO, Samuel AM MARTIN, Luc JOUNEAU, Jean-Francois BERNARDET, Armel HOUEL, Aurélie LUNAZZI, Eric DUCHAUD, Christian MICHEL, Edwige QUILLET *et al.* : Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One*, 7(6):e39126, 2012.
- Marine LANSARD, Stéphane PANSEERAT, Elisabeth PLAGNES-JUAN, Karine DIAS, Iban SEILIEZ et Sandrine SKIBA-CASSY : L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *The Journal of nutrition*, 141(1):75–80, 2011.
- Marine LANSARD, Stéphane PANSEERAT, Elisabeth PLAGNES-JUAN, Iban SEILIEZ et Sandrine SKIBA-CASSY : Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout : role of tor. *Amino acids*, 39(3):801–810, 2010.
- Viviana LAZZAROTTO, Geneviève CORRAZE, Laurence LARROQUET, David MAZURAS et Françoise MÉDALE : 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(12):2079–2092, 2016.

- Viviana LAZZAROTTO, Geneviève CORRAZE, Amandine LEPREVOST, Edwige QUILLET, Mathilde DUPONT-NIVET et Françoise MÉDALE : Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources : consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PloS one*, 10(2):e0117609, 2015.
- Richard LE BOUCHER, Mathilde DUPONT-NIVET, S LAUREAU, Laurent LABBE, Inge GEURDEN, Françoise MEDALE, Beatrice CHATAIN, Marc VANDEPUTTE et Edwige QUILLET : Amélioration génétique et utilisation des aliments à base de végétaux en pisciculture. *Inra Productions Animales*, 26(4):317–326, 2013.
- Richard LE BOUCHER, Mathilde DUPONT-NIVET, Marc VANDEPUTTE, Thierry KERNEÏS, Lionel GOARDON, Laurent LABBE, Beatrice CHATAIN, Marie Josee BOTHAIRE, Laurence LARROQUET, Françoise MEDALE *et al.* : Selection for adaptation to dietary shifts : towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PloS one*, 7(9):e44898, 2012.
- Richard LE BOUCHER, Edwige QUILLET, Marc VANDEPUTTE, Jean Michel LECALVEZ, Lionel GOARDON, Béatrice CHATAIN, Françoise MÉDALE et Mathilde DUPONT-NIVET : Plant-based diet in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss Walbaum*) : Are there genotype-diet interactions for main production traits when fish are fed marine vs. plant-based diets from the first meal ? *Aquaculture*, 321(1):41–48, 2011.
- Michael J LEAVER, José M BAUTISTA, Björn Thrandur BJÖRNSSON, Elisabeth JÖNSSON, Grigorios KREY, Douglas R TOCHER et Bente E TORSTENSEN : Towards fish lipid nutrigenomics : current state and prospects for fin-fish aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 16(sup1):73–94, 2008a.
- Michael J LEAVER, John B TAGGART, Laure VILLENEUVE, James E BRON, Derrick R GUY, Stephen C BISHOP, Ross D HOUSTON, Oswald MATIKA et Douglas R TOCHER : Heritability and mechanisms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid deposition in the flesh of Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 6(1):62–69, 2011.
- Michael J LEAVER, Laure AN VILLENEUVE, Alex OBACH, Linda JENSEN, James E BRON, Douglas R TOCHER et John B TAGGART : 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(1):299, 2008b.
- Timothy D LEEDS, Roger L VALLEJO, Gregory M WEBER, Dianelys GONZALEZ-PENA et Jeffrey T SILVERSTEIN : Response to five generations of selection for growth performance traits in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 465:341–351, 2016.
- Bjørn LIASET et Marit ESPE : Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochemistry*, 43(1):42–48, 2008.
- Lucie MARANDEL, Iban SEILIEZ, Vincent VÉRON, Sandrine SKIBA-CASSY et Stéphane PANSERAT : New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous

- rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) : a gene duplication trail. *Physiological genomics*, 47 (7):253–263, 2015.
- Inderjit S MARJARA, Elvis M CHIKWATI, Elin C VALEN, Åshild KROGDAHL et Anne Marie BAKKE : Transcriptional regulation of IL-17A and other inflammatory markers during the development of soybean meal-induced enteropathy in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Cytokine*, 60(1):186–196, 2012.
- Samuel AM MARTIN et Elżbieta KRÓL : Nutrigenomics and immune function in fish : new insights from omics technologies. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017.
- Françoise MÉDALE, Thierry BOUJARD, Frédéric VALLÉE, Denise BLANC, Muriel MAMBRINI, Arjen ROEM et Sadasivam J KAUSHIK : Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources*, 11(4):239–246, 1998.
- Françoise MÉDALE et Sadasivam KAUSHIK : Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. *Cahiers Agricultures*, 18(2-3):103–111, 2009.
- Francoise MEDALE, Richard LE BOUCHER, Mathilde DUPONT-NIVET, Edwige QUILLET, Joel AUBIN et Stephane PANSERAT : Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. *INRA Productions animales*, 26(4):303–315, 2013.
- Jan A MENNIGEN, Sandrine SKIBA-CASSY et Stéphane PANSERAT : Ontogenetic expression of metabolic genes and microRNAs in rainbow trout alevins during the transition from the endogenous to the exogenous feeding period. *Journal of Experimental Biology*, 216 (9):1597–1608, 2013.
- D MENOYO, CJ LOPEZ-BOTE, A OBACH et JM BAUTISTA : Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism, and oxidative stability of Atlantic salmon. *Journal of animal science*, 83(12):2853–2862, 2005.
- D MONTERO, T KALINOWSKI, A OBACH, L ROBAINA, L TORT, MJ CABALLERO et MS IZQUIERDO : Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*) : effects on fish health. *Aquaculture*, 225(1):353–370, 2003.
- Daniel MONTERO et Marisol IZQUIERDO : Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*, pages 439–486, 2010.
- Thomas W MOON : Glucose intolerance in teleost fish : fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2):243–249, 2001.
- Sofia MORAIS, Jarunan PRATOOMYOT, John B TAGGART, James E BRON, Derrick R GUY, J Gordon BELL et Douglas R TOCHER : Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil : a liver transcriptomic analysis. *BMC genomics*, 12(1):255, 2011a.

- Sofia MORAIS, Jarunan PRATOOMYOT, Bente E TORSTENSEN, John B TAGGART, Derrick R GUY, J Gordon BELL et Douglas R TOCHER : Diet× genotype interactions in hepatic cholesterol and lipoprotein metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to replacement of dietary fish oil with vegetable oil. *British journal of nutrition*, 106(10):1457–1469, 2011b.
- Sofia MORAIS, Tomé SILVA, Odete CORDEIRO, Pedro RODRIGUES, Derrick R GUY, James E BRON, John B TAGGART, J Gordon BELL et Douglas R TOCHER : Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bmc Genomics*, 13(1):448, 2012.
- G MOURENTE, JE GOOD et JG BELL : Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) : effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, 11(1):25–40, 2005.
- Gabriel MOURENTE, Joanne E GOOD, Kim D THOMPSON et J Gordon BELL : Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *British Journal of Nutrition*, 98(4):770–779, 2007.
- Rosamond L NAYLOR, Rebecca J GOLDBURG, Jurgenne H PRIMAVERA, Nils KAUTSKY, Malcolm CM BEVERIDGE, Jason CLAY, Carl FOLKE, Jane LUBCHENCO, Harold MOONEY et Max TROELL : Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790):1017–1024, 2000.
- Krista M NICHOLS, Jerri BARTHOLOMEW et Gary H THORGAARD : Mapping multiple genetic loci associated with *Ceratomyxa shasta* resistance in *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(2):145–154, 2003.
- David LG NOAKES et Jean-Guy J GODIN : Ontogeny of behavior and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. *Fish physiology*, 11:345–395, 1988.
- NRC : *Nutrient requirements of fish and shrimp*. The National Academies Press, 2011.
- A OLIVA-TELES : Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2):83–108, 2012.
- Ken OVERTURF, Frederick T BARROWS et Ronald W HARDY : Effect and interaction of rainbow trout strain (*Oncorhynchus mykiss*) and diet type on growth and nutrient retention. *Aquaculture Research*, 44(4):604–611, 2013a.
- Ken OVERTURF et T Gibson GAYLORD : Determination of relative protein degradation activity at different life stages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 152(2):150–160, 2009.
- Ken OVERTURF, Roger L VALLEJO, Yniv PALTÍ, Fredrick T BARROWS et James E PARSONS : Microarray analysis of differential utilization of plant-based diets by rainbow trout. *Aquaculture international*, 20(2):213–232, 2012.

- Ken OVERTURF, Tom WELKER, Frederick BARROWS, Richard TOWNER, Rich SCHNEIDER et Scott LAPATRA : Variation in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*, to biosynthesize eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid when reared on plant oil replacement feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(3):326–337, 2013b.
- Kenneth OVERTURF et Scott LAPATRA : Quantitative expression of immunological factors in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of fish diseases*, 29(4):215–224, 2006.
- Anthony OXLEY, Cecile JOLLY, Torunn EIDE, Ann-Elise O JORDAL, Asbjørn SVARDAL et Rolf-Erik OLSEN : The combined impact of plant-derived dietary ingredients and acute stress on the intestinal arachidonic acid cascade in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British journal of nutrition*, 103(6):851–861, 2010.
- Yniv PALTÍ, Jeffrey T SILVERSTEIN, Heather WIEMAN, John G PHILLIPS, Frederic T BARROWS et James E PARSONS : Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 255(1):548–556, 2006.
- Stephane PANSEARAT, GA HORTOPAN, Elisabeth PLAGNES-JUAN, C KOLDITZ, Marine LANSARD, S SKIBA-CASSY, Diane ESQUERRE, Inge GEURDEN, Françoise MÉDALE, Sadasivam KAUSHIK *et al.* : Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*, 294(1):123–131, 2009.
- Stéphane PANSEARAT, Cathy KOLDITZ, Nadege RICHARD, Elisabeth PLAGNES-JUAN, Francois PIUMI, Diane ESQUERRÉ, Françoise MÉDALE, Genevieve CORRAZE et Sadavisam KAUSHIK : Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *British Journal of Nutrition*, 100(5):953–967, 2008.
- Daniel PAULY et Dirk ZELLER : Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nature communications*, 7:10244, 2016.
- Ioannis K PETROPOULOS, Kimberly Dawn THOMPSON, Alison MORGAN, James R DICK, Douglas R TOCHER et J G BELL : Effects of substitution of dietary fish oil with a blend of vegetable oils on liver and peripheral blood leucocyte fatty acid composition, plasma prostaglandin E2 and immune parameters in three strains of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, 15(6):596–607, 2009.
- Michael W PFAFFL : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9):e45–e45, 2001.
- Lindsey R PIERCE, Yniv PALTÍ, Jeffrey T SILVERSTEIN, Fredrick T BARROWS, Eric M HALLERMAN et James E PARSONS : Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype × diet interaction in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 278(1):37–42, 2008.

- Ellen PIKITCH, Patricia Dee BOERSMA, IL BOYD, DO CONOVER, Philippe CURY, Timothy ESSINGTON, SS HEPPELL, ED HOUDE, Marc MANGEL, Daniel PAULY *et al.* : Little fish, big impact : managing a crucial link in ocean food webs. *Lenfest Ocean Program, Washington, DC*, 108, 2012.
- S POLAKOF et S PANSERAT : How tom moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 199:43–49, 2016.
- Sergio POLAKOF, Stéphane PANSERAT, José L SOENGAS et Thomas W MOON : Glucose metabolism in fish : a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(8):1015–1045, 2012.
- Edwige QUILLET, Pierre BOUDRY et Sylvie LAPEGUE : Variabilité génétique de la réponse aux organismes pathogènes : un outil pour améliorer la santé des mollusques et poissons d'élevage. *INRA Productions Animales*, 20(3):239–252, 2007.
- CD QUINTON, Antti KAUSE, K RUOHONEN et J KOSKELA : Genetic relationships of body composition and feed utilization traits in European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) and implications for selective breeding in fishmeal-and soybean meal-based diet environments. *Journal of animal science*, 85(12):3198–3208, 2007a.
- Cheryl D QUINTON, Antti KAUSE, Juha KOSKELA et Ossi RITOLA : Breeding salmonids for feed efficiency in current fishmeal and future plant-based diet environments. *Genetics Selection Evolution*, 39(4):431, 2007b.
- Herminio R RABANAL : History of aquaculture. 1988.
- Nadège RICHARD, Sadasivam KAUSHIK, Laurence LARROQUET, Stéphane PANSERAT et Geneviève CORRAZE : Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 96(2):299–309, 2006.
- Harris RIPPS et Wen SHEN : Taurine : a “very essential” amino acid. *Molecular vision*, 18:2673, 2012.
- M Fernanda RODRIGUEZ, Scott LAPATRA, Scott WILLIAMS, Thomas FAMULA et Bernie MAY : Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture*, 241(1):93–115, 2004.
- Ivar RØNNESTAD, Ana S , Koji MURASHITA, Rita ANGOTZI, Elisabeth JÖNSSON et Hélène VOLKOFF : Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in endocrinology*, 8, 2017.
- Christian SAHLMANN, Ben JG SUTHERLAND, Trond M KORTNER, Ben F KOOP, Åshild KROGDAHL et Anne Marie BAKKE : Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish & shellfish immunology*, 34(2):599–609, 2013.

- E SANTIGOSA, I GARCÍA-MEILÁN, JM VALENTIN, J PÉREZ-SÁNCHEZ, F MÉDALE, S KAUSHIK et MA GALLARDO : Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317(1):146–154, 2011.
- E SANTIGOSA, J SÁNCHEZ, F MÉDALE, S KAUSHIK, J PÉREZ-SÁNCHEZ et MA GALLARDO : Modifications of digestive enzymes in trout (*Onchorynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, 282(1):68–74, 2008.
- G SCHIPP : *Is the use of fishmeal and fish oil in aquaculture diets sustainable ?*, 2008.
- Gerd SCHMITZ et Josef ECKER : The opposing effects of n- 3 and n- 6 fatty acids. *Progress in lipid research*, 47(2):147–155, 2008.
- SEA AROUND US : The sea around us project. <http://www.seaaroundus.org/data/#/global/stock-status>, 2016.
- SEAFISH : Fishmeal and fish oil facts and figures. Rapport technique, Seafish, 2016. URL http://www.seafish.org/media/Publications/SeafishFishmealandFishOilFactsandFigures_201612.pdf.
- Iban SEILIEZ, Stéphane PANSERAT, Marine LANSARD, Sergio POLAKOF, Elisabeth PLAGNES-JUAN, Anne SURGET, Karine DIAS, Mélanie LARQUIER, Sadasivam KAUSHIK et Sandrine SKIBA-CASSY : Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(3):R733–R743, 2011.
- NC SHANTHA et RG ACKMAN : Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n—3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, 533:1–10, 1990.
- Sandrine SKIBA-CASSY, Inge GEURDEN, Stéphane PANSERAT et Iban SEILIEZ : Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 454:56–65, 2016.
- S SKUGOR, B GRISDALE-HELLAND, S REFSTIE, S AFANASYEV, J VIELMA et A KRASNOV : Gene expression responses to restricted feeding and extracted soybean meal in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture Nutrition*, 17(5):505–517, 2011.
- Gordon K SMYTH : Limma : linear models for microarray data. In R. GENTLEMAN, V. CAREY, S. DUDOIT, R. IRIZARRY et W. HUBER, éditeurs : *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, pages 397–420. Springer, New York, 2005.
- SOCIÉTÉ AQUAGEN : Société aquagen. <https://aquagen.no/en/products/trout-eggs/product-documentation-for-rainbow-trout/ipn-resistance-for-rainbow-trout/>. Accessed : 2017-11-23.

- Matthew SPRAGUE, James R DICK et Douglas R TOCHER : Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006–2015. *Scientific reports*, 6, 2016.
- Robert R STICKNEY et Granvil D TREECE : History of aquaculture. *Aquaculture Production Systems*, pages 15–50, 2012.
- I STUBHAUG, Ø LIE et BE TORSTENSEN : β -oxidation capacity in liver increases during parr-smolt transformation of Atlantic salmon fed vegetable oil and fish oil. *Journal of Fish Biology*, 69(2):504–517, 2006.
- Luca TACCHI, Christopher J SECOMBES, Ralph BICKERDIKE, Michael A ADLER, Claudia VENEGAS, Harald TAKLE et Samuel AM MARTIN : Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics*, 13(1):363, 2012.
- Albert GJ TACON, Mohammad R HASAN et Marc METIAN : *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans : trends and prospects*. Numéro 564. Food and Agriculture Organization of the United Nations Technical Paper, 2011.
- Albert GJ TACON et Marc METIAN : Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds : Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285 (1):146–158, 2008.
- Albert GJ TACON et Marc METIAN : Feed matters : satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1):1–10, 2015.
- Thanongsak THANUTHONG, David S FRANCIS, Elizabeth MANICKAM, Shyamalie D SENADHEERA, David CAMERON-SMITH et Giovanni M TURCHINI : Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary pufa content : Ii) effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion. *Aquaculture*, 322:99–108, 2011.
- P THIVEND, CH MERCIER et A GUILBOT : Determination of starch with glucoamylase. *Methods in carbohydrate chemistry*, 6:100–105, 1972.
- Douglas R TOCHER : Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2):107–184, 2003.
- BE TORSTENSEN, M ESPE, M SANDEN, I STUBHAUG, R WAAGBØ, G-I HEMRE, R FONTANILLAS, U NORDGARDEN, EM HEVRØY, P OLSVIK et M.H.G. BERNTSSEN : Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture*, 285(1):193–200, 2008.
- BE TORSTENSEN, DA NANTON, PA OLSVIK, H SUNDVOLD et I STUBHAUG : Gene expression of fatty acid-binding proteins, fatty acid transport proteins (cd36 and FATP) and β -oxidation-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed fish oil or vegetable oil. *Aquaculture Nutrition*, 15(4):440–451, 2009.

- Bente E TORSTENSEN, J Gordon BELL, Grethe ROSENLUND, R James HENDERSON, Ingvild E GRAFF, Douglas R TOCHER, Øyvind LIE et John R SARGENT : Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26):10166–10178, 2005.
- Bente E TORSTENSEN, Øyvind LIE et Livar FRØYLAND : Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)—effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids*, 35(6):653–664, 2000.
- Giovanni M TURCHINI et David S FRANCIS : Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and β -oxidation) in rainbow trout fed fish oil-or linseed oil-based diets. *British Journal of Nutrition*, 102(1):69–81, 2009.
- Giovanni M TURCHINI, Bente E TORSTENSEN et Wing-Keong NG : Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1):10–57, 2009.
- Tine VALENTINČIČ et John CAPRIO : Visual and chemical release of feeding behavior in adult rainbow trout. *Chemical senses*, 22(4):375–382, 1997.
- Fredrik F VENOLD, Michael H PENN, Åshild KROGDAHL et Ken OVERTURF : Severity of soybean meal induced distal intestinal inflammation, enterocyte proliferation rate, and fatty acid binding protein (Fabp2) level differ between strains of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 364:281–292, 2012.
- Oddur T VILHELMSSON, Samuel AM MARTIN, Françoise MÉDALE, Sadasivam J KAUSHIK et Dominic F HOULIHAN : Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 92(1):71–80, 2004.
- Christine VOGEL et Edward M MARCOTTE : Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4):227–232, 2012.
- H VOLKOFF, LF CANOSA, S UNNIAPPAN, JM CERDA-REVERTER, NJ BERNIER, SP KELLY et RE PETER : Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and comparative endocrinology*, 142(1):3–19, 2005.
- Helene VOLKOFF : The neuroendocrine regulation of food intake in fish : a review of current knowledge. *Frontiers in neuroscience*, 10, 2016.
- Jurij WACYK, Madison POWELL, Kenneth RODNICK, Ken OVERTURF, Rodney A HILL et Ronald HARDY : Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture*, 356:223–234, 2012.
- Samantha L WHITE, Dionne SAKHRANI, Roy G DANZMANN et Robert H DEVLIN : Influence of developmental stage and genotype on liver mrna levels among wild, domesticated, and hybrid rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Bmc Genomics*, 14(1):673, 2013.

- Xi XUE, Stefanie M HIXSON, Tiago S HORI, Marije BOOMAN, Christopher C PARRISH, Derek M ANDERSON et Matthew L RISE : Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver transcriptome response to diets containing camelina sativa products. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 14:1–15, 2015.
- Takeshi YAMAMOTO, Koji MURASHITA, Hiroyuki MATSUNARI, Hiromi OKU, Hirofumi FURUITA, Hiroyuki OKAMOTO, Shunji AMANO et Nobuhiro SUZUKI : Selectively bred juvenile F2 amago salmon *oncorhynchus masou ishikawae* fed a low fishmeal diet exhibit growth comparable to unselected juveniles fed a fishmeal-based diet. *Fisheries Science*, 81 (1):83–93, 2015.
- Takeshi YAMAMOTO, Koji MURASHITA, Hiroyuki MATSUNARI, Hiromi OKU, Hirofumi FURUITA, Hiroyuki OKAMOTO, Shunji AMANO et Nobuhiro SUZUKI : Amago salmon *oncorhynchus masou ishikawae* juveniles selectively bred for growth on a low fishmeal diet exhibit a good response to the low fishmeal diet due largely to an increased feed intake with a particular preference for the diet. *Aquaculture*, 465:380–386, 2016.
- Takeshi YAMAMOTO, Hiroyuki OKAMOTO, Hirofumi FURUITA, Koji MURASHITA, Hiroyuki MATSUNARI, Yasuro IWASHITA, Shunji AMANO et Nobuhiro SUZUKI : Growth performance and physiological condition of f1 amago salmon *oncorhynchus masou ishikawae* juveniles obtained from broodstock with selective breeding for growth on a low fish-meal diet. *Fisheries Science*, 80(3):569–579, 2014.
- John H YOUSON : 2 First metamorphosis. *Fish physiology*, 11:135–196, 1988.
- Xiaozhong ZHENG, Bente E TORSTENSEN, Douglas R TOCHER, James R DICK, R James HENDERSON et J Gordon BELL : Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734(1):13–24, 2005.

■ ■ ■ Valorisations

Publications scientifiques

- **T. Callet, F. Médale, L. Larroquet, A. Surget, P. Aguirre, T. Kerneis, L. Labbé, E. Quillet, I. Geurden, S. Skiba-Cassy, M. Dupont-Nivet Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits *Plos One*, 12(10) :1–21, 10 2017. doi : 10.1371/journal.pone.0186705, 2017**
- **T. Callet, M. Dupont-Nivet, M. Cluzeaud, F. Jaffrezic, D. Laloë, T. Kerneis, L. Labbé, E. Quillet, I. Geurden, D. Mazurais, S. Skiba-Cassy, F. Médale Detection of new pathways involved in the acceptance and the utilisation of a plant-based diet in isogenic lines of rainbow trout fry, Soumise à Plos One**
- **T. Callet, M. Dupont-Nivet, M. Danion, C. Burel, M. Cluzeaud, A. Surget, P. Aguirre, M. Cluzeaud, T. Kerneis, L. Labbé, S. Panserat, E. Quillet, I. Geurden, S. Skiba-Cassy, F. Médale Why some rainbow trout genotypes grow better with a complete plant-based diet ? A transcriptomic analysis on three isogenic lines Manuscrit**

Communications orales

- **T. Callet, M. Dupont-Nivet, I. Geurden, S. Panserat, E. Quillet, T. Zhu, M. Borey, M. Cluzeaud, T. Kerneis, L. Labbé, S. Skiba, F. Médale Detection of liver molecular markers linked to a plant-based diet utilization in different rainbow trout genotypes *Aquaculture Europe, Dubrovnik, 2017***
- **M. Dupont-Nivet, T. Callet, I. Geurden, L. Labbé, D. Laloë, F. Jaffrezic, S. Skiba, E. Quillet, F. Médale Ability to grow and survive with 100% plant-based diet in rainbow trout : contrasted genotypes help to understand underlying mechanisms *XVI Congreso Nacional de Acuicultura - Journée Franco Espagnole, Saragosse, 2017***
- **T. Callet, F. Médale, A. Surget, L. Larroquet, P. Aguirre, T. Kerneis, L. Labbé, I. Geurden, E. Quillet, S. Skiba, M. Dupont-Nivet Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil *68th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Tallinn, 2017***
- **T. Callet, M. Dupont-Nivet, I. Geurden, F. Jaffrezic, D. Laloë, S. Skiba, F. Médale Mechanisms related to a plant based diet utilization in three isogenic lines of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) assessed by transcriptomic analysis *Aquaculture Europe, Edimbourg, 2016***
- **T. Callet, M. Cluzeaud, M. Dupont-Nivet, E. Quillet, I. Geurden, F. Jaffrezic, D. Laloë, S. Skiba, F. Médale Nouveaux marqueurs moléculaires de l'adaptation à des aliments**

à base de végétaux chez la truite arc en ciel, 5èmes Journées de la Recherche Filière Piscicole, Paris, 2016

- M. Dupont-Nivet, T. Callet, I. Geurden, C. Burel, L. Labbé, T. Kerneis, JM. Le Calvez, E. Quillet, F. Médale **Sélection pour la capacité à survivre et grandir avec un aliment 100% végétal chez la truite arc en ciel**, 5èmes Journées de la Recherche Filière Piscicole, Paris, 2016
- T. Callet, M. Dupont-Nivet, M. Cluzeaud, F. Jaffrezic, D. Laloë, T. Kerneis, L. Labbé, E. Quillet, I. Geurden, D. Mazurais, S. Skiba-Cassy, F. Médale **Genetic and genomics basis of adaptation to plant based diet in rainbow trout**, Séminaire des doctorants du département de Génétique Animale de l'INRA, Toulouse, 2016

Posters

- T. Callet, M. Dupont-Nivet, S. Skiba-Cassy, F. Médale **Genetic and genomics adaptation to plant-based diet in rainbow trout**, Séminaire des doctorants du département de Génétique Animale de l'INRA, La Rochelle, 2016. **Prix du meilleur poster**
- T. Callet, M. Cluzeaud, F. Jaffrezic, D. Laloë, S. Skiba-Cassy, M. Dupont-Nivet, F. Médale **Mechanisms related to plant based diet utilization in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)** Journée ABIES, 2016

Chapitre 5 : matériels et méthodes

Annexe i – Liste des amorces utilisées pour l'étude de l'expression de gènes par qPCR

Gene		Amorces	T°
18S	ARN18S	CGGAGGTTCGAAGACGATCA TCGCTAGTTGGCATCGTTTAT	56
EF1	Elongation factor	TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG ACCCGAGGGACATCCTGTG	59
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2	AACAGGTGGTGCAGGATTCC TTCAGGCCACCAACAGAAGG	60
FAS	Fatty acid synthase	TGATCTGAAGGCCCGTGCA GGGTGACGTTGCCGTGGTAT	60
ELOVL 2	Elongation of long chain fatty acids protein 2	TGTGGTTTTCCCGTTGGATGCC ACAGAGTGGCCATTTGGGCG	59
ELOVL 5	Elongation of long chain fatty acids protein 5	GAACAGCTTCATCCATGTCC TGACTGCACATATCGTCTGG	59
ELOVL6	Elongation of long chain fatty acids protein 6	TCCACCCAGCCATCTATCCA GTAGACGCGTTTGGGAGGAA	60
DELTA 6	Delta 6 Desaturase	AGGGTGCCTCTGCTAACTGG TGGTGTGGTGATGGTAGGG	60
DELTA 9	Delta 9 Desaturase	GCCGTCCGAGGGTTCTTCTT CTCTCCCCACAGGCACCAAG	60
HOAD	3-hydroxyacylA dehydrogenase	GGACAAAGTGGCACCAGCAC GGGACGGGGTTGAAGAAGTG	59
HMGCR	3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase	GAACGGTGAATGTGCTGTGT GACCATTTGGGAGCTTGTGT	60
LXR	Liver receptor X	TGCAGCAGCCGTATGTGGA GCGGCGGGAGCTTCTTGTC	60
FDPS	Farnesyl PP synthase	AGAGGAACACAACAACGCCA CCTTTGTTCCGGGGTCATGA	60
LSS	Lanosterol synthase	GCACCTCCTACACACACCA AGGATTGGAGTACTGCCGGA	60
MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase	GGCAACCGGAAGACCCTTTA ACAGGGAACAACAAGGTGGCA	60
EBP	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase	TGGTTTGCTGTCTGTGGGTT CCCAGAACCAGGCTGTTACT	60
TM7SF2	Delta(14)-sterol reductase	ACAGCCTCCTATTCCACAG AACCCGCAGATTGGAAGCTT	60
HMGCS	Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase	AGTGGCAAAGAGAGGGTGT TTGTGGTTGGAGACGAGGA	60
LSS	Lanosterol synthase	AGCAGGTGTTGTGGATCTGG GATGGCGGTGGTGTGTGTA	60
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	TGTGGATCAAGGTGAAAGGCT CATTCGCGCACTTGTCTCTG	60
CSAD	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	CCATCGCTGACATCTGTGACA GGCTCTCTCAACTCCTCATG	60
SARDH	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	TATGATGCTGGGAGGAGGCT CTGCTCCGTCAGAACCTTGT	60
CDO	Cysteine dioxygenase	GAGCATTTGGCAAAGGTAAAGCT CCCCTTCTCGTACCCCAAAA	60
SHMT	Serine Hydroxymethyltransferase	GAGAGAAGCACCGTCAGACC CAGACGCTCCAACCTCATCAA	60
GOT1	Aspartate Amino Acid Transferase 1	TCAAGAGTGGCAGGAACATCA AGCGTCTCTGAAGATGGGTGT	61
GOT2	Aspartate Amino Acid Transferase 2	TCTGTGCCAGTCCTTCTC GGAGGGTTGGACCAGGT	59

Gene		Amorces	T°
BHMT	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1(81)	CAGAGAAGCACGGTAACTGG TTCTTTGTGCTGCATCAGGT	60
BHMT2	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 2(81)	GCTGAGGAGCTAGCCACAGA GGCTTCAGCTTCTCCCAGTA	60
G6pcb2.a	Glucose-6-phosphatase 1 b2.a	ATCGGACAATACACACAGAACT CAACTGATCTATAGCTGCTGCCT	60
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	ACAGGGTGAGGCAGATGTAGG CTAGTCTGTGGAGGTCTAAGGGC	60
C3-3	Complement C3-3	AGTGGTGACAGATTCGAGTACG CTAGTTTACACATCCTTCGTTTTC	60
CFB-2	Complement factor B-2	AAGGTAGATGGCATAACATCAGAT GGATTGTGGGATAATCATCATAGT	60
LCII	Lysosyme CII	TGGATGGCTACGCTGGAAC GCGGCTGTTGATCTGGAAGA	60
C3-1	Complement c3 1	AGCCTCTGACCAGGGAGATATT GTTCAAATCCCTGACATCGTC	60
C3-3	Complement c3 3	AGTGGTGACAGATTCGAGTACG GAAAACGAAGGATGTGTAAGTAG	60
C3-4	Complement c3 4	CCTCCATGGTCAATGCAACACT TAGAGAGGCACTAGATCTGAAAG	60
CFB1	Complement factor B 1	GACACCGATCAGGAAGGAAAGA TTAGCTCCTTTTCAGTCAGCCC	60
CFB2	Complement factor B 2	AAGGTAGATGGCATAACATCAGAT ACTATGATGATTATCGCACAAATCC	60
CFB	Complement factor B	AGCTCCTTTTCAGTCAGCCC GATAGCCATGCGTTCAGGA	60
CFP	Properdin	CCCAGCTTCGTGGTCTGAAT CTCACCCCACTTGCTCCATT	60
CXCL1	Growth-regulated alpha protein	AACGGTCCTCATCAGCTTCC TGATCTCCATGTTCCATGCAGG	60
SERPINC1	Antithrombin-III	CCAGGAGACCAAGTTTCGCT AAGCTGTCTTCGATGCGGAA	60
OTOS	Otospiralin	ACCTGTAAGCTCACTGATGCC TTGGTGAGCATAGAAGGCC	60
GNAT3	Guanine nucleotide binding protein G(t) subunit alpha 3	TAGGTGGAGAGACTCGTGCA TTCGGTGCAGGATCAAGACC	60
UGT2a1	UDP-glucuronosyltransferase 2A1	TTGCTCTTACCCTGTCCAA TGTACCAGCTGTTTGACGCT	60
Galphaq		CGAATGGAGGAAAGCAAAGCA TCACATTTAGCTGGTCCATGGA	60
PomcB	Pro-opiomelanocortin B	TCCCTACCCAGTCTGTGAT GCATTGCCCTAGATAGCCCA	60
PomcA1	Pro-opiomelanocortin A1	ACTGTTCAAAAATGTCATCATCAAAG CACCTATCCTCCCTTCTCTC	60
GRM8	Metabotropic glutamate receptor 8	GCTGTACATGCCAAGGTCT TCACACAGCTCCGTCTTGAC	60
CART	Cocaine-amphetamine-related transcript	ACCATGGAGAGCTCCAG GCGCACTGCTCTCCAA	60
CRF	Corticotropin-releasing factor	ACAACGACTCAACTGAAGATCTCG AGGAAATTGAGCTTCATGTCAGG	60
NPY	Neuropeptide Y	CTCGTCTGGACCTTTATATG GTTTCATCATATCTGGACTG	60
AgRP	Agouti Related Neuropeptide	GGAAACCCGGAAGACTGTTT AGTCTCCAGCAGTGGCAGAT	60

Chapitre 6 : marqueurs potentiels trouvés à court terme

Analyse du transcriptome avant la première alimentation

Annexe ii – Résultat de l'analyse d'enrichissement d'ontologies de gènes avant le premier repas (Cutoff P-value < 0,01 ; Benjamini < 0,1).

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
R23h versus AB1h				
Énergie				
GO :0005739	Mitochondrion	368	3,92E-11	2,58E-08
GO :0044429	Mitochondrial part	200	5,92E-08	1,95E-05
GO :0055114	Oxidation reduction	224	1,15E-06	1,27E-03
GO :0005740	Mitochondrial envelope	140	2,07E-05	3,41E-03
GO :0006091	Generation of precursor metabolites and energy	132	1,86E-05	6,77E-03
GO :0031966	Mitochondrial membrane	131	9,69E-05	1,06E-02
GO :0005759	Mitochondrial matrix	77	1,37E-04	1,28E-02
GO :0031980	Mitochondrial lumen	77	1,37E-04	1,28E-02
GO :0033279	Ribosomal subunit	35	6,27E-04	4,49E-02
GO :0006084	Acetyl-coa metabolic process	24	5,78E-04	8,67E-02
Région extra-cellulaire				
GO :0005576	Extracellular region	337	1,52E-07	3,33E-05
GO :0005615	Extracellular space	105	6,21E-05	8,16E-03
Immunité				
GO :0002684	Positive regulation of immune system process	54	1,06E-05	4,21E-03
GO :0002526	Acute inflammatory response	32	2,96E-05	9,94E-03
GO :0050778	Positive regulation of immune response	37	4,55E-05	1,42E-02
GO :0009611	Response to wounding	97	5,41E-05	1,47E-02
GO :0042611	Mhc protein complex	10	2,26E-04	1,85E-02
GO :0019882	Antigen processing and presentation	18	1,18E-04	2,55E-02
GO :0050878	Regulation of body fluid levels	39	1,46E-04	2,88E-02
GO :0050900	Leukocyte migration	16	1,96E-04	3,68E-02
GO :0006955	Immune response	88	2,16E-04	3,88E-02
GO :0048584	Positive regulation of response to stimulus	49	2,27E-04	3,91E-02
GO :0006957	Complement activation, alternative pathway	11	4,27E-04	6,95E-02
GO :0002253	Activation of immune response	26	6,85E-04	9,54E-02
GO :0060326	Cell chemotaxis	12	6,82E-04	9,81E-02
Glucides				
GO :0006006	Glucose metabolic process	85	9,42E-08	4,13E-04
GO :0019318	Hexose metabolic process	92	6,10E-07	8,93E-04
GO :0005996	Monosaccharide metabolic process	98	5,72E-07	1,26E-03
GO :0016052	Carbohydrate catabolic process	65	2,00E-06	1,76E-03
GO :0044275	Cellular carbohydrate catabolic process	58	3,56E-06	2,23E-03
GO :0046365	Monosaccharide catabolic process	53	4,52E-06	2,48E-03
GO :0019320	Hexose catabolic process	53	3,48E-06	2,55E-03
GO :0006007	Glucose catabolic process	53	3,48E-06	2,55E-03
GO :0006096	Glycolysis	47	7,24E-06	3,52E-03
GO :0046164	Alcohol catabolic process	54	9,36E-06	4,10E-03
GO :0016051	Carbohydrate biosynthetic process	46	5,07E-05	1,47E-02
GO :0034637	Cellular carbohydrate biosynthetic process	35	1,40E-04	2,88E-02
Acides aminés				
GO :0043603	Cellular amide metabolic process	30	1,01E-04	2,32E-02
GO :0009072	Aromatic amino acid family metabolic process	15	5,49E-04	8,55E-02
ADN				
GO :0009265	2'-deoxyribonucleotide biosynthetic process	8	6,42E-05	1,65E-02
GO :0009394	2'-deoxyribonucleotide metabolic process	12	7,95E-05	1,92E-02
Autre				
GO :0016859	Cis-trans isomerase activity	24	6,68E-04	2,32E-01
R23h versus A22h				
Région extra-cellulaire				
GO :0005576	Extracellular region	359	6,78E-08	4,61E-05

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
Immunité				
GO :0002684	Positive regulation of immune system process	58	3,69E-06	1,66E-02
GO :0019882	Antigen processing and presentation	20	2,10E-05	4,64E-02
AB1h versus A22h				
Immunité				
GO :0006956	Complement activation	16	1,18E-07	3,66E-04
GO :0002541	Activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	16	1,54E-07	2,39E-04
GO :0048584	Positive regulation of response to stimulus	33	4,17E-06	4,31E-03
GO :0006959	Humoral immune response	16	4,32E-06	3,35E-03
GO :0002684	Positive regulation of immune system process	33	5,88E-06	3,65E-03
GO :0002253	Activation of immune response	20	6,27E-06	3,24E-03
GO :0002526	Acute inflammatory response	21	1,21E-05	5,37E-03
GO :0051605	Protein maturation by peptide bond cleavage	19	2,67E-05	1,03E-02
GO :0006957	Complement activation, alternative pathway	9	4,91E-05	1,68E-02
GO :0050778	Positive regulation of immune response	22	1,16E-04	3,56E-02
GO :0002252	Immune effector process	23	1,22E-04	3,40E-02
GO :0016485	Protein processing	20	3,13E-04	7,80E-02
GO :0051604	Protein maturation	21	3,24E-04	7,47E-02
GO :0045087	Innate immune response	20	3,43E-04	7,33E-02
Endopeptidase				
GO :0030414	Peptidase inhibitor activity	26	7,73E-05	7,96E-02
GO :0004866	Endopeptidase inhibitor activity	25	7,82E-05	4,11E-02
GO :0004197	Cysteine-type endopeptidase activity	20	3,13E-04	1,06E-01

Annexe iii – Liste de gènes différentiellement exprimés impliqués dans la production d'énergie avant le premier repas entre R23h et AB1h (Effet génotype).

SP	Description	Effet génotype
Cycle de Krebs		
Q7SX99	Fumarate hydratase, mitochondrial (fh)	R23h > AB1h
Q68FX0	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial (Idh3B)	R23h > AB1h
P41565	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial (Idh3g)	R23h > AB1h
Q6DIY9	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (mdh1)	R23h < AB1h
P11708	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (mdh1)	R23h > AB1h
Q9Z2I9	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial (Sucla2)	R23h > AB1h
Q96I99	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial (SUCLG2)	R23h > AB1h
Chaîne Respiratoire		
A3KMZ6	Cytochrome c oxidase assembly protein COX11, mitochondrial (COX11)	R23h < AB1h
P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Cox4i1)	R23h > AB1h
P12075	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial (Cox5b)	R23h > AB1h
Q8SPJ9	Cytochrome c oxidase subunit 7A1, mitochondrial (COX7A1)	R23h < AB1h
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial (COX7A2)	R23h < AB1h
O95299	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial (NDUFA10)	R23h > AB1h
Q8HXG6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11 (NDUFA11)	R23h > AB1h
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 (Ndufa12)	R23h < AB1h
Q62425	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 (Ndufa4)	R23h < AB1h
P23935	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 (NDUFA5)	R23h < AB1h
Q02373	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (NDUFB10)	R23h < AB1h
Q9CQZ6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3 (Ndufb3)	R23h > AB1h
P17568	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 (NDUFB7)	R23h > AB1h
Q641Y2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial (Ndufs2)	R23h > AB1h
P23709	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (NDUFS3)	R23h > AB1h
Q0MQH4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5 (NDUFS5)	R23h > AB1h
P42028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial (NDUFS8)	R23h > AB1h
Q28ED0	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (sdha)	R23h > AB1h
Q9YHT2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (SDHB)	R23h < AB1h
Protéine ribosomale		
Q6B860	28S ribosomal protein S14, mitochondrial (MRPS14)	R23h > AB1h
Q924T2	28S ribosomal protein S2, mitochondrial (Mrps2)	R23h > AB1h

SP	Description	Effet génotype
Q8VE22	28S ribosomal protein S23, mitochondrial (Mrps23)	R23h > AB1h
Q3B8K3	28S ribosomal protein S24-B, mitochondrial (mrps24-B)	R23h > AB1h
Q9D125	28S ribosomal protein S25, mitochondrial (Mrps25)	R23h > AB1h
Q9ER88	28S ribosomal protein S29, mitochondrial (Dap3)	R23h > AB1h
Q9D2R8	28S ribosomal protein S33, mitochondrial (Mrps33)	R23h > AB1h
Q498P2	28S ribosomal protein S35, mitochondrial (mrps35)	R23h > AB1h
Q498Z6	28S ribosomal protein S7, mitochondrial (mrps7)	R23h < AB1h
Q9CQF0	39S ribosomal protein L11, mitochondrial (Mrpl11)	R23h < AB1h
Q6DGM3	39S ribosomal protein L15, mitochondrial (mrpl15)	R23h > AB1h
Q9D8P4	39S ribosomal protein L17, mitochondrial (Mrpl17)	R23h < AB1h
Q5T653	39S ribosomal protein L2, mitochondrial (MRPL2)	R23h > AB1h
Q9D1B9	39S ribosomal protein L28, mitochondrial (MRPL28)	R23h > AB1h
Q99N95	39S ribosomal protein L3, mitochondrial (Mrpl3)	R23h > AB1h
Q58DV5	39S ribosomal protein L30, mitochondrial (MRPL30)	R23h > AB1h
Q8K2M0	39S ribosomal protein L38, mitochondrial (Mrpl38)	R23h > AB1h
P83565	39S ribosomal protein L40, mitochondrial (Mrpl40)	R23h > AB1h
P82927	39S ribosomal protein L42, mitochondrial (MRPL42)	R23h > AB1h
P59480	39S ribosomal protein L45, mitochondrial (mrpl45)	R23h > AB1h
Q5BJJ8	39S ribosomal protein L51, mitochondrial (mrpl51)	R23h < AB1h
Q1LXI5	39S ribosomal protein L54, mitochondrial (mrpl54)	R23h < AB1h
Q7Z7F7	39S ribosomal protein L55, mitochondrial (MRPL55)	R23h > AB1h
Q71TY3	40S ribosomal protein S27 (Rps27)	R23h < AB1h
P47835	40S ribosomal protein S3-B (rps3-B)	R23h > AB1h
P62864	40S ribosomal protein S30 (Fau)	R23h > AB1h
Q08364	40S ribosomal protein S5 (RPS5)	R23h > AB1h
P62243	40S ribosomal protein S8 (Rps8)	R23h < AB1h
Q4QY71	40S ribosomal protein SA (rpsa)	R23h < AB1h
P35427	60S ribosomal protein L13a (Rpl13a)	R23h > AB1h
P24049	60S ribosomal protein L17 (Rpl17)	R23h > AB1h
P61255	60S ribosomal protein L26 (Rpl26)	R23h > AB1h
P39023	60S ribosomal protein L3 (RPL3)	R23h > AB1h
P46777	60S ribosomal protein L5 (RPL5)	R23h > AB1h
Q5ZJ56	60S ribosomal protein L7 (RPL7)	R23h > AB1h
Q6PBR7	Ribosomal protein 63, mitochondrial (mrp63)	R23h > AB1h

Annexe iv – Liste de gènes différentiellement exprimés impliqués dans le métabolisme des glucides avant le premier repas entre R23h et AB1h (Effet génotype).

SP	Description	Effet génotype
Glycolyse		
P27595	Hexokinase-1 (HK1)	R23h > AB1h
P16118	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1 (PFKFB1)	R23h > AB1h
P25114	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 (Pfkfb4)	R23h > AB1h
A1A4J1	6-phosphofructokinase, liver type (PFKL)	R23h > AB1h
Q2HYU2	6-phosphofructokinase, muscle type (PFKM)	R23h > AB1h
Q92122	Pyruvate kinase muscle isozyme (pkm)	R23h > AB1h
Néoglucogénèse		
Q9Z2V4	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] (Pck1)	R23h > AB1h
P00636	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1)	R23h > AB1h
Q9Z1N1	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2 (Fbp2)	R23h < AB1h
Q19KA1	Glucose-6-phosphatase (G6PC)	R23h < AB1h
Glycolyse/Néoglucogénèse		
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)	R23h > AB1h
P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)	R23h < AB1h
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A (Aldoa)	R23h > AB1h
Q8JH71	Fructose-bisphosphate aldolase B (aldob)	R23h > AB1h
P82204	Triosephosphate isomerase (Tpi)	R23h > AB1h
O57479	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	R23h < AB1h
Q3T0P6	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	R23h > AB1h
P09041	Phosphoglycerate kinase 2 (Pkg2)	R23h > AB1h
P18669	Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)	R23h > AB1h
P15259	Phosphoglycerate mutase 2 (PGAM2)	R23h > AB1h

SP	Description	Effet génotype
P09104	Gamma-enolase (ENO2)	R23h > AB1h
P25704	Beta-enolase (ENO3)	R23h < AB1h
P15429	Beta-enolase (Eno3)	R23h > AB1h
Voie Pentose phosphate		
P85971	6-phosphogluconolactonase (PglS)	R23h < AB1h
Q2TBL6	Transaldolase (TALDO1)	R23h < AB1h
Métabolisme glycogène		
P35573	Glycogen debranching enzyme (AGL)	R23h > AB1h
P13280	Glycogenin-1 (GYG1)	R23h > AB1h
P13834	Glycogen [starch] synthase, muscle (GYS1)	R23h < AB1h
P54840	Glycogen [starch] synthase, liver (GYS2)	R23h < AB1h
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form (PYGB)	R23h > AB1h
P09811	Glycogen phosphorylase, liver form (Pygl)	R23h > AB1h
P11217	Glycogen phosphorylase, muscle form (PYGM)	R23h > AB1h
P13286	Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, skeletal muscle isoform (Phkg1)	R23h > AB1h
Q3KD65	Glycogen synthase (glgA)	R23h > AB1h

Annexe v – Liste de gènes différentiellement exprimés impliqués dans le métabolisme azoté avant le premier repas entre R23h et AB1h (**Effet génotype**).

SP	Description	Effet génotype
L-lysine		
Q01205	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (Dlst)	R23h < AB1h
L-phenylalanine		
P16930	Fumarylacetoacetase (FAH)	R23h > AB1h
P04176	Phenylalanine-4-hydroxylase (Pah)	R23h > AB1h
P17276	Protein henna (Hn)	R23h > AB1h
Q6TGZ5	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (hpd)	R23h > AB1h
Q09173	Homogentisate 1,2-dioxygenase (Hgd)	R23h > AB1h
L-tryptophane		
Q7SY53	Tryptophan 2,3-dioxygenase B (tdo2b)	R23h > AB1h
A7MBU6	Tryptophan 2,3-dioxygenase A (tdo2a)	R23h > AB1h
P48776	Tryptophan 2,3-dioxygenase (Tdo2)	R23h > AB1h
L-kynurenine		
A9V3C0	Kynureninase (kynu)	R23h > AB1h
Q9ERD9	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (Ido1)	R23h < AB1h
L-alanine (transamination)		
Q3UEG6	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial (Agxt2)	R23h < AB1h
Q5E9S4	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 (AGXT2L1)	R23h < AB1h
L-aspartate		
Q66159	Putative L-aspartate dehydrogenase (aspdh)	R23h < AB1h
L-arginine		
Q3SZJ0	Argininosuccinate lyase (ASL)	R23h > AB1h
Sérotonine		
Q92142	Tryptophan 5-hydroxylase (tph)	R23h < AB1h
Cycle de l'urée		
P11725	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial (Otc)	R23h < AB1h
P78540	Arginase-2, mitochondrial (ARG2)	R23h > AB1h
P49900	Arginase, hepatic	R23h > AB1h
A1L259	2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazole decarboxylase (prhoxnb)	R23h < AB1h
Autre		
P00504	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (GOT1)	R23h > AB1h
Q0VCW4	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase (SDS)	R23h > AB1h
Q6JHU8	Prolyl 3-hydroxylase 1 (LEPRE1)	R23h < AB1h
Q8IVL6	Prolyl 3-hydroxylase 3 (LEPREL2)	R23h < AB1h
Q60716	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 (P4ha2)	R23h < AB1h
P55809	Succinyl-CoA :3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial (OXCT1)	R23h > AB1h

Annexe vi – Liste de gènes différentiellement exprimés impliqués dans l’immunité avant le premier repas entre R23h, AB1h et A22h (Effet génotype).

SP	Description	Effet génotype
Complement		
Q2UVX4	Complement C3 (C3)	R23h >AB1h ; R23h >A22h ; AB1h <A22h
Q69DL0	Complement C1q subcomponent subunit A	R23 <A22h
P31722	Complement C1q subcomponent subunit C (C1qc)	AB1h <A22h
P08649	Complement C4 (C4)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
Q63514	C4b-binding protein alpha chain (C4bpa)	R23h >AB1h
Q63514	C4b-binding protein alpha chain (C4bpa)	R23h >A22h
P10643	Complement component C7 (C7)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
Q90X85	Complement component C8 beta chain (c8b)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
P04186	Complement factor B (Cfb)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P81187	Complement factor B (CFB)	R23h <A22h ; AB1h <A22h
P00746	Complement factor D (CFD)	R23h <A22h ; AB1h <A22h
Q28085	Complement factor H (CFH)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P06909	Complement factor H (Cfh)	R23h <AB1h ; AB1h >A22h
P08603	Complement factor H (CFH)	R23h <A22h
Q03591	Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)	AB1h <A22h
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (CFHR5)	R23h <AB1h ; AB1h >A22h
Q9WUW3	Complement factor I (Cfi)	R23h <A22h ; AB1h <A22h
Q5R5A4	Complement factor I (CFI)	R23h >A22h
Q5RBP8	Properdin (CFP)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P27918	Properdin (CFP)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
P17927	Complement receptor type 1 (CR1)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
P20023	Complement receptor type 2 (CR2)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P98093	Complement C3	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P98093	Complement C3	AB1h <A22h
Présentation d’antigène		
P15980	SLA class II histocompatibility antigen, DQ haplotype C alpha chain	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P15979	Class I histocompatibility antigen, F10 alpha chain	R23h >AB1h ; R23h >A22h
P14436	H-2 class II histocompatibility antigen, A-R alpha chain	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P13752	BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-6	R23h >AB1h
P15981	SLA class II histocompatibility antigen, DQ haplotype D alpha chain	R23h <AB1h
P15981	SLA class II histocompatibility antigen, DQ haplotype D alpha chain	R23h <A22h
P10247	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain (Cd74)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (CD74)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (CD74)	AB1h <A22h
P01910	H-2 class II histocompatibility antigen, A-K alpha chain (H2-Aa)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P14483	H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain (H2-Ab1)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P06343	H-2 class II histocompatibility antigen, A-K beta chain (H2-Ab1)	R23h <A22h
P18468	H-2 class II histocompatibility antigen, I-A beta chain (H2-Eb1)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
Q29983	MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA)	R23h <AB1h
Q9BCU3	Major histocompatibility complex class I-related gene protein (MR1)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
O19477	Major histocompatibility complex class I-related gene protein (Mr1)	R23h <A22h
P23150	H-2 class II histocompatibility antigen, I-E alpha chain	R23h <AB1h ; R23h <A22h
Q9R233	Tapasin (Tapbp)	R23h <A22h
Q9JJ22	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Erap1)	R23h >AB1h
A6QPT7	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2)	R23h <AB1h
P21958	Antigen peptide transporter 1 (Tap1)	R23h <AB1h
Q03519	Antigen peptide transporter 2 (TAP2)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
P50995	Annexin A11 (ANXA11)	R23h >AB1h
Q04475	Beta-2-microglobulin (b2m)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
Q4JHE3	L-amino-acid oxidase (2 S)	R23h <AB1h
O02703	Apoptosis regulator BAX (BAX)	R23h <AB1h
O60238	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BNIP3L)	R23h <AB1h
Coagulation		
P25155	Coagulation factor X (F10)	R23h >AB1h
P00488	Coagulation factor XIII A chain (F13A1)	R23h >AB1h
Q19AZ8	Prothrombin (F2)	R23h >AB1h
P20352	Tissue factor (F3)	R23h <AB1h
O88783	Coagulation factor V (F5)	R23h >AB1h
O18806	Coagulation factor VIII (F8)	R23h >AB1h
P16294	Coagulation factor IX (F9)	R23h >AB1h

SP	Description	Effet génotype
P02675	Fibrinogen beta chain (FGB)	R23h >AB1h
P02679	Fibrinogen gamma chain (FGG)	R23h <AB1h
P17634	Fibrinogen gamma chain (fgg)	R23h >AB1h
P26644	Beta-2-glycoprotein 1 (ApoH)	R23h <AB1h
P56400	Platelet glycoprotein Ib beta chain (Gp1bb)	R23h <AB1h
Interferon		
Q5RBE1	Interferon-induced guanylate-binding protein 1 (GBP1)	R23h >AB1h
P13284	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (IFI30)	R23h >AB1h
P13284	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (IFI30)	R23h <A22h
Q53G44	Interferon-induced protein 44-like (IFI44L)	R23h >AB1h
Q9P0W0	Interferon kappa (IFNK)	R23h >A22h
P23611	Interferon regulatory factor 8 (Irf8)	R23h >AB1h
Interleukine		
Q6A2H4	Interleukin-10 (IL10)	R23h >AB1h
O62675	Pro-interleukin-16 (IL16)	R23h >AB1h
Q9HB29	Interleukin-1 receptor-like 2 (IL1RL2)	R23h <AB1h ; AB1h >A22h
P08317	Interleukin-8 (IL8)	R23h >AB1h
Q6NZ06	Interleukin enhancer-binding factor 2 homolog (ilf2)	R23h <AB1h
Q62406	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (Irak1)	R23h >A22h
Q8K4B2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (Irak3)	R23h >A22h
Chemokine		
Q68Y88	C-C motif chemokine 13 (CCL13)	R23h <AB1h
Q16627	C-C motif chemokine 14 (CCL14)	R23h <AB1h
O95715	C-X-C motif chemokine 14 (CXCL14)	R23h >AB1h
Tumor necrosis factor		
P25963	NF-kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA)	R23h >AB1h
Q9BYH8	NF-kappa-B inhibitor zeta (NFKBIZ)	R23h >AB1h
P98066	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TNFAIP6)	R23h <AB1h
B5X737	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2 (tnfaip8l2)	AB1h <A22h
Q9Y275	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B (TNFSF13B)	R23h <AB1h
Q12933	TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)	R23h <A22h
Q7YRL5	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (CD40)	R23h <A22h
Q62689	Tyrosine-protein kinase JAK2 (Jak2)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
Q8JFG3	Tumor necrosis factor (tnf)	R23h <AB1h
Régulation de la prolifération cellulaire		
Q10741	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
Q9Z1K9	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (Adam17)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
B1AXD8	Akirin-2 (Akirin2)	R23h <AB1h
O08530	Sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1pr1)	AB1h <A22h
O08775	Vascular endothelial growth factor receptor 2 (Kdr)	AB1h <A22h
O19002	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
O19002	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A)	AB1h <A22h
O43639	Cytoplasmic protein NCK2 (NCK2)	R23h <A22h
P23492	Purine nucleoside phosphorylase (Np)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P00491	Purine nucleoside phosphorylase (NP)	R23h >AB1h
P01282	VIP peptides (VIP)	R23h >AB1h
P04626	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (ERBB2)	R23h <AB1h
P05696	Protein kinase C alpha type (Prkca)	R23h <AB1h ; AB1h >A22h
P18418	Calreticulin (Calr)	R23h <A22h
P32261	Antithrombin-III (Serpinc1)	R23h >AB1h
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 (TGM2)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P26684	Endothelin-1 receptor (Ednra)	R23h <AB1h
P29279	Connective tissue growth factor (CTGF)	R23h >AB1h
P81718	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (Ptpn6)	R23h <AB1h
P29351	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (Ptpn6)	R23h <A22h
P30371	Transforming growth factor beta-2 (TGFB2)	R23h <AB1h
Q92176	Coronin-1A (CORO1A)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
Q91ZN1	Coronin-1A (Coro1a)	R23h <AB1h ; R23h <A22h ; AB1h <A22h
P31146	Coronin-1A (CORO1A)	R23h <A22h ; AB1h <A22h
Q03181	Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARD)	R23h >AB1h
Q04656	Copper-transporting ATPase 1 (ATP7A)	R23h <AB1h
Q63673	Sonic hedgehog protein (Shh)	R23h >AB1h
Q90999	TGF-beta receptor type-2 (TGFB2)	R23h >AB1h ; R23h >A22h ; AB1h >A22h
Q64640	Adenosine kinase (Adk)	R23h >AB1h

SP	Description	Effet génotype
Réponse inflammatoire		
P81491	Serum amyloid A-5 protein (1 S)	R23h <AB1h
O19062	C-reactive protein (CRP)	R23h >AB1h
P05366	Serum amyloid A-1 protein (Saa1)	R23h <AB1h ; AB1h <A22h
P35543	Serum amyloid A-3 protein (SAA3)	R23h <AB1h
P09034	Argininosuccinate synthase (Ass1)	AB1h <A22h
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	AB1h <A22h
Q03626	Murineoglobulin-1 (Mug1)	R23h >AB1h
P59046	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12 (NLRP12)	R23h <AB1h
P59046	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12 (NLRP12)	AB1h <A22h
A6QLE5	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3)	AB1h <A22h
B2LT62	Toll-like receptor 2 (TLR2)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
O15455	Toll-like receptor 3 (TLR3)	R23h >AB1h ; R23h <A22h
O15553	Pyrin (MEFV)	R23h <AB1h
O46678	Growth-regulated alpha protein (CXCL1)	R23h >AB1h
O60356	Nuclear protein 1 (NUPR1)	R23h >AB1h
O60449	Lymphocyte antigen 75 (LY75)	R23h >AB1h
P01044	Kininogen-1 (KNG1)	R23h >AB1h
P01042	Kininogen-1 (KNG1)	R23h <AB1h
P03952	Plasma kallikrein (KLKB1)	R23h >AB1h
P14272	Plasma kallikrein (KlkB1)	AB1h <A22h
P07589	Fibronectin (FN1)	AB1h <A22h
P08037	Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1)	R23h >AB1h
P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1)	R23h <AB1h
P31230	Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1 (Aimp1)	R23h <AB1h
P34913	Epoxide hydrolase 2 (EPHX2)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P43405	Tyrosine-protein kinase SYK (SYK)	R23h <AB1h ; R23h <A22h ; AB1h <A22h
Q64725	Tyrosine-protein kinase SYK (Syk)	R23h <AB1h ; R23h <A22h ; AB1h <A22h
P55009	Allograft inflammatory factor 1 (Aif1)	R23h <AB1h
Q2HJA4	Proteinase-activated receptor 2 (F2RL1)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
P55086	Proteinase-activated receptor 2 (F2r11)	R23h >AB1h
P79391	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (OLR1)	R23h >AB1h
P83038	Histone deacetylase 4 (HDAC4)	R23h >AB1h
Q01201	Transcription factor RelB (RELB)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
Q12968	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3 (NFATC3)	R23h >AB1h
Q28178	Thrombospondin-1 (THBS1)	R23h <A22h
Q5ZM39	B-cell lymphoma 6 protein homolog (BCL6)	R23h <A22h
Q9NPH5	NADPH oxidase 4 (NOX4)	R23h <AB1h
Q9UP65	Cytosolic phospholipase A2 gamma (PLA2G4C)	R23h >AB1h
Q9Y239	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1)	R23h <AB1h ; AB1h >A22h
Q6E804	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2)	R23h >A22h
Réponse immunitaire innée		
O96382	Putative defense protein Hdd11 (2 S)	AB1h <A22h
O88890	SH2 domain-containing protein 1A (Sh2d1a)	R23h <AB1h
P01867	Ig gamma-2B chain C region (Igh-3)	R23h >A22h
P15814	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1)	R23h >AB1h
P42683	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK (LCK)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
P59470	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2 (Polr3b)	R23h >AB1h
P59470	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2 (Polr3b)	R23h >A22h
Q5E9Z7	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC4 (POLR3D)	R23h <A22h
Q5E9Z7	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC4 (POLR3D)	AB1h <A22h
P97412	Lysosomal-trafficking regulator (Lyst)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
Q502K2	SAM domain and HD domain-containing protein 1 (samhd1)	R23h >AB1h
Q5ZL74	Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)	R23h >AB1h
Q8HY11	C-type lectin domain family 4 member M (CLEC4M)	R23h <AB1h
Q96EY1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial (DNAJA3)	R23h >AB1h ; R23h >A22h
Q9H257	Caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
Q9JJS8	Mannan-binding lectin serine protease 2 (Masp2)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
Q9UDY8	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (MALT1)	R23h >AB1h ; AB1h <A22h
Régulation de la différenciation des lymphocytes T NK		
O00203	AP-3 complex subunit beta-1 (AP3B1)	R23h <AB1h ; R23h <A22h
Q865S1	AP-3 complex subunit delta-1 (AP3D1)	R23h <A22h

Analyse du transcriptome après 5 semaines alimentation

Annexe vii – Résultat de l'analyse d'enrichissement d'ontologies de gènes après 5 semaines d'alimentation (Cutoff P-value < 0,01 ; Benjamini < 0,1).

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
R23h versus AB1h				
Région extra-cellulaire				
GO :0005576	Extracellular region	174	5,39E-16	2,53E-13
GO :0044421	Extracellular region part	88	1,78E-08	4,05E-06
GO :0031012	Extracellular matrix	54	4,14E-08	4,72E-06
GO :0044420	Extracellular matrix part	23	4,62E-05	4,20E-03
GO :0022610	Biological adhesion	70	1,78E-05	2,23E-02
GO :0007155	Cell adhesion	70	1,59E-05	3,95E-02
GO :0005581	Collagen	10	1,00E-03	4,47E-02
GO :0005615	Extracellular space	43	1,68E-03	6,74E-02
Endopeptidase				
GO :0005578	Proteinaceous extracellular matrix	52	3,55E-08	5,40E-06
GO :0004867	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	18	3,35E-06	3,18E-03
GO :0004866	Endopeptidase inhibitor activity	21	3,89E-05	1,23E-02
GO :0004857	Enzyme inhibitor activity	30	6,64E-05	1,57E-02
GO :0030414	Peptidase inhibitor activity	21	9,13E-05	1,72E-02
Lysosome				
GO :0005764	Lysosome	32	1,51E-04	9,82E-03
GO :0000323	Lytic vacuole	32	1,76E-04	9,99E-03
GO :0005773	Vacuole	35	2,20E-04	1,11E-02
Acides aminés				
GO :0047150	Betaine-homocysteine s-methyltransferase activity	5	1,34E-05	6,36E-03
GO :0008898	Homocysteine s-methyltransferase activity	5	4,77E-04	7,29E-02
Immunité				
GO :0042611	Mhc protein complex	7	1,44E-04	1,09E-02
GO :0006955	Immune response	42	5,18E-05	4,29E-02
R23h versus A22h				
Région extra-cellulaire				
GO :0005576	Extracellular region	142	7,20E-08	3,31E-05
GO :0022610	Biological adhesion	69	9,76E-06	1,26E-02
GO :0007155	Cell adhesion	69	8,60E-06	2,21E-02
GO :0032288	Myelin assembly	6	6,41E-05	4,08E-02
Immunité				
GO :0048002	Antigen processing and presentation of peptide antigen	9	7,19E-05	3,67E-02
GO :0019882	Antigen processing and presentation	10	3,11E-04	8,60E-02
GO :0002478	Antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen	6	3,09E-04	9,56E-02
Processus du système neurologique				
GO :0050877	Neurological system process	65	1,93E-05	1,66E-02
GO :0007600	Sensory perception	34	1,55E-04	6,49E-02
Acides aminés				
GO :0047150	Betaine-homocysteine s-methyltransferase activity	5	1,27E-05	1,16E-02
GO :0000097	Sulfur amino acid biosynthetic process	8	2,27E-04	8,09E-02

Chapitre 7 : Marqueurs potentiels trouvés à long terme

Analyse du transcriptome hépatique

Annexe viii – Résultat de l'analyse d'enrichissement d'ontologies de gènes dans le foie, après 6 mois d'alimentation (Cutoff P-value < 0,01 ; Benjamini < 0,1).

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
R23h versus A22h				
Énergie et métabolisme				
GO :0005739	Mitochondrion	212	4,59E-28	2,21E-25
GO :0044429	Mitochondrial part	139	1,74E-27	4,19E-25
GO :0006091	Generation of precursor metabolites and energy	107	6,24E-26	1,68E-22
GO :0005743	Mitochondrial inner membrane	92	2,98E-23	4,77E-21
GO :0055114	Oxidation reduction	147	1,18E-23	1,59E-20
GO :0005740	Mitochondrial envelope	105	1,85E-22	2,23E-20
GO :0019866	Organelle inner membrane	93	1,77E-21	1,70E-19
GO :0031966	Mitochondrial membrane	100	2,36E-21	1,89E-19
GO :0070469	Respiratory chain	41	2,06E-17	1,42E-15
GO :0031967	Organelle envelope	115	2,11E-16	1,33E-14
GO :0045333	Cellular respiration	43	3,08E-17	2,76E-14
GO :0031975	Envelope	116	5,35E-16	2,96E-14
GO :0031980	Mitochondrial lumen	55	1,71E-12	8,21E-11
GO :0005759	Mitochondrial matrix	55	1,71E-12	8,21E-11
GO :0022900	Electron transport chain	45	3,06E-13	2,05E-10
GO :0022904	Respiratory electron transport chain	25	4,96E-12	2,22E-09
GO :0015980	Energy derivation by oxidation of organic compounds	44	4,58E-12	2,46E-09
GO :0006119	Oxidative phosphorylation	33	4,64E-11	1,78E-08
GO :0051186	Cofactor metabolic process	53	7,63E-11	2,56E-08
GO :0015078	Hydrogen ion transmembrane transporter activity	36	2,69E-10	1,34E-07
GO :0048037	Cofactor binding	65	2,18E-10	2,17E-07
GO :0045259	Proton-transporting atp synthase complex	20	5,52E-09	2,41E-07
GO :0009060	Aerobic respiration	23	1,35E-09	2,80E-07
GO :0031090	Organelle membrane	128	7,72E-09	3,09E-07
GO :0006732	Coenzyme metabolic process	44	1,87E-09	3,60E-07
GO :0015077	Monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	36	3,77E-09	1,25E-06
GO :0004807	Triose-phosphate isomerase activity	8	1,05E-08	2,10E-06
GO :0044275	Cellular carbohydrate catabolic process	35	1,59E-08	2,67E-06
GO :0008137	Nadh dehydrogenase (ubiquinone) activity	17	7,22E-08	1,20E-05
GO :0009109	Coenzyme catabolic process	18	9,61E-08	1,52E-05
GO :0050136	Nadh dehydrogenase (quinone) activity	17	1,09E-07	1,55E-05
GO :0016469	Proton-transporting two-sector atpase complex	22	5,01E-07	1,85E-05
GO :0022890	Inorganic cation transmembrane transporter activity	40	1,50E-07	1,87E-05
GO :0015986	Atp synthesis coupled proton transport	22	1,43E-07	2,13E-05
GO :0015985	Energy coupled proton transport, - electrochemical gradient	22	1,43E-07	2,13E-05
GO :0003954	Nadh dehydrogenase activity	17	2,36E-07	2,61E-05
GO :0051187	Cofactor catabolic process	18	2,75E-07	3,36E-05
GO :0044271	Nitrogen compound biosynthetic process	65	2,73E-07	3,49E-05
GO :0034220	Ion transmembrane transport	23	2,64E-07	3,54E-05
GO :0042773	Atp synthesis coupled electron transport	15	4,74E-07	4,71E-05
GO :0006818	Hydrogen transport	24	5,45E-07	5,23E-05
GO :0016655	Oxidoreductase activity, acting on nadh or nadph, quinone or similar compound as acceptor	17	9,51E-07	8,61E-05
GO :0015992	Proton transport	23	1,66E-06	1,49E-04
GO :0016620	Oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, nad or nadp as acceptor	16	2,58E-06	2,15E-04
GO :0006099	Tricarboxylic acid cycle	15	4,92E-06	4,14E-04
GO :0046356	Acetyl-coa catabolic process	15	4,92E-06	4,14E-04
GO :0006769	Nicotinamide metabolic process	16	6,06E-06	4,79E-04
GO :0046496	Nicotinamide nucleotide metabolic process	16	6,06E-06	4,79E-04
GO :0000036	Acyl carrier activity	8	6,57E-06	5,03E-04

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0009820	Alkaloid metabolic process	16	6,98E-06	5,21E-04
GO :0005507	Copper ion binding	20	9,34E-06	6,64E-04
GO :0016651	Oxidoreductase activity, acting on nadh or nadph	21	1,11E-05	7,34E-04
GO :0042579	Microbody	24	2,46E-05	8,44E-04
GO :0005777	Peroxisome	24	2,46E-05	8,44E-04
GO :0031406	Carboxylic acid binding	29	1,48E-05	9,22E-04
GO :0045261	Proton-transporting atp synthase complex, catalytic core f(1)	10	3,01E-05	9,66E-04
GO :0006084	Acetyl-coa metabolic process	16	1,57E-05	1,00E-03
GO :0030964	Nadh dehydrogenase complex	8	4,07E-05	1,22E-03
GO :0045271	Respiratory chain complex i	8	4,07E-05	1,22E-03
GO :0005747	Mitochondrial respiratory chain complex i	8	4,07E-05	1,22E-03
GO :0043648	Dicarboxylic acid metabolic process	13	2,72E-05	1,62E-03
GO :0033293	Monocarboxylic acid binding	14	2,93E-05	1,71E-03
GO :0015002	Heme-copper terminal oxidase activity	14	3,37E-05	1,86E-03
GO :0016675	Oxidoreductase activity, acting on heme group of donors	14	3,37E-05	1,86E-03
GO :0016676	Oxidoreductase activity, acting on heme group of donors, oxygen as acceptor	14	3,37E-05	1,86E-03
GO :0004129	Cytochrome-c oxidase activity	14	3,37E-05	1,86E-03
GO :0050662	Coenzyme binding	39	4,67E-05	2,45E-03
GO :0016054	Organic acid catabolic process	23	5,55E-05	3,04E-03
GO :0046395	Carboxylic acid catabolic process	23	5,55E-05	3,04E-03
GO :0006739	Nadp metabolic process	11	6,72E-05	3,54E-03
GO :0030062	Mitochondrial tricarboxylic acid cycle enzyme complex	6	1,55E-04	4,37E-03
GO :0016885	Ligase activity, forming carbon-carbon bonds	8	1,29E-04	5,84E-03
GO :0046933	Hydrogen ion transporting atp synthase activity, rotational mechanism	11	1,27E-04	6,01E-03
GO :0016877	Ligase activity, forming carbon-sulfur bonds	11	1,27E-04	6,01E-03
GO :0046034	Atp metabolic process	26	1,29E-04	6,38E-03
GO :0045263	Proton-transporting atp synthase complex, coupling factor f(o)	10	2,46E-04	6,56E-03
GO :0009055	Electron carrier activity	35	1,59E-04	6,86E-03
GO :0006754	Atp biosynthetic process	24	1,65E-04	7,91E-03
GO :0004776	Succinate-coa ligase (gdp-forming) activity	5	2,28E-04	9,04E-03
GO :0051287	Nad or nadh binding	18	2,27E-04	9,37E-03
GO :0033178	Proton-transporting two-sector atpase complex, catalytic domain	11	4,46E-04	1,12E-02
GO :0045239	Tricarboxylic acid cycle enzyme complex	6	4,71E-04	1,13E-02
GO :0004601	Peroxidase activity	11	4,04E-04	1,43E-02
GO :0016684	Oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	11	4,04E-04	1,43E-02
GO :0019748	Secondary metabolic process	18	3,27E-04	1,43E-02
GO :0030170	Pyridoxal phosphate binding	18	3,97E-04	1,46E-02
GO :0006733	Oxidoreduction coenzyme metabolic process	16	3,38E-04	1,46E-02
GO :0016861	Intramolecular oxidoreductase activity, interconverting aldoses and ketoses	9	4,30E-04	1,47E-02
GO :0046961	Proton-transporting atpase activity, rotational mechanism	11	4,60E-04	1,52E-02
GO :0016053	Organic acid biosynthetic process	29	3,75E-04	1,59E-02
GO :0046394	Carboxylic acid biosynthetic process	29	3,75E-04	1,59E-02
GO :0033177	Proton-transporting two-sector atpase complex, proton-transporting domain	11	8,22E-04	1,87E-02
GO :0003857	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase activity	6	6,54E-04	2,08E-02
GO :0005506	Iron ion binding	48	6,79E-04	2,09E-02
GO :0044455	Mitochondrial membrane part	16	1,02E-03	2,21E-02
GO :0004313	[acyl-carrier-protein] s-acetyltransferase activity	4	7,99E-04	2,38E-02
GO :0004319	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (nadph, b-specific) activity	4	7,99E-04	2,38E-02
GO :0019171	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	4	7,99E-04	2,38E-02
GO :0016631	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity	4	7,99E-04	2,38E-02
GO :0004317	3-hydroxypalmitoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	4	7,99E-04	2,38E-02
GO :0031177	Phosphopantetheine binding	6	8,73E-04	2,46E-02
GO :0016209	Antioxidant activity	13	8,61E-04	2,49E-02
GO :0046653	Tetrahydrofolate metabolic process	6	8,09E-04	3,10E-02
GO :0005746	Mitochondrial respiratory chain	8	1,61E-03	3,19E-02
GO :0042775	Mitochondrial atp synthesis coupled electron transport	9	9,76E-04	3,48E-02
GO :0030060	L-malate dehydrogenase activity	5	1,40E-03	3,70E-02

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0016769	Transferase activity, transferring nitrogenous groups	12	1,37E-03	3,73E-02
GO :0042168	Heme metabolic process	8	1,09E-03	3,84E-02
GO :0004314	[acyl-carrier-protein] s-malonyltransferase activity	4	1,55E-03	3,97E-02
GO :0016419	S-malonyltransferase activity	4	1,55E-03	3,97E-02
GO :0016420	Malonyltransferase activity	4	1,55E-03	3,97E-02
GO :0004316	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity	4	1,55E-03	3,97E-02
GO :0016774	Phosphotransferase activity, carboxyl group as acceptor	5	1,95E-03	4,86E-02
GO :0006108	Malate metabolic process	6	1,72E-03	5,56E-02
GO :0008453	Alanine-glyoxylate transaminase activity	4	2,62E-03	6,02E-02
GO :0016297	Acyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase activity	4	2,62E-03	6,02E-02
GO :0004320	Oleoyle-[acyl-carrier-protein] hydrolase activity	4	2,62E-03	6,02E-02
GO :0016615	Malate dehydrogenase activity	6	2,86E-03	6,41E-02
GO :0004774	Succinate-coa ligase activity	5	3,47E-03	7,57E-02
GO :0006800	Oxygen and reactive oxygen species metabolic process	11	2,58E-03	7,93E-02
GO :0006544	Glycine metabolic process	7	2,65E-03	8,04E-02
GO :0004315	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase activity	4	4,05E-03	8,59E-02
GO :0016418	S-acetyltransferase activity	4	4,05E-03	8,59E-02
GO :0004372	Glycine hydroxymethyltransferase activity	6	4,19E-03	8,70E-02
GO :0006801	Superoxide metabolic process	7	3,10E-03	9,14E-02
GO :0019867	Outer membrane	18	5,10E-03	9,37E-02
Immunité				
GO :0002526	Acute inflammatory response	21	3,74E-07	4,19E-05
GO :0006956	Complement activation	14	3,72E-07	4,35E-05
GO :0002541	Activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	14	4,68E-07	4,84E-05
GO :0006959	Humoral immune response	14	8,38E-06	5,93E-04
GO :0002252	Immune effector process	22	1,29E-05	8,46E-04
GO :0006954	Inflammatory response	29	3,66E-05	2,09E-03
GO :0050778	Positive regulation of immune response	20	4,72E-05	2,64E-03
GO :0002253	Activation of immune response	16	7,20E-05	3,72E-03
GO :0048584	Positive regulation of response to stimulus	24	4,39E-04	1,83E-02
GO :0045087	Innate immune response	17	5,63E-04	2,23E-02
GO :0006957	Complement activation, alternative pathway	7	7,12E-04	2,78E-02
GO :0002449	Lymphocyte mediated immunity	13	8,98E-04	3,30E-02
GO :0002684	Positive regulation of immune system process	23	1,29E-03	4,34E-02
GO :0016064	Immunoglobulin mediated immune response	11	1,94E-03	6,17E-02
GO :0006952	Defense response	35	2,14E-03	6,70E-02
GO :0002443	Leukocyte mediated immunity	13	2,92E-03	8,72E-02
GO :0019724	B cell mediated immunity	11	1,94E-03	6,17E-02
GO :0051605	Protein maturation by peptide bond cleavage	14	9,52E-04	3,45E-02
Lipides				
GO :0006631	Fatty acid metabolic process	39	4,49E-07	4,83E-05
GO :0006633	Fatty acid biosynthetic process	17	1,24E-03	4,25E-02
Particule lipidique				
GO :0005811	Lipid particle	8	1,18E-03	2,44E-02
Acides aminés				
GO :0043603	Cellular amide metabolic process	23	8,92E-09	1,60E-06
GO :0009063	Cellular amino acid catabolic process	17	1,93E-04	8,92E-03
GO :0009069	Serine family amino acid metabolic process	11	4,57E-04	1,87E-02
GO :0009310	Amine catabolic process	17	8,78E-04	3,27E-02
Glucides				
GO :0019320	Hexose catabolic process	35	6,07E-10	1,81E-07
GO :0006007	Glucose catabolic process	35	6,07E-10	1,81E-07
GO :0046365	Monosaccharide catabolic process	35	7,59E-10	1,86E-07
GO :0046164	Alcohol catabolic process	36	7,56E-10	2,03E-07
GO :0006096	Glycolysis	32	1,00E-09	2,25E-07
GO :0016052	Carbohydrate catabolic process	36	1,50E-07	2,12E-05
GO :0004365	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity	11	2,46E-07	2,45E-05
GO :0008943	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity	11	2,46E-07	2,45E-05
GO :0006006	Glucose metabolic process	41	1,10E-06	1,01E-04
GO :0005996	Monosaccharide metabolic process	47	1,89E-06	1,64E-04
GO :0006094	Gluconeogenesis	11	5,19E-04	2,09E-02
GO :0046364	Monosaccharide biosynthetic process	12	1,20E-03	4,15E-02

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0019319	Hexose biosynthetic process	11	1,59E-03	5,27E-02
GO :0019318	Hexose metabolic process	43	6,86E-06	5,27E-04
GO :0006098	Pentose-phosphate shunt	10	2,72E-05	1,59E-03
Nucléotides				
GO :0009144	Purine nucleoside triphosphate metabolic process	32	5,25E-06	4,28E-04
GO :0009141	Nucleoside triphosphate metabolic process	32	7,91E-06	5,75E-04
GO :0009205	Purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	31	8,82E-06	6,08E-04
GO :0009199	Ribonucleoside triphosphate metabolic process	31	8,82E-06	6,08E-04
GO :0009145	Purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	29	9,35E-06	6,28E-04
GO :0009142	Nucleoside triphosphate biosynthetic process	29	9,35E-06	6,28E-04
GO :0019362	Pyridine nucleotide metabolic process	16	1,78E-05	1,11E-03
GO :0009201	Ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	28	2,10E-05	1,28E-03
GO :0009206	Purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	28	2,10E-05	1,28E-03
GO :0009150	Purine ribonucleotide metabolic process	33	6,13E-05	3,29E-03
GO :0009152	Purine ribonucleotide biosynthetic process	30	8,47E-05	4,29E-03
GO :0009259	Ribonucleotide metabolic process	33	1,57E-04	7,62E-03
GO :0009165	Nucleotide biosynthetic process	38	1,83E-04	8,59E-03
GO :0009260	Ribonucleotide biosynthetic process	30	2,03E-04	9,18E-03
GO :0034654	Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process	38	3,10E-04	1,38E-02
GO :0034404	Nucleobase, nucleoside and nucleotide biosynthetic process	38	3,10E-04	1,38E-02
GO :0006164	Purine nucleotide biosynthetic process	31	8,70E-04	3,29E-02
GO :0006163	Purine nucleotide metabolic process	34	1,64E-03	5,37E-02
Vitamines				
GO :0009374	Biotin binding	7	5,88E-05	2,93E-03
GO :0070279	Vitamin b6 binding	18	3,97E-04	1,46E-02
GO :0019842	Vitamin binding	40	6,18E-09	1,54E-06
Activité glutathione transferase				
GO :0004364	Glutathione transferase activity	7	2,06E-03	5,02E-02
Activité nucléotide kinase				
GO :0004797	Thymidine kinase activity	4	3,30E-04	1,26E-02
GO :0019205	Nucleobase, nucleoside, nucleotide kinase activity	11	2,42E-03	5,71E-02
GO :0019136	Deoxynucleoside kinase activity	4	4,05E-03	8,59E-02
AB1h versus A22h				
Énergie et métabolisme				
GO :0005739	Mitochondrion	417	9,04E-81	4,95E-78
GO :0006091	Generation of precursor metabolites and energy	212	7,74E-68	2,59E-64
GO :0044429	Mitochondrial part	257	2,91E-62	7,98E-60
GO :0005743	Mitochondrial inner membrane	177	3,62E-56	6,61E-54
GO :0005740	Mitochondrial envelope	200	7,13E-54	9,77E-52
GO :0019866	Organelle inner membrane	179	2,90E-52	3,17E-50
GO :0031966	Mitochondrial membrane	191	1,84E-51	1,68E-49
GO :0031967	Organelle envelope	217	1,56E-40	1,22E-38
GO :0031975	Envelope	218	5,00E-39	3,43E-37
GO :0045259	Proton-transporting atp synthase complex	53	4,96E-37	3,02E-35
GO :0015078	Hydrogen ion transmembrane transporter activity	81	8,43E-33	1,04E-29
GO :0016469	Proton-transporting two-sector atpase complex	57	1,30E-28	7,10E-27
GO :0015077	Monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	81	1,71E-29	1,05E-26
GO :0055114	Oxidation reduction	217	2,72E-28	4,55E-25
GO :0006119	Oxidative phosphorylation	66	9,84E-28	1,10E-24
GO :0031090	Organelle membrane	248	3,32E-26	1,65E-24
GO :0015992	Proton transport	60	2,08E-27	1,74E-24
GO :0045261	Proton-transporting atp synthase complex, catalytic core f(1)	30	6,10E-26	2,79E-24
GO :0006818	Hydrogen transport	60	4,46E-27	2,99E-24
GO :0015985	Energy coupled proton transport, - electrochemical gradient	53	1,15E-26	6,42E-24
GO :0015986	Atp synthesis coupled proton transport	53	1,15E-26	6,42E-24
GO :0034220	Ion transmembrane transport	56	1,57E-26	7,52E-24
GO :0070469	Respiratory chain	60	2,01E-23	8,49E-22
GO :0022890	Inorganic cation transmembrane transporter activity	86	6,09E-23	2,50E-20
GO :0044271	Nitrogen compound biosynthetic process	133	2,26E-22	9,47E-20
GO :0044455	Mitochondrial membrane part	49	3,77E-21	1,48E-19

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0005759	Mitochondrial matrix	88	2,62E-19	9,56E-18
GO :0031980	Mitochondrial lumen	88	2,62E-19	9,56E-18
GO :0046164	Alcohol catabolic process	65	4,38E-20	1,05E-17
GO :0046933	Hydrogen ion transporting atp synthase activity, rotational mechanism	31	4,20E-20	1,29E-17
GO :0033178	Proton-transporting two-sector atpase complex, catalytic domain	32	5,74E-19	1,96E-17
GO :0046961	Proton-transporting atpase activity, rotational mechanism	32	9,62E-19	2,36E-16
GO :0022900	Electron transport chain	68	2,18E-18	3,03E-16
GO :0005753	Mitochondrial proton-transporting atp synthase complex	24	1,18E-17	3,82E-16
GO :0046034	Atp metabolic process	62	1,74E-17	1,94E-15
GO :0045333	Cellular respiration	55	2,15E-17	2,32E-15
GO :0051186	Cofactor metabolic process	86	2,51E-17	2,63E-15
GO :0009109	Coenzyme catabolic process	34	6,43E-17	1,12E-14
GO :0048037	Cofactor binding	107	2,47E-16	3,90E-14
GO :0051187	Cofactor catabolic process	34	8,24E-16	7,65E-14
GO :0006084	Acetyl-coa metabolic process	35	9,90E-16	9,56E-14
GO :0046356	Acetyl-coa catabolic process	31	2,36E-15	2,17E-13
GO :0006099	Tricarboxylic acid cycle	31	2,36E-15	2,17E-13
GO :0006732	Coenzyme metabolic process	71	1,03E-14	9,10E-13
GO :0015980	Energy derivation by oxidation of organic compounds	62	5,87E-14	5,04E-12
GO :0045263	Proton-transporting atp synthase complex, coupling factor f(o)	23	5,62E-13	1,62E-11
GO :0051287	Nad or nadh binding	41	1,52E-13	2,34E-11
GO :0019829	Cation-transporting atpase activity	33	3,49E-13	4,77E-11
GO :0050662	Coenzyme binding	78	4,27E-13	5,24E-11
GO :0043648	Dicarboxylic acid metabolic process	26	1,61E-12	1,29E-10
GO :0009060	Aerobic respiration	33	2,57E-12	2,00E-10
GO :0006260	Dna replication	64	1,15E-11	8,72E-10
GO :0016620	Oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, nad or nadp as acceptor	28	1,48E-11	1,66E-09
GO :0033177	Proton-transporting two-sector atpase complex, proton-transporting domain	24	2,53E-10	6,61E-09
GO :0003954	Nadh dehydrogenase activity	26	1,62E-10	1,42E-08
GO :0043623	Cellular protein complex assembly	51	2,36E-10	1,72E-08
GO :0005746	Mitochondrial respiratory chain	18	7,13E-10	1,78E-08
GO :0006259	Dna metabolic process	113	3,24E-10	2,31E-08
GO :0046912	Transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	12	1,08E-09	8,84E-08
GO :0050136	Nadh dehydrogenase (quinone) activity	24	1,72E-09	1,24E-07
GO :0016655	Oxidoreductase activity, acting on nadh or nadph, quinone or similar compound as acceptor	26	1,64E-09	1,26E-07
GO :0008553	Hydrogen-exporting atpase activity, phosphorylative mechanism	14	2,17E-09	1,48E-07
GO :0042625	Atpase activity, coupled to transmembrane movement of ions	38	2,44E-09	1,58E-07
GO :0006108	Malate metabolic process	13	2,69E-09	1,87E-07
GO :0034622	Cellular macromolecular complex assembly	66	3,54E-09	2,42E-07
GO :0016651	Oxidoreductase activity, acting on nadh or nadph	34	1,35E-08	7,92E-07
GO :0016615	Malate dehydrogenase activity	13	1,61E-08	8,99E-07
GO :0000276	Mitochondrial proton-transporting atp synthase complex, coupling factor f(o)	12	5,14E-08	1,23E-06
GO :0016878	Acid-thiol ligase activity	16	3,07E-08	1,57E-06
GO :0008137	Nadh dehydrogenase (ubiquinone) activity	22	3,06E-08	1,64E-06
GO :0006270	Dna replication initiation	17	2,57E-08	1,72E-06
GO :0042555	Mcm complex	12	9,61E-08	2,19E-06
GO :0034621	Cellular macromolecular complex subunit organization	69	4,34E-08	2,85E-06
GO :0045271	Respiratory chain complex i	12	1,72E-07	3,77E-06
GO :0005747	Mitochondrial respiratory chain complex i	12	1,72E-07	3,77E-06
GO :0030964	Nadh dehydrogenase complex	12	1,72E-07	3,77E-06
GO :0015672	Monovalent inorganic cation transport	77	6,00E-08	3,87E-06
GO :0003878	Atp citrate synthase activity	9	1,19E-07	5,83E-06
GO :0016887	Atpase activity	92	1,36E-07	6,42E-06
GO :0030174	Regulation of dna replication initiation	13	1,06E-07	6,46E-06
GO :0006275	Regulation of dna replication	21	1,87E-07	1,12E-05
GO :0065003	Macromolecular complex assembly	100	1,93E-07	1,13E-05

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0000275	Mitochondrial proton-transporting atp synthase complex, catalytic core f(1)	9	7,07E-07	1,49E-05
GO :0030060	L-malate dehydrogenase activity	9	3,32E-07	1,51E-05
GO :0051352	Negative regulation of ligase activity	18	3,51E-07	1,99E-05
GO :0055085	Transmembrane transport	93	3,90E-07	2,18E-05
GO :0042626	Atpase activity, coupled to transmembrane movement of substances	42	5,53E-07	2,26E-05
GO :0043492	Atpase activity, coupled to movement of substances	42	6,18E-07	2,45E-05
GO :0016820	Hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances	42	8,58E-07	3,30E-05
GO :0006769	Nicotinamide metabolic process	22	8,63E-07	4,52E-05
GO :0046496	Nicotinamide nucleotide metabolic process	22	8,63E-07	4,52E-05
GO :0043933	Macromolecular complex subunit organization	103	9,29E-07	4,71E-05
GO :0009820	Alkaloid metabolic process	22	1,05E-06	5,25E-05
GO :0016405	Coa-ligase activity	12	1,50E-06	5,43E-05
GO :0000313	Organellar ribosome	16	4,49E-06	9,11E-05
GO :0005761	Mitochondrial ribosome	16	4,49E-06	9,11E-05
GO :0015405	P-p-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	43	2,68E-06	9,41E-05
GO :0015399	Primary active transmembrane transporter activity	43	2,68E-06	9,41E-05
GO :0004774	Succinate-coa ligase activity	9	3,53E-06	1,21E-04
GO :0005829	Cytosol	168	6,57E-06	1,28E-04
GO :0005840	Ribosome	61	7,22E-06	1,36E-04
GO :0006261	Dna-dependent dna replication	23	3,39E-06	1,58E-04
GO :0016836	Hydro-lyase activity	23	5,08E-06	1,69E-04
GO :0004775	Succinate-coa ligase (adp-forming) activity	8	6,79E-06	2,19E-04
GO :0022904	Respiratory electron transport chain	22	6,34E-06	2,83E-04
GO :0005762	Mitochondrial large ribosomal subunit	11	1,56E-05	2,84E-04
GO :0000315	Organellar large ribosomal subunit	11	1,56E-05	2,84E-04
GO :0015934	Large ribosomal subunit	20	1,73E-05	3,06E-04
GO :0004807	Triose-phosphate isomerase activity	7	1,12E-05	3,36E-04
GO :0003924	Gtpase activity	46	1,24E-05	3,63E-04
GO :0019748	Secondary metabolic process	28	9,34E-06	4,06E-04
GO :0042777	Plasma membrane atp synthesis coupled proton transport	6	1,04E-05	4,46E-04
GO :0031397	Negative regulation of protein ubiquitination	18	1,13E-05	4,72E-04
GO :0006739	Nadp metabolic process	15	1,13E-05	4,78E-04
GO :0007018	Microtubule-based movement	35	1,48E-05	6,12E-04
GO :0051052	Regulation of dna metabolic process	26	2,04E-05	8,22E-04
GO :0016628	Oxidoreductase activity, acting on the ch-ch group of donors, nad or nadp as acceptor	13	3,51E-05	9,18E-04
GO :0009055	Electron carrier activity	53	3,37E-05	9,20E-04
GO :0006268	Dna unwinding during replication	12	4,70E-05	1,85E-03
GO :0033279	Ribosomal subunit	27	1,09E-04	1,87E-03
GO :0030062	Mitochondrial tricarboxylic acid cycle enzyme complex	7	1,60E-04	2,66E-03
GO :0046395	Carboxylic acid catabolic process	31	8,01E-05	2,94E-03
GO :0016054	Organic acid catabolic process	31	8,01E-05	2,94E-03
GO :0006090	Pyruvate metabolic process	18	1,05E-04	3,77E-03
GO :0016053	Organic acid biosynthetic process	43	1,04E-04	3,78E-03
GO :0046394	Carboxylic acid biosynthetic process	43	1,04E-04	3,78E-03
GO :0016831	Carboxy-lyase activity	16	1,51E-04	3,78E-03
GO :0005524	Atp binding	284	1,56E-04	3,82E-03
GO :0005525	Gtp binding	83	1,89E-04	4,37E-03
GO :0000036	Acyl carrier activity	8	1,83E-04	4,41E-03
GO :0003994	Aconitate hydratase activity	6	2,15E-04	4,80E-03
GO :0006103	2-oxoglutarate metabolic process	8	1,47E-04	5,06E-03
GO :0032559	Adenyl ribonucleotide binding	286	2,35E-04	5,14E-03
GO :0032508	Dna duplex unwinding	12	1,61E-04	5,50E-03
GO :0044270	Nitrogen compound catabolic process	21	1,74E-04	5,87E-03
GO :0032392	Dna geometric change	12	2,01E-04	6,59E-03
GO :0006733	Oxidoreduction coenzyme metabolic process	22	2,00E-04	6,61E-03
GO :0046165	Alcohol biosynthetic process	19	2,32E-04	7,44E-03
GO :0005758	Mitochondrial intermembrane space	13	4,86E-04	7,81E-03
GO :0051087	Chaperone binding	9	4,11E-04	8,66E-03
GO :0006412	Translation	81	2,90E-04	8,94E-03

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0033293	Monocarboxylic acid binding	16	4,53E-04	9,39E-03
GO :0045239	Tricarboxylic acid cycle enzyme complex	7	6,19E-04	9,65E-03
GO :0007017	Microtubule-based process	52	3,27E-04	1,00E-02
GO :0003735	Structural constituent of ribosome	47	5,00E-04	1,02E-02
GO :0015002	Heme-copper terminal oxidase activity	16	5,23E-04	1,03E-02
GO :0016676	Oxidoreductase activity, acting on heme group of donors, oxygen as acceptor	16	5,23E-04	1,03E-02
GO :0016675	Oxidoreductase activity, acting on heme group of donors	16	5,23E-04	1,03E-02
GO :0004129	Cytochrome-c oxidase activity	16	5,23E-04	1,03E-02
GO :0044454	Nuclear chromosome part	27	8,38E-04	1,27E-02
GO :0042775	Mitochondrial atp synthesis coupled electron transport	12	4,56E-04	1,34E-02
GO :0016748	Succinyltransferase activity	6	6,96E-04	1,35E-02
GO :0031970	Organelle envelope lumen	14	9,42E-04	1,39E-02
GO :0051536	Iron-sulfur cluster binding	22	7,56E-04	1,44E-02
GO :0051540	Metal cluster binding	22	7,56E-04	1,44E-02
GO :0006839	Mitochondrial transport	16	5,48E-04	1,58E-02
GO :0003857	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase activity	7	9,84E-04	1,84E-02
GO :0018130	Heterocycle biosynthetic process	22	7,85E-04	2,22E-02
GO :0006200	Atp catabolic process	9	9,36E-04	2,58E-02
GO :0006734	Nadh metabolic process	6	9,53E-04	2,60E-02
GO :0043498	Cell surface binding	9	1,49E-03	2,73E-02
GO :0006812	Cation transport	94	1,06E-03	2,86E-02
GO :0004485	Methylcrotonoyl-coa carboxylase activity	5	1,64E-03	2,96E-02
GO :0004776	Succinate-coa ligase (gdp-forming) activity	5	1,64E-03	2,96E-02
GO :0019136	Deoxynucleoside kinase activity	5	1,64E-03	2,96E-02
GO :0006107	Oxaloacetate metabolic process	7	1,15E-03	3,08E-02
GO :0046653	Tetrahydrofolate metabolic process	7	1,15E-03	3,08E-02
GO :0005832	Chaperonin-containing t-complex	7	2,33E-03	3,31E-02
GO :0005198	Structural molecule activity	96	2,38E-03	4,22E-02
GO :0000228	Nuclear chromosome	29	3,27E-03	4,50E-02
GO :0033014	Tetrapyrrole biosynthetic process	11	1,79E-03	4,67E-02
GO :0006779	Porphyrin biosynthetic process	11	1,79E-03	4,67E-02
GO :0004470	Malic enzyme activity	5	2,78E-03	4,83E-02
GO :0005664	Nuclear origin of replication recognition complex	5	4,09E-03	5,46E-02
GO :0004313	[acyl-carrier-protein] s-acyltransferase activity	4	3,60E-03	5,90E-02
GO :0004317	3-hydroxypalmitoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	4	3,60E-03	5,90E-02
GO :0019171	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	4	3,60E-03	5,90E-02
GO :0016631	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity	4	3,60E-03	5,90E-02
GO :0004319	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (nadph, b-specific) activity	4	3,60E-03	5,90E-02
GO :0051539	4 iron, 4 sulfur cluster binding	14	3,59E-03	5,95E-02
GO :0031406	Carboxylic acid binding	33	3,55E-03	5,97E-02
GO :0006662	Glycerol ether metabolic process	14	2,34E-03	5,99E-02
GO :0016417	S-acyltransferase activity	6	3,52E-03	6,01E-02
GO :0016744	Transferase activity, transferring aldehyde or ketonic groups	6	3,52E-03	6,01E-02
GO :0042623	Atpase activity, coupled	59	3,79E-03	6,11E-02
GO :0030170	Pyridoxal phosphate binding	22	4,07E-03	6,46E-02
GO :0018904	Organic ether metabolic process	14	2,64E-03	6,58E-02
GO :0046700	Heterocycle catabolic process	20	2,87E-03	7,08E-02
GO :0006081	Cellular aldehyde metabolic process	10	2,89E-03	7,08E-02
GO :0016645	Oxidoreductase activity, acting on the ch-nh group of donors	12	4,71E-03	7,25E-02
GO :0000062	Acyl-coa binding	8	5,36E-03	8,12E-02
GO :0019867	Outer membrane	25	6,94E-03	8,68E-02
GO :0016684	Oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	12	6,06E-03	9,02E-02
GO :0004601	Peroxidase activity	12	6,06E-03	9,02E-02
GO :0051082	Unfolded protein binding	25	6,20E-03	9,11E-02
GO :0009374	Biotin binding	6	6,41E-03	9,30E-02
GO :0005694	Chromosome	64	7,69E-03	9,37E-02
GO :0004314	[acyl-carrier-protein] s-malonyltransferase activity	4	6,81E-03	9,74E-02
GO :0016781	Phosphotransferase activity, paired acceptors	4	6,81E-03	9,74E-02
GO :0004316	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity	4	6,81E-03	9,74E-02
GO :0016420	Malonyltransferase activity	4	6,81E-03	9,74E-02

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0004473	Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (nadp+) activity	4	6,81E-03	9,74E-02
GO :0016419	S-malonyltransferase activity	4	6,81E-03	9,74E-02
GO :0004756	Selenide, water dikinase activity	4	6,81E-03	9,74E-02
GO :0006297	Nucleotide-excision repair, dna gap filling	6	4,13E-03	9,83E-02
GO :0044427	Chromosomal part	52	8,34E-03	9,90E-02
Nucléotides				
GO :0019362	Pyridine nucleotide metabolic process	22	3,81E-06	1,75E-04
GO :0009132	Nucleoside diphosphate metabolic process	11	6,74E-05	2,50E-03
GO :0030554	Adenyl nucleotide binding	298	3,02E-04	6,48E-03
GO :0032561	Guanyl ribonucleotide binding	83	5,06E-04	1,01E-02
GO :0019001	Guanyl nucleotide binding	83	5,06E-04	1,01E-02
GO :0009203	Ribonucleoside triphosphate catabolic process	10	6,06E-04	1,74E-02
GO :0009207	Purine ribonucleoside triphosphate catabolic process	10	6,06E-04	1,74E-02
GO :0046131	Pyrimidine ribonucleoside metabolic process	10	2,44E-03	6,18E-02
GO :0009186	Deoxyribonucleoside diphosphate metabolic process	5	3,83E-03	9,21E-02
GO :0009141	Nucleoside triphosphate metabolic process	73	2,20E-20	6,13E-18
GO :0009152	Purine ribonucleotide biosynthetic process	74	2,56E-20	6,60E-18
GO :0009201	Ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	66	6,99E-20	1,46E-17
GO :0009206	Purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	66	6,99E-20	1,46E-17
GO :0009260	Ribonucleotide biosynthetic process	75	1,35E-19	2,26E-17
GO :0009205	Purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	70	1,24E-19	2,31E-17
GO :0009199	Ribonucleoside triphosphate metabolic process	70	1,24E-19	2,31E-17
GO :0009144	Purine nucleoside triphosphate metabolic process	71	1,19E-19	2,34E-17
GO :0009142	Nucleoside triphosphate biosynthetic process	66	1,34E-19	2,37E-17
GO :0009145	Purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	66	1,34E-19	2,37E-17
GO :0009150	Purine ribonucleotide metabolic process	78	2,10E-19	3,35E-17
GO :0006164	Purine nucleotide biosynthetic process	80	6,57E-19	9,99E-17
GO :0009259	Ribonucleotide metabolic process	79	1,23E-18	1,79E-16
GO :0009165	Nucleotide biosynthetic process	89	3,06E-18	4,09E-16
GO :0006163	Purine nucleotide metabolic process	87	4,34E-18	5,59E-16
GO :0034654	Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process	90	5,19E-18	6,44E-16
GO :0034404	Nucleobase, nucleoside and nucleotide biosynthetic process	90	5,19E-18	6,44E-16
GO :0006754	Atp biosynthetic process	59	6,34E-18	7,58E-16
GO :0000166	Nucleotide binding	453	1,11E-10	1,05E-08
GO :0032553	Ribonucleotide binding	363	3,45E-07	1,51E-05
GO :0032555	Purine ribonucleotide binding	363	3,45E-07	1,51E-05
GO :0017076	Purine nucleotide binding	375	4,95E-07	2,10E-05
GO :0009143	Nucleoside triphosphate catabolic process	13	2,47E-05	9,85E-04
GO :0008202	Steroid metabolic process	39	6,34E-05	2,38E-03
GO :0001882	Nucleoside binding	305	1,38E-04	3,52E-03
GO :0001883	Purine nucleoside binding	302	1,90E-04	4,31E-03
GO :0019205	Nucleobase, nucleoside, nucleotide kinase activity	17	1,85E-04	4,37E-03
GO :0009146	Purine nucleoside triphosphate catabolic process	11	1,95E-04	6,51E-03
GO :0006213	Pyrimidine nucleoside metabolic process	12	4,56E-04	1,34E-02
GO :0034656	Nucleobase, nucleoside and nucleotide catabolic process	18	8,57E-04	2,40E-02
GO :0034655	Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid catabolic process	18	8,57E-04	2,40E-02
Catabolisme protéique				
GO :0031398	Positive regulation of protein ubiquitination	19	3,23E-06	1,53E-04
GO :0000502	Proteasome complex	43	5,94E-16	1,69E-14
GO :0005839	Proteasome core complex	21	2,16E-11	5,93E-10
GO :0051258	Protein polymerization	30	2,88E-11	2,14E-09
GO :0004298	Threonine-type endopeptidase activity	21	4,76E-11	4,87E-09
GO :0070003	Threonine-type peptidase activity	21	4,76E-11	4,87E-09
GO :0016877	Ligase activity, forming carbon-sulfur bonds	20	6,18E-09	3,80E-07
GO :0051436	Negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	18	2,00E-07	1,15E-05
GO :0051444	Negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity	18	3,51E-07	1,99E-05
GO :0051439	Regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	18	4,61E-07	2,45E-05
GO :0051437	Positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	17	8,66E-07	4,46E-05

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0031145	Anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	17	8,66E-07	4,46E-05
GO :0051443	Positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity	17	1,47E-06	7,14E-05
GO :0051351	Positive regulation of ligase activity	17	2,43E-06	1,16E-04
GO :0051438	Regulation of ubiquitin-protein ligase activity	18	5,00E-06	2,26E-04
GO :0051340	Regulation of ligase activity	18	7,58E-06	3,34E-04
GO :0016885	Ligase activity, forming carbon-carbon bonds	11	1,25E-05	3,56E-04
GO :0010498	Proteasomal protein catabolic process	22	5,11E-05	1,97E-03
GO :0031396	Regulation of protein ubiquitination	20	1,12E-04	3,99E-03
GO :0043161	Proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	21	1,36E-04	4,73E-03
Protéines				
GO :0070271	Protein complex biogenesis	84	4,46E-07	2,41E-05
GO :0006461	Protein complex assembly	84	4,46E-07	2,41E-05
GO :0004576	Oligosaccharyl transferase activity	10	8,39E-06	2,64E-04
GO :0004579	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase activity	9	3,17E-05	8,85E-04
GO :0006457	Protein folding	42	2,57E-04	8,07E-03
GO :0031400	Negative regulation of protein modification process	21	3,50E-04	1,06E-02
GO :0043413	Biopolymer glycosylation	24	9,31E-04	2,59E-02
GO :0006486	Protein amino acid glycosylation	24	9,31E-04	2,59E-02
GO :0070085	Glycosylation	24	9,31E-04	2,59E-02
GO :0018279	Protein amino acid n-linked glycosylation via asparagine	6	2,14E-03	5,52E-02
GO :0018196	Peptidyl-asparagine modification	6	2,14E-03	5,52E-02
GO :0008250	Oligosaccharyltransferase complex	5	6,06E-03	7,81E-02
Immunité				
GO :0002526	Acute inflammatory response	23	6,19E-05	2,35E-03
GO :0002541	Activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	13	4,13E-04	1,23E-02
GO :0006956	Complement activation	12	1,30E-03	3,46E-02
GO :0042288	Mhc class i protein binding	5	4,36E-03	6,82E-02
GO :0002252	Immune effector process	23	4,21E-03	9,87E-02
Lipides				
GO :0006695	Cholesterol biosynthetic process	17	7,56E-08	4,68E-06
GO :0006631	Fatty acid metabolic process	54	4,31E-07	2,36E-05
GO :0016126	Sterol biosynthetic process	18	4,61E-07	2,45E-05
GO :0006694	Steroid biosynthetic process	23	1,86E-05	7,57E-04
GO :0008203	Cholesterol metabolic process	24	2,21E-04	7,17E-03
GO :0008610	Lipid biosynthetic process	63	2,49E-04	7,91E-03
GO :0016125	Sterol metabolic process	25	3,54E-04	1,06E-02
Glucide				
GO :0019320	Hexose catabolic process	65	1,60E-21	5,95E-19
GO :0006007	Glucose catabolic process	65	1,60E-21	5,95E-19
GO :0046365	Monosaccharide catabolic process	65	2,61E-21	8,74E-19
GO :0044275	Cellular carbohydrate catabolic process	69	4,16E-21	1,27E-18
GO :0006096	Glycolysis	58	6,50E-20	1,45E-17
GO :0016052	Carbohydrate catabolic process	69	1,08E-17	1,25E-15
GO :0008943	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity	21	1,08E-16	2,28E-14
GO :0004365	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity	21	1,08E-16	2,28E-14
GO :0019318	Hexose metabolic process	82	6,36E-14	5,32E-12
GO :0005996	Monosaccharide metabolic process	84	7,16E-13	5,84E-11
GO :0006098	Pentose-phosphate shunt	14	1,19E-06	5,83E-05
GO :0006094	Gluconeogenesis	16	4,96E-05	1,93E-03
GO :0046364	Monosaccharide biosynthetic process	18	1,05E-04	3,77E-03
GO :0019682	Glyceraldehyde-3-phosphate metabolic process	5	1,22E-04	4,29E-03
GO :0019319	Hexose biosynthetic process	16	2,68E-04	8,34E-03
GO :0034637	Cellular carbohydrate biosynthetic process	24	4,92E-04	1,43E-02
GO :0006006	Glucose metabolic process	77	4,68E-15	4,22E-13
Acides aminés				
GO :0043603	Cellular amide metabolic process	28	7,16E-08	4,52E-06
GO :0009063	Cellular amino acid catabolic process	20	2,63E-03	6,61E-02
Glutathione transferase activity				
GO :0004364	Glutathione transferase activity	13	9,61E-07	3,58E-05

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0016765	Transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	22	1,09E-05	3,35E-04
Autres				
GO :0007049	Cell cycle	113	4,18E-03	9,87E-02
GO :0019842	Vitamin binding	45	3,42E-05	9,13E-04
GO :0070279	Vitamin b6 binding	22	4,07E-03	6,46E-02

Annexe ix – Liste de potentiels marqueurs, liés à la production d'énergie, différenciellement exprimés dans le foie, entre les trois lignées après 6 mois d'alimentation (**Effet du génotype**). Pour l'**effet de l'aliment 100 %V** : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
P21913	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (Sdhb)	AB1h > A22h	-	-	-
P41565	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial (Idh3g)	R23h > A22h, AB1h > A22h	-	ns	-
P00346	Malate dehydrogenase, mitochondrial (Mdh2)	AB1h > A22h	-	ns	-
Q68FN7	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit B, mitochondrial (sdhdb)	AB1h > A22h	-	ns	-
Q68FX0	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial (Idh3B)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q29RK2	Pyruvate carboxylase, mitochondrial (PC)	AB1h > A22h	ns	ns	-
A7MB35	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial (PDHA1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q7ZVF3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (sdha)	AB1h > A22h	ns	ns	-
A3KP74	Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial (sdhaf2)	AB1h > A22h	ns	ns	-
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (Mdh1)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	+	-
P16638	ATP-citrate synthase (Acy)	AB1h > A22h	+	+	+
Q9Z2K8	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic (IDH1)	AB1h > A22h	+	+	ns
Q06647	ATP synthase subunit O, mitochondrial (Atp5o)	AB1h > A22h	-	-	-
P23004	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial (Uqcrc2)	AB1h > A22h	-	-	-
P13272	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (UQCRFS1)	AB1h > A22h	-	-	-
P48172	Cytochrome c oxidase subunit 3 (mt-co3)	AB1h > A22h	-	-	-
O95299	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial (Ndufa10)	R23h > A22h, AB1h > A22h	-	-	-
Q0MQB4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial (Ndufa9)	AB1h > A22h	-	-	-
P23709	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (Ndufs3)	R23h > A22h, AB1h > A22h	-	-	-
Q4FP36	ATP synthase subunit alpha (atpA)	AB1h > A22h	ns	-	-
Q9CQ54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2 (Ndufc2)	AB1h > A22h	ns	-	-
Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4 (Ndufa4)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q5RBS9	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial (ATP5C1)	AB1h > A22h	-	ns	-
P31800	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Uqcrc1)	AB1h > A22h	-	ns	-
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (COX4I1)	AB1h > A22h	-	ns	-
Q02380	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial (Ndufa5)	AB1h > A22h	-	ns	-
Q641Y2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial (Ndufs2)	R23h > A22h, AB1h > A22h	-	ns	-
Q0MQH1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial (Ndufs4)	AB1h > A22h	-	ns	-
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial (Ndufs7)	AB1h > A22h	-	ns	-
Q02378	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1 (Ndufa1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P32876	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial (ATP5G1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q1L987	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 (atpaf1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q91YY4	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 (atpaf2)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
P19483	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	AB1h > A22h	ns	ns	-

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
P13619	ATP synthase subunit b, mitochondrial (ATP5F1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q6AQ10	ATP synthase subunit beta (atpD)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
P00830	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP2)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
P31399	ATP synthase subunit d, mitochondrial (Atp5h)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
Q9D3D9	ATP synthase subunit delta, mitochondrial (Atp5d)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
Q06185	ATP synthase subunit e, mitochondrial (Atp5i)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
P05632	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial (ATP5E)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
P56135	ATP synthase subunit f, mitochondrial (Atp5j2)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
O75964	ATP synthase subunit g, mitochondrial (ATP5L)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P21571	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial (Atp5j)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q5M9I5	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial (Uqcrc6)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
Q9CQ69	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 (Uqcrc8)	R23h > A22h,	ns	ns	-
P00130	Cytochrome b-c1 complex subunit 9 (Uqcrc9)	AB1h < A22h	ns	ns	ns
P48170	Cytochrome c oxidase subunit 1 (mt-co1)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q5S3G4	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial (COX5B)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1 (COX6B1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P13184	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial (COX7A2)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P24311	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial (COX7B)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q8TF08	Cytochrome c oxidase subunit 7B2, mitochondrial (COX7B2)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P14622	Cytochrome c oxidase subunit 8A, mitochondrial (COX8A)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q9D8B4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11 (Ndufa11)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 (Ndufa12)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q0MQ90	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 (Ndufa13)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q9CQ91	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3 (Ndufa3)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q6PBH5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 (Ndufa4)	R23h > A22h,	ns	ns	-
P23935	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 (Ndufa5)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q02366	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 (Ndufa6)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q02373	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (Ndufa10)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q9CQZ6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3 (Ndufa3)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P17568	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 (Ndufa7)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
Q9D6J5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial (Ndufa8)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q0MQI6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (NDUFV1)	AB1h > A22h	ns	ns	-
P04394	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (NDUFV2)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q0MQH4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5 (Ndufs5)	R23h > A22h, AB1h > A22h	ns	ns	-
P42028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial (Ndufs8)	AB1h > A22h	ns	ns	-
Q4JQI7	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (MT-ND1)	AB1h > A22h	ns	ns	ns
P48175	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (MT-ND1)	R23h > A22h,	ns	ns	ns
P48176	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (MT-ND5)	R23h > A22h,	ns	ns	-
P48177	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6 (MT-ND6)	R23h > A22h,	ns	ns	-
P48178	ATP synthase subunit a (mt-atp6)	AB1h > A22h	+	ns	ns
Q9CPX8	Cytochrome b-c1 complex subunit 10 (Uqcrc10)	R23h < A22h, AB1h < A22h	ns	+	+
Q02370	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2 (Ndufa2)	AB1h > A22h	+	+	ns

Annexe x – Liste de potentiels marqueurs, liés à la synthèse et au catabolisme des protéines, différenciellement exprimés dans le foie, entre les trois lignées après 6 mois d'alimentation (**Effet du génotype**). Pour l'**effet de l'aliment 100 %V** : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Q6GN29	Atlastin-2 (at12)	AB1h <A22h	ns	-	ns
Q5T1M5	FK506-binding protein 15	AB1h <A22h	ns	+	+
Q00944	Focal adhesion kinase 1 (PTK2)	AB1h <A22h	+	ns	+
P06396	Gelsolin (GSN)	AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q0P5N5	GrpE protein homolog 2, mitochondrial (GRPEL2)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P08069	Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q9IAK4	Noelin (OLFM1)	AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q16514	Transcription initiation factor TFIID subunit 12 (TAF12)	AB1h <A22h	ns	ns	+
O00268	Transcription initiation factor TFIID subunit 4 (TAF4)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P49813	Tropomodulin-1 (Tmod1)	AB1h <A22h	ns	+	+
P09207	Tubulin beta-6 chain	AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q15814	Tubulin-specific chaperone C (TBCC)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q9W6X3	10 kDa heat shock protein, mitochondrial (hspe1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5ZL72	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q8BK64	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Ahsa1)	AB1h >A22h	-	ns	-
P36404	ADP-ribosylation factor-like protein 2 (ARL2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P24643	Calnexin (CANX)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P52193	Calreticulin (CALR)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q02224	Centromere-associated protein E (CENPE)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q5XHZ0	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (Trap1)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
O57521	Heat shock protein HSP 90-beta (hsp90ab1)	AB1h >A22h	-	ns	-
Q6P0K8	Junction plakoglobin (Jup)	AB1h >A22h	-	-	-
Q59HJ6	Lon protease homolog, mitochondrial (LONP1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q6PGF3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16 (Med16)	AB1h >A22h	+	+	+
P52009	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1 (cyn-1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P52011	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 3 (cyn-3)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Ppia)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P30404	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIF)	AB1h >A22h	-	-	-
Q5R941	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14 (FKBP14)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q32PA9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 (FKBP)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q13451	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 (FKBP5)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q3B7U9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 (FKBP8)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9D0W5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1 (Ppil1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5D016	Prefoldin subunit 1 (pfdn1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9NQP4	Prefoldin subunit 4 (pfdn4)	AB1h >A22h	ns	ns	-
O15212	Prefoldin subunit 6 (pfdn6)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P61458	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase (Pcbd1)	AB1h >A22h	ns	+	-
Q5R7K1	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2 (Pcbd2)	AB1h >A22h	ns	+	-
Q32L40	T-complex protein 1 subunit alpha (Cct1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5XIM9	T-complex protein 1 subunit beta (Cct2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q68FQ0	T-complex protein 1 subunit epsilon (Cct5)	AB1h >A22h	ns	-	-
P50143	T-complex protein 1 subunit gamma (cct3)	AB1h >A22h	ns	+	ns
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6A)	AB1h >A22h	-	ns	-
Q568B8	Torsin family protein C9orf167 homolog (tor4a)	AB1h >A22h	-	ns	-
P53372	Tubulin alpha chain (TUB1)	AB1h >A22h	ns	-	-
Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain (Tuba1b)	AB1h >A22h	-	-	-
Q6AYZ1	Tubulin alpha-1C chain (Tuba1c)	AB1h >A22h	ns	-	-
Q2HJ86	Tubulin alpha-1D chain (Tuba1d)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
P09243	Tubulin alpha-2 chain	AB1h >A22h	-	-	-
P41383	Tubulin alpha-2/alpha-4 chain (TUB2)	AB1h >A22h	ns	-	-
P09642	Tubulin alpha-3 chain	AB1h >A22h	-	-	-
Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain (TUBA3)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P09643	Tubulin alpha-4 chain (TUBA4)	AB1h >A22h	-	-	-
Q6AY56	Tubulin alpha-8 chain (TUBA8)	AB1h >A22h	-	-	-
Q91240	Tubulin beta chain	AB1h >A22h	ns	-	-
P36221	Tubulin beta-1 chain (tubb1)	AB1h >A22h	ns	-	-
P13602	Tubulin beta-2 chain (tubb2)	AB1h >A22h	ns	-	-

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Q9D6F9	Tubulin beta-4 chain (tubb4a)	AB1h >A22h	ns	-	-
P09653	Tubulin beta-5 chain	AB1h >A22h	ns	-	-
Glycosylation					
P27115	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (MGAT1)	AB1h <A22h	ns	-	-
P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1)	AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q02734	CMP-N-acetylneuraminate-beta-1,4-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (St3gal3)	AB1h <A22h	ns	-	ns
Q16842	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2, 3-sialyltransferase 2 (ST3GAL2)	AB1h <A22h	ns	+	+
Q91Y74	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2, 3-sialyltransferase 4 (ST3GAL4)	AB1h <A22h	-	-	ns
Q64692	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2,8-sialyltransferase (St8sia4)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q9BT22	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase (ALG1)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q6NYS8	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (ddost)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q9GMB0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 (RPN1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9DBG6	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2 (RPN2)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
P61805	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit DAD1 (Dad1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q2KJI2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A (STT3A)	AB1h >A22h	ns	-	-
Q925R7	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10 (Galnt10)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q8BGQ4	Protein O-mannosyl-transferase 2 (Pomt2)	AB1h <A22h	ns	+	+
Q99470	Stromal cell-derived factor 2 (SDF2)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q9C0J1	UDP-GlcNAc :betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	AB1h <A22h	+	+	+
Q9NYU2	UDP-glucose :glycoprotein glycosyltransferase 1 (UGGT1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Protéine ribosomale					
P47904	40S ribosomal protein S27	AB1h <A22h	-	-	ns
P29314	40S ribosomal protein S9	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q9CR57	60S ribosomal protein L14	AB1h >A22h	ns	ns	-
P24558	60S ribosomal protein L18	AB1h >A22h	-	-	-
P62832	60S ribosomal protein L23	AB1h >A22h	-	-	-
P62752	60S ribosomal protein L23a	AB1h >A22h	-	-	-
Q6NUH0	60S ribosomal protein L31	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q9D8M4	60S ribosomal protein L7-like 1	AB1h >A22h	-	-	-
A5GFQ0	60S ribosomal protein L7-like 1	AB1h >A22h	-	-	-
O35680	28S ribosomal protein S12, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5REY4	28S ribosomal protein S16, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q99N85	28S ribosomal protein S18a, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
P82919	28S ribosomal protein S18a, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q767K8	28S ribosomal protein S18b, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9CY16	28S ribosomal protein S28, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q9ER88	28S ribosomal protein S29, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q9D0G0	28S ribosomal protein S30, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q498P2	28S ribosomal protein S35, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q2KID9	28S ribosomal protein S5, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
P82933	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q9D7N3	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q5BJB7	39S ribosomal protein L10, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9D8P4	39S ribosomal protein L17, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q9H0U6	39S ribosomal protein L18, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9CQL5	39S ribosomal protein L18, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q3ZBR7	39S ribosomal protein L18, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q2TBS2	39S ribosomal protein L21, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q0VFH6	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q8BU88	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
Q99N95	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5ZI69	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	AB1h >A22h	-	-	-
Q503X2	39S ribosomal protein L4, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9CY73	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	AB1h >A22h	-	ns	-
P59480	39S ribosomal protein L45, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	-	-

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Q5RBU2	39S ribosomal protein L46, mitochondrial	AB1h >A22h	-	-	-
Q9H2W6	39S ribosomal protein L46, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5BJJ8	39S ribosomal protein L51, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q4V7Q1	39S ribosomal protein L52, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q86TS9	39S ribosomal protein L52, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q1LXI5	39S ribosomal protein L54, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q7Z7F7	39S ribosomal protein L55, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q2TBK2	39S ribosomal protein L9, mitochondrial	AB1h >A22h	-	-	-
P62909	40S ribosomal protein S3	AB1h >A22h	ns	ns	-
P62243	40S ribosomal protein S8	AB1h >A22h	ns	ns	ns
P82917	28S ribosomal protein S18c, mitochondrial	R23h <A22h,	-	ns	ns
Q8R2L5	28S ribosomal protein S18c, mitochondrial	R23h <A22h,	-	ns	ns
O35680	28S ribosomal protein S12, mitochondrial	R23h >A22h,	ns	ns	-
Q80ZS3	28S ribosomal protein S26, mitochondrial	R23h >A22h,	-	ns	-
P83565	39S ribosomal protein L40, mitochondrial	R23h >A22h,	ns	ns	-
P82927	39S ribosomal protein L42, mitochondrial	R23h >A22h,	ns	ns	-
P59480	39S ribosomal protein L45, mitochondrial	R23h >A22h,	-	-	-
Q6B860	28S ribosomal protein S14, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
O60783	28S ribosomal protein S14, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P82922	28S ribosomal protein S29, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	-	-	-
Q9CQF0	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9BYD1	39S ribosomal protein L13, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	-	-	-
Q5T653	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	-	-	-
Q3ZBX6	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P18665	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Catabolisme					
P62193	26S protease regulatory subunit 4 (Psmc1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
O14126	26S protease regulatory subunit 6A (tbp1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q63570	26S protease regulatory subunit 6B (Psmc4)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P46471	26S protease regulatory subunit 7 (Psmc2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P46470	26S protease regulatory subunit 8 (Psmc5)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9MAK9	26S protease regulatory subunit S10B homolog B	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q8BG32	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	AB1h >A22h	+	+	ns
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	AB1h >A22h	ns	ns	-
P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q9CX56	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q0V967	F-box only protein 5	AB1h >A22h	ns	-	-
Q9BZK7	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1	AB1h <A22h	-	-	ns
Q6NZ09	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	AB1h >A22h	ns	ns	-
P40301	Proteasome subunit alpha type-2	AB1h >A22h	ns	ns	-
O70435	Proteasome subunit alpha type-3	AB1h >A22h	ns	ns	-
P21670	Proteasome subunit alpha type-4	AB1h >A22h	ns	ns	-
P34064	Proteasome subunit alpha type-5	AB1h >A22h	ns	ns	-
O14818	Proteasome subunit alpha type-7	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5E9K0	Proteasome subunit beta type-2	AB1h >A22h	ns	-	-
O73817	Proteasome subunit beta type-3	AB1h >A22h	ns	ns	-
P28070	Proteasome subunit beta type-4	AB1h >A22h	-	ns	-
O55234	Proteasome subunit beta type-5	AB1h >A22h	ns	ns	-
P28073	Proteasome subunit beta type-6	AB1h >A22h	ns	ns	-
A1XQU1	Proteasome subunit beta type-7	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5ZHY5	STIP1 homology and U box-containing protein 1	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q4KMA2	UV excision repair protein RAD23 homolog B	AB1h >A22h	ns	ns	ns

Annexe xi – Liste de potentiels marqueurs, liés au métabolisme azoté, différenciellement exprimés dans le foie, entre les trois lignées après 6 mois d'alimentation (**Effet du génotype**). Pour l'**effet de l'aliment 100 %V** : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h

L-Tryptophane

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
A7MBU6	Tryptophan 2,3-dioxygenase A (tdo2)	R23h <A22h,	-	ns	ns
B5XB27	Probable arylformamidase (afmid)	AB1h <A22h	ns	ns	+
L-Leucine degradation					
Q96RQ3	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial (MCCC1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q13825	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial (AUH)	AB1h >A22h	ns	ns	-
L-Lysine					
Q99K67	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial (Aass)	AB1h >A22h	ns	+	ns
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (DLST)	AB1h >A22h	-	ns	-
Q01205	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	ns
L-Phenylalanine					
Q9WVL0	Maleylacetoacetate isomerase (Gstz1)	R23h >A22h	ns	ns	-
O09173	Homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	-
P16930	Fumarylacetoacetase (FAH)	AB1h >A22h	+	+	ns
P35505	Fumarylacetoacetase (FAH)	R23h >A22h	+	ns	ns
Transaminase					
Q3UEG6	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial (AGXT2)	R23h >A22h,	ns	ns	-
Q5RFA3	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	R23h >A22h,	ns	ns	ns
P41689	Serine-pyruvate aminotransferase, mitochondrial (AGXT)	R23h >A22h,	ns	+	-
Q0VCW4	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase (SD)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P00504	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (GOT1)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial (Got2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P00507	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
P00508	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AB1h >A22h	ns	ns	-
P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	R23h >A22h	ns	-	-
P00508	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	R23h >A22h	ns	-	-
Glycine et serine					
Q9UI17	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial (DMGDH)	R23h >A22h	+	+	ns
Q63342	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	R23h >A22h	+	+	ns
Q9UL12	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial (SARDH)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Q99LB7	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	+
P35623	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (SHMT1)	R23h >A22h	+	+	ns
P50431	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	R23h >A22h	+	+	+
Q9N121	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial (GCSH)	AB1h >A22h	+	ns	ns
Q5RB83	Phosphoserine phosphatase (PSPH)	R23h >A22h	+	+	ns
Acides aminés soufrés					
Q6NWZ9	Cysteine dioxygenase type 1 (cdo1)	R23h <A22h	ns	+	+
Q3SZU4	Cysteine dioxygenase type 1	R23h <A22h	ns	+	+
Q9DBE0	Cysteine sulfinic acid decarboxylase (Csad)	R23h >A22h, AB1h >A22h	-	-	-
Q710C4	Adenosylhomocysteinase (AHCY)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Q32LQ4	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1 (BHMT1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Q5XGM3	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Q5M8Z0	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	AB1h >A22h	+	+	ns
Q2KJC6	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-1 (MAT1A)	AB1h >A22h	+	+	+
Q5R5H1	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-2 (MAT2A)	AB1h >A22h	ns	ns	-
L-arginine					
P09034	Argininosuccinate synthase (Ass1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P14568	Argininosuccinate synthase	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Q66I24	Argininosuccinate synthase	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P78540	Arginase-2, mitochondrial (ARG2)	R23h >A22h	+	ns	ns
Q5ZJU3	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	R23h >A22h,	ns	-	-
Cycle de l'urée					
A1L259	2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazole decarboxylase (urad)	AB1h >A22h	+	+	ns

Annexe xii – Liste de potentiels marqueurs, liés au métabolisme des glucides, différenciellement exprimés dans le foie, entre les trois lignées après 6 mois d'alimentation (**Effet du génotype**). Pour l'**effet de l'aliment 100 %V** : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Glycolyse/Néoglucogénèse					
P47859	6-phosphofructokinase type C (PFKP)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q43130	Enolase (PGH1)	AB1h >A22h	ns	-	-
P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)	AB1h >A22h	+	ns	ns
Q8JH71	Fructose-bisphosphate aldolase B (ALDOB)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C (ALDOC)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q19KA1	Glucose-6-phosphatase (G6PC)	AB1h >A22h	-	-	-
Q9N1E2	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)	AB1h >A22h	ns	ns	-
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9Z2V4	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] (Pck1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	ns	ns
P07379	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] (Pck1)	AB1h <A22h	ns	+	+
P36871	Phosphoglucomutase-1 (PGM-1)	AB1h >A22h	ns	-	-
P51903	Phosphoglycerate kinase (PGK)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P09411	Phosphoglycerate kinase 1 (Pck1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Q91W97	Putative hexokinase (Hkdc1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	-	-
Q11PZ7	Triosephosphate isomerase (tpiA)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
Q90XG0	Triosephosphate isomerase B (tpiB)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	ns
Voie des pentoses phosphates					
P14332	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (PGD)	AB1h >A22h	+	+	ns
O95336	6-phosphogluconolactonase (Pgl)	R23h >A22h,	ns	ns	-
Q2TBL6	Transaldolase (TALDO1)	AB1h >A22h	ns	-	-
P50137	Transketolase (Tkt)	AB1h >A22h	+	+	+
Glycogène					
Q2PQH8	Glycogen debranching enzyme (AGL)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q5MIB5	Glycogen phosphorylase, liver form (PYGL)	AB1h <A22h	ns	+	+
Q16851	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP2)	AB1h >A22h	ns	+	ns
Autre					
Q9Y223	Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q9H227	Cytosolic beta-glucosidase (GBA3)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q8TDQ7	Glucosamine-6-phosphate isomerase 2 (GNPDA2)	R23h >A22h,	ns	-	-
Q5R6J8	N-acetylgalactosamine kinase (GALK2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5M868	Non-lysosomal glucosylceramidase (Gba2)	AB1h >A22h	-	-	-
Q8N0Y7	Probable phosphoglycerate mutase 4 (PGAM4)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5R8D0	UDP-glucose 4-epimerase (GALE)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q16222	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase (UAP1)	R23h >A22h,	ns	-	ns

Annexe xiii – Liste de potentiels marqueurs, liés au métabolisme des lipides et du cholestérol, différenciellement exprimés dans le foie, entre les trois lignées après 6 mois d'alimentation (**Effet du génotype**). Pour l'**effet de l'aliment 100 %V** : "ns" : pas d'effet de l'aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l'aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Cholestérol					
Q5R7Z9	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic (HMGCS)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q5U403	Diphosphomevalonate decarboxylase (MVD)	AB1h >A22h	+	+	ns
P08836	Farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q5R6U3	Squalene synthetase (FDFT1)	AB1h >A22h	+	+	+
P52020	Squalene monooxygenase (Sqle)	AB1h >A22h	+	+	ns
P84466	Lanosterol synthase (LSS)	AB1h >A22h	+	+	+
O46420	Lanosterol 14-alpha demethylase (CYP51A1)	AB1h >A22h	+	+	ns
O76062	Delta(14)-sterol reductase (TM7SF2)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q3ZBE9	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating (Nsdhl)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q62904	3-keto-steroid reductase (Hsd17b7)	AB1h >A22h	+	+	ns

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Q6QA33	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-B (hsd17b12b)	AB1h >A22h	+	ns	ns
Q15125	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase (EBP)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q7SXF1	7-dehydrocholesterol reductase (dhcr7)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q8VCH6	24-dehydrocholesterol reductase (Dhcr24)	AB1h >A22h	+	+	ns
Acides biliaires					
Q91X34	Bile acid-CoA :amino acid N-acyltransferase (BAAT)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q14032	Bile acid-CoA :amino acid N-acyltransferase (BAAT)	R23h <A22h	-	-	-
Régulation					
A3KNA7	Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2)	AB1h >A22h	+	+	ns
Lipogenèse					
Q4G176	Acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial (ACSF3)	AB1h >A22h	+	+	ns
P11029	Acetyl-CoA carboxylase (ACAC)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	+
P11497	Acetyl-CoA carboxylase 1 (Acaca)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	+
Q71SP7	Fatty acid synthase (FAS)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Biosynthèse AGPI-LC					
Q6GQN8	Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial (mecr)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9NZ01	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase (TECR)	AB1h >A22h	+	+	ns
Q9JLJ4	Elongation of very long chain fatty acids protein 2 (Elovl 2)	AB1h >A22h	ns	+	ns
Q9EQC4	Elongation of very long chain fatty acids protein 4 (Elovl 4)	R23h >A22h,	+	+	ns
Q920L6	Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (Elovl 6)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Q6DDK2	Fatty acid desaturase 2 (fads2)	AB1h >A22h	+	+	+
Triglycerides					
Q61586	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial (Gpm)	AB1h >A22h	+	+	+
Q8K2C8	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 (Gpat4)	R23h >A22h,	ns	ns	-
Q70VZ8	Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Q6QA69	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (ABHD5)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	+
Phospholipides					
P35790	Choline kinase alpha (CHKA)	AB1h <A22h	-	-	ns
P19836	Choline-phosphate cytidylyltransferase A (Pcyt1a)	AB1h >A22h	ns	+	ns
Q7TSX5	Phosphatidylcholine :ceramide cholinephosphotransferase 1 (Sgms1)	AB1h <A22h	ns	ns	+
Prostaglandines					
Q7ZUC7	Prostaglandin E synthase 2 (ptges2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q5NVM4	Prostaglandin E synthase 3 (ptges3)	AB1h >A22h	ns	-	-
β-oxydation					
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	R23h <A22h	ns	ns	+
Q68Y62	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform (CPT1A)	R23h <A22h, AB1h <A22h	ns	ns	+
Q9DBS4	Acyl-coenzyme A oxidase-like protein (Acox1) (étapa 1)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
A1JK30	Fatty acid oxidation complex subunit alpha (fadJ) (étapa 2)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
Q9WVK7	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (étapa 3)	R23h >A22h	ns	ns	-
O46629	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial (HADHB)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P14882	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial (Pcca)	R23h >A22h	+	ns	ns
P07633	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (Pccb)	AB1h >A22h	ns	ns	-
β-oxydation (peroxisomes)					
Q9UKG9	Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase (transfert)	R23h >A22h	ns	-	-
O15254	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3 (étapa 1)		ns	ns	-
O75521	Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase (étapa 2)	AB1h >A22h	ns	ns	ns
P97852	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (Hsd17b4)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Activation Fatty Acid					
P18163	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 (Acs11)	AB1h <A22h	ns	+	+
P33121	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	-
O60488	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4 (Acs14)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Q8JZR0	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5 (Acs15)	R23h <A22h	+	+	+
Q9UKU0	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 6 (Acs16)	AB1h >A22h	ns	+	+
Q7ZYC4	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase (ACSBG2)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	-
Transport					
Q32PJ2	Apolipoprotein A-IV (APO4-4)	AB1h >A22h	ns	ns	-
Q9UBJ2	ATP-binding cassette sub-family D member 2 (ABCD2)	AB1h >A22h	ns	ns	-
O95477	ATP-binding cassette sub-family A member 1 (Abca1)	AB1h <A22h	-	-	+
P35610	Sterol O-acyltransferase 1 ou acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT)	AB1h >A22h	ns	-	-
Autre					
P15304	Hormone-sensitive lipase (Lipe)	AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q5R4S0	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2 (PRKAG2)	R23h <A22h,	ns	+	+

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Q64559	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase (Acot7)	AB1h >A22h	-	-	-
A3QK15	Acetoacetyl-CoA synthetase (AACCS)	AB1h >A22h	+	+	ns
P0C7M7	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM4, mitochondrial (ACSM4)	AB1h <A22h	-	-	-
Q5RBR7	Acyl-protein thioesterase 1 (LYPLA4)	AB1h >A22h	-	-	-
Q5K4L6	Long-chain fatty acid transport protein 3 (SLC27A3)	R23h <A22h, AB1h <A22h	ns	ns	+
Q9UP65	Cytosolic phospholipase A2 gamma (PLA2G4C)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P97524	Very long-chain acyl-CoA synthetase (Slc27a2)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P97524	Very long-chain acyl-CoA synthetase	R23h <A22h	-	ns	ns

Annexe xiv – Liste de potentiels marqueurs, liés à l’immunité, différenciellement exprimés dans le foie, entre les trois lignées après 6 mois d’alimentation (**Effet du génotype**). Pour l’**effet de l’aliment 100 %V** : "ns" : pas d’effet de l’aliment, "+" : le gène est sur-exprimé avec l’aliment V et "-" : le gène est sous-exprimé avec cet aliment.

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Complément					
Q63514	C4b-binding protein alpha chain (C4bpa)	R23h >A22h,	ns	ns	ns
P98093	Complement C3 (c3)	AB1h <A22h	+	+	+
Q2UVX4	Complement C3 (C3)	R23h <A22h	+	+	+
P98093	Complement C3 (c3)	R23h <A22h	ns	ns	ns
P04186	Complement factor B (Cfb)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P81187	Complement factor B (CFB)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P81187	Complement factor B (CFB)	R23h <A22h	+	ns	+
P08603	Complement factor H (CFH)	AB1h <A22h	-	-	+
Q28085	Complement factor H (CFH)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P08603	Complement factor H (CFH)	R23h <A22h	-	-	+
Q28085	Complement factor H (CFH)	R23h <A22h	+	+	+
P06909	Complement factor H (Cfh)	R23h <A22h	ns	-	+
Q03591	Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)	R23h <A22h, AB1h <A22h	ns	-	+
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (CFHR5)	AB1h <A22h	ns	-	+
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (CFHR5)	R23h <A22h	ns	ns	+
Q5R5A4	Complement factor I (CFI)	R23h <A22h	ns	+	+
P05156	Complement factor I (CFI)	R23h <A22h, AB1h <A22h	ns	ns	+
P20023	Complement receptor type 2 (CR2)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	+
O02839	Membrane cofactor protein (CD46)	R23h >A22h	ns	ns	ns
P05155	Plasma protease C1 inhibitor (SERPING1)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P11680	Properdin (Cfp)	AB1h <A22h	-	-	+
Réponse inflammatoire					
P28800	Alpha-2-antiplasmin (SERPINF2)	R23h <A22h, AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q61247	Alpha-2-antiplasmin (Serpinf2)	R23h <A22h, AB1h <A22h	ns	ns	+
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	AB1h <A22h	-	ns	ns
P09034	Argininosuccinate synthase (Ass1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	ns	ns	-
P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1)	AB1h <A22h	ns	ns	ns
P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1)	R23h <A22h	-	-	ns
P05554	CCAAT/enhancer-binding protein alpha (Cebpa)	R23h >A22h, AB1h >A22h	+	+	ns
Q3T0B9	CCAAT/enhancer-binding protein gamma (CEBPG)	AB1h <A22h	ns	+	+
Q06194	Coagulation factor VIII (F8)	R23h >A22h	+	ns	ns
Q91740	Fibronectin (fn1)	AB1h <A22h	ns	ns	+
P07589	Fibronectin (FN1)	AB1h <A22h	ns	-	ns
P04937	Fibronectin (Fn1)	R23h <A22h	+	+	+
Q91X72	Hemopexin (Hpx)	R23h <A22h	+	+	+
Q5R543	Hemopexin (HPX)	R23h <A22h	+	+	+
Q1ZZU7	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	R23h >A22h	ns	-	-
Q03626	Murinoglobulin-1 (Mug1)	AB1h <A22h	+	+	+
Q61E52	Murinoglobulin-2 (Mug2)	R23h <A22h	+	+	+
Q9NPH5	NADPH oxidase 4 (NOX4)	R23h <A22h	ns	+	+
Q9Y239	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1)	R23h >A22h	+	ns	-
P35543	Serum amyloid A-3 protein (SAA3)	AB1h <A22h	ns	ns	ns
Q9JLF7	Toll-like receptor 5 (Tlr5)	R23h <A22h,	-	-	ns

SP	Description	Effet Génotype	Effet aliment 100%V		
			R23h	AB1h	A22h
Cytokines					
P78556	C-C motif chemokine 20 (CCL20)	R23h >A22h	<i>ns</i>	-	-
P25963	NF-kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA)	R23h <A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
P59046	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12 (MSH6)	AB1h <A22h	<i>ns</i>	-	<i>ns</i>
Q5E947	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
P42533	Tissue factor (F3)	AB1h <A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	+
Activation lymphocytes T					
Q5ZL72	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
P31081	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	<i>ns</i>	-	-
Q64640	Adenosine kinase (Adk)	R23h >A22h	+	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Apoptose					
O60238	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BNIP3L)	AB1h <A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Q92934	Bcl2 antagonist of cell death (BAD)	R23h <A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Q4V8K2	Beta-catenin-like protein 1 (Ctnnb1)	AB1h >A22h	-	-	-
O60238	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BNIP3L)	R23h <A22h	-	<i>ns</i>	<i>ns</i>
O43324	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1 (EEF1E1)	R23h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
Autre					
P09034	Argininosuccinate synthase (Ass1)	R23h >A22h, AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (Atp5a1)	AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
P19483	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (Atp5b)	AB1h >A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-
Q63664	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8 (Kcnj8)	R23h >A22h	+	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Q8CFN2	Cell division control protein 42 homolog (Cdc42)	R23h >A22h	<i>ns</i>	-	-
P49917	DNA ligase 4 (LIG4)	R23h <A22h, AB1h <A22h	<i>ns</i>	<i>ns</i>	+
P43247	DNA mismatch repair protein Msh2 (Msh2)	R23h >A22h, AB1h >A22h	<i>ns</i>	-	-
P52701	DNA mismatch repair protein Msh6 (MSH6)	AB1h >A22h	-	-	-
Q9H1D9	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC6 (POLR3F)	R23h >A22h	-	<i>ns</i>	-
Q9Y1B9	Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1A)	R23h <A22h	<i>ns</i>	-	<i>ns</i>
B5X8M4	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 (brcc3)	R23h >A22h	+	+	<i>ns</i>
P11941	Lysozyme C II	R23h <A22h	-	-	+
P35400	Metabotropic glutamate receptor 7 (Grm7)	R23h >A22h	+	+	+
Q9R189	Protein unc-13 homolog D (Unc13d)	R23h <A22h, AB1h <A22h	-	<i>ns</i>	+
P23492	Purine nucleoside phosphorylase (Np)	R23h >A22h	+	<i>ns</i>	<i>ns</i>
P00491	Purine nucleoside phosphorylase (NP)	R23h <A22h	+	+	+
Q9UH65	Switch-associated protein 70 (SWAP70)	R23h <A22h	<i>ns</i>	+	+
Q568B8	Torsin family protein C9orf167 homolog (zgc :110567)	R23h <A22h	+	+	+
P13051	Uracil-DNA glycosylase (UNG)	AB1h >A22h	-	-	-
P36372	Antigen peptide transporter 2 (Tap2)	AB1h >A22h	<i>ns</i>	-	-

Analyse du transcriptome intestinal

Annexe xv – Résultat de l'analyse d'enrichissement d'ontologies de gènes dans le foie, après 6 mois d'alimentation (Cutoff P-value < 0,01 ; Benjamini < 0,1).

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
R23h versus AB1h				
Mitochondrie				
GO :0005739	Mitochondrion	237	3,59E-06	2,25E-04
Nucléase activité				
GO :0004518	Nuclease activity	45	1,01E-05	6,09E-03
Noyau				
GO :0005730	Nucleolus	147	4,41E-23	2,49E-20
GO :0031981	Nuclear lumen	244	4,19E-16	1,25E-13
Organelle				
GO :0031974	Membrane-enclosed lumen	302	2,38E-13	4,48E-11
GO :0070013	Intracellular organelle lumen	290	1,38E-12	1,56E-10
GO :0043233	Organelle lumen	291	5,30E-12	4,98E-10
GO :0043228	Non-membrane-bounded organelle	390	5,70E-08	4,59E-06
GO :0043232	Intracellular non-membrane-bounded organelle	390	5,70E-08	4,59E-06
Complexe ribonucléoprotéique				
GO :0030529	Ribonucleoprotein complex	143	6,93E-13	9,77E-11
GO :0022613	Ribonucleoprotein complex biogenesis	61	4,65E-11	5,53E-08
Ribosome				
GO :0042254	Ribosome biogenesis	46	4,48E-08	2,28E-05
Traduction				
GO :0006396	Rna processing	159	1,38E-19	4,93E-16
GO :0003723	Rna binding	188	2,21E-16	2,70E-13
GO :0008380	Rna splicing	81	4,12E-11	7,35E-08
GO :0034470	Ncrna processing	59	2,00E-09	1,77E-06
GO :0034660	Ncrna metabolic process	70	3,73E-09	2,66E-06
GO :0006397	Mrna processing	88	8,93E-09	5,31E-06
GO :0005681	Spliceosome	45	7,36E-07	5,19E-05
GO :0016071	Mrna metabolic process	91	3,74E-07	1,67E-04
GO :0006364	Rrna processing	33	1,55E-06	6,16E-04
GO :0016072	Rrna metabolic process	33	2,34E-06	8,35E-04
GO :0006399	Trna metabolic process	38	2,21E-05	6,56E-03
GO :0008033	Trna processing	26	2,05E-05	6,62E-03
AB1h versus A22h				
Mitochondrie				
GO :0044429	Mitochondrial part	54	1,01E-07	3,69E-05
GO :0031974	Membrane-enclosed lumen	91	4,71E-07	8,62E-05
GO :0005739	Mitochondrion	80	3,31E-06	2,42E-04
GO :0031980	Mitochondrial lumen	25	1,13E-05	6,90E-04
GO :0005759	Mitochondrial matrix	25	1,13E-05	6,90E-04
GO :0005740	Mitochondrial envelope	36	8,77E-05	4,01E-03
GO :0045259	Proton-transporting atp synthase complex	10	8,75E-05	4,56E-03
GO :0005743	Mitochondrial inner membrane	29	2,86E-04	8,67E-03
GO :0045263	Proton-transporting atp synthase complex, coupling factor f(o)	7	5,38E-04	1,30E-02
GO :0044455	Mitochondrial membrane part	11	6,39E-04	1,37E-02
GO :0031966	Mitochondrial membrane	32	7,70E-04	1,47E-02
GO :0016469	Proton-transporting two-sector atpase complex	10	2,33E-03	3,80E-02
GO :0033177	Proton-transporting two-sector atpase complex, proton-transporting domain	7	3,24E-03	5,04E-02
GO :0005761	Mitochondrial ribosome	6	5,41E-03	7,35E-02
Noyau				
GO :0000786	Nucleosome	7	6,00E-04	1,36E-02
GO :0031981	Nuclear lumen	57	3,55E-03	5,28E-02
GO :0005730	Nucleolus	29	4,82E-03	6,83E-02
Organelle				
GO :0043233	Organelle lumen	88	1,32E-06	1,20E-04
GO :0070013	Intracellular organelle lumen	87	1,31E-06	1,60E-04

GO		Nombre de sondes	P-Value	Benjamini
GO :0031967	Organelle envelope	45	9,56E-05	3,88E-03
GO :0031975	Envelope	45	1,83E-04	6,66E-03
GO :0019866	Organelle inner membrane	30	4,43E-04	1,15E-02
GO :0043232	Intracellular non-membrane-bounded organelle	107	1,58E-03	2,71E-02
GO :0043228	Non-membrane-bounded organelle	107	1,58E-03	2,71E-02
GO :0000313	Organellar ribosome	6	5,41E-03	7,35E-02
Autres				
GO :0032993	Protein-dna complex	8	9,92E-04	1,80E-02
GO :0004332	Fructose-bisphosphate aldolase activity	5	5,00E-04	9,21E-02
GO :0016832	Aldehyde-lyase activity	6	1,34E-04	3,80E-02
Catabolisme protéique				
GO :0005839	Proteasome core complex	7	4,28E-04	1,20E-02
GO :0000502	Proteasome complex	11	7,16E-04	1,45E-02
GO :0004298	Threonine-type endopeptidase activity	7	5,34E-04	7,45E-02
GO :0070003	Threonine-type peptidase activity	7	5,34E-04	7,45E-02
Repliement protéique				
GO :0006457	Protein folding	23	1,75E-06	3,25E-03
Complexe ribonucléoprotéique				
GO :0030529	Ribonucleoprotein complex	39	2,04E-04	6,76E-03
Traduction				
GO :0006399	Trna metabolic process	16	1,10E-04	5,00E-02
GO :0016876	Ligase activity, forming aminoacyl-trna and related compounds	10	5,61E-04	6,31E-02
GO :0016875	Ligase activity, forming carbon-oxygen bonds	10	5,61E-04	6,31E-02
GO :0006412	Translation	33	1,83E-04	6,57E-02
GO :0043039	Trna aminoacylation	10	3,90E-04	9,84E-02
GO :0043038	Amino acid activation	10	3,90E-04	9,84E-02
GO :0003723	Rna binding	54	3,86E-06	2,24E-03
GO :0008380	Rna splicing	27	8,67E-06	5,36E-03
GO :0006396	Rna processing	43	7,13E-06	6,60E-03

Annexe xvii – Poids moyen (en g) des poissons sélectionnés (SU) et des poissons témoins (SY) nourris avec un aliment 100% V (V ou V_{old}), l'aliment M ou l'aliment commercial (C), lors de l'expérimentation de réponse à la sélection RS2. Des analyses de la variance ont été effectuées pour chaque date. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la seconde partie du tableau.

Condition	Date	63	76	91	105	119	134	155	176	188	202
SY-M		0,39±0,0 a	0,84±0,0 ab	1,56±0,1	2,86±0,1	4,67±0,1 a	7,49±0,2 a	13,77±0,3 a	24,40±0,4 a	31,51±0,4 a	43,62±0,7 a
SY-C		0,43±0,0 a	0,96±0,0 a	1,74±0,0	3,13±0,0	5,20±0,0 a	8,52±0,1 a	15,45±0,1 a	26,53±0,1 a	34,50±0,4 a	48,09±0,8 a
SY-V		0,24±0,0 b	0,43±0,0 d	0,78±0,0	1,50±0,0	2,47±0,0 c	3,73±0,0 d	6,69±0,1 d	11,93±0,2 d	15,45±0,2 c	21,40±0,2 d
SY- V_{old}		0,25±0,0 a	0,44±0,0 d	0,77±0,0	2,93±0,0	2,50±0,1 c	3,89±0,2 cd	6,87±0,4 b	12,33±0,8 cd	15,93±0,9 c	22,54±1,4 cd
SU-M		0,38±0,0 a	0,83±0,0 b	1,55±0,0	2,93±0,0	4,71±0,0 a	7,46±0,1 a	14,25±0,1 a	25,50±0,3 a	32,87±0,6 a	45,60±0,4 a
SU-C		0,41±0,0 a	0,95±0,0 ab	1,75±0,1	3,28±0,1	5,10±0,0 a	8,40±0,1 a	15,36±0,1 a	26,63±0,2 a	32,87±0,7 a	48,63±0,2 a
SU-V		0,28±0,0 b	0,50±0,0 c	0,88±0,0	1,72±0,0	2,85±0,1 b	4,57±0,1 b	8,17±0,1 b	14,43±0,1 b	32,87±0,8 b	26,67±0,1 b
SU- V_{old}		0,26±0,0 b	0,49±0,0 cd	0,87±0,0	1,69±0,0	2,81±0,0 bc	4,44±0,1 bc	8,01±0,2 bc	14,13±0,3 bc	32,87±0,9 b	25,98±0,1 bc
Analyses statistiques :											
Aliment		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Sélection		ns	M=C>V= V_{old}	M=C>V= V_{old}	M=C>V= V_{old}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Interaction		<0,01	SU>SY	SU>SY	SU>SY	ns	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Résultats des analyses statistiques après quatre générations de sélection

Annexe xviii – Taux de survie (%) des poissons sélectionnés (SU) et des poissons témoins (SY) nourris avec l'aliment 100% V, l'aliment M, ou les aliments formulés à partir de matières premières alternatives T et V_{alt} , lors de l'expérimentation de réponse à la sélection RS2. Des analyses de la variance ont été effectuées pour chaque date. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la seconde partie du tableau.

Condition	Date	67	88	111	131	157	178	199
SY-M		93,3±0,8 bc	92,3±1,2 bc	85,9±7,1 a	85,9±7,1 a	85,8±7,1 a	85,8±7,1 a	85,7±7,2 a
SY-V		81,7±1,6 d	54,3±2,2 e	46,9±3,1 b	46,2±3,3 b	46,2±3,3 b	46,1±3,4 b	46,1±3,4 b
SY-T		95,3±0,2 ab	94,6±0,3 ab	94,1±0,4 a	93,9±0,3 a	93,7±0,3 a	93,7±0,3 a	93,7±0,3 a
SY- V_{alt}		96,5±0,4 a	96,1±0,2 a	95,3±0,1 a	94,5±0,3 a	93,9±0,4 a	93,3±0,4 a	92,9±0,4 a
SU-M		92,1±0,2 c	91,1±0,6 bc	90,7±0,7 a	90,6±0,6 a	90,4±0,6 a	90,4±0,6 a	90,4±0,6 a
SU-V		83,1±1,8 d	72,1±3,5 d	67,3±4,4 b	66,3±4,5 b	66,3±4,5 b	66,17±4,5 b	66,17±4,5 b
SU-T		92,8±0,9 bc	92,3±0,8 bc	92,0±0,6 a	92,0±0,6 a	92,0±0,6 a	92,0±0,6 a	92,0±0,6 a
SU- V_{alt}		92,2±0,5 c	90,4±1,4 c	89,8±1,7 a	88,9±1,7 a	87,9±1,9 a	87,0±1,4 a	86,8±1,3 a
Analyse statistique								
Aliment		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01
Sélection		<0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Interaction		<0,01	<0,001	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Annexe xix – Poids moyen (en g) des poissons sélectionnés (SU) et des poissons témoins (SY) nourris avec l'aliment 100% V, l'aliment M, ou les aliments formulés à partir de matières premières alternatives T et V_{alt} , lors de l'expérimentation de réponse à la sélection RS2. Des analyses de la variance ont été effectuées pour chaque date. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la seconde partie du tableau.

Condition	Date 67	88	111	131	157	178	199
SY-M	0,54±0,0 a	1,56±0,0 b	3,61±0,2 a	6,83±0,3 b	14,70±0,4 b	23,79±0,6 b	35,75±1,0 b
SY-V	0,26±0,0 d	0,66±0,0 e	1,76±0,1 d	3,62±0,1 d	7,49±0,3 d	11,52±0,4 d	16,11±0,4 e
SY-T	0,42±0,0 c	1,02±0,0 d	2,09±0,0 cd	3,55±0,1 d	6,48±0,1 d	9,96±0,2 d	14,22±0,4 e
SY- V_{alt}	0,19±0,0 e	0,32±0,0 f	0,51±0,0 e	0,78±0,0 e	1,08±0,0 e	1,59±0,0 e	2,13±0,0 f
SU-M	0,58±0,0 a	1,82±0,0 a	4,32±0,1 a	8,69±0,1 a	20,11±0,2 a	33,22±0,3 a	52,10±0,4 a
SU-V	0,43±0,0 bc	1,04±0,0 d	2,76±0,1 b	5,83±0,1 c	12,54±0,3 b	20,51±1,0 b	29,33±1,3 c
SU-T	0,47±0,0 b	1,27±0,0 c	2,60±0,2 bc	5,12±0,1 c	9,80±0,1 c	15,30±0,5 c	21,85±0,6 d
SU- V_{alt}	0,19±0,0 e	0,32±0,0 f	0,50±0,0 e	0,80±0,0 e	1,17±0,1 e	1,72±0,1 e	2,27±0,0 f
Analyse statistique							
Aliment	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Sélection	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Interaction	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Titre : Vers l'identification des fonctions impliquées dans les capacités de différents génotypes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à survivre et grandir avec un aliment uniquement à base de végétaux.

Mots clés : Truite arc-en-ciel, aquaculture, alimentation végétale, adaptation

Résumé : Dans le contexte du développement spectaculaire de l'aquaculture, les farines et huiles de poissons, qui étaient les composantes principales des aliments aquacoles, ont progressivement été remplacées par des mélanges de produits végétaux. Cependant, le remplacement total n'est pas encore possible sans dégrader les performances des poissons (croissance et survie). Pour continuer son développement durable, l'aquaculture doit davantage s'affranchir de ces matières premières. Une voie de progrès possible est l'utilisation de la variabilité génétique existante dans les populations de truites pour la capacité à survivre et grandir avec des aliments à base de végétaux (Aliments V). Cependant très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes mis en place par certains génotypes pour utiliser plus efficacement ces aliments.

L'objectif de la thèse était d'étudier les caractéristiques à l'origine d'une meilleure utilisation des aliments V chez différents génotypes de truite arc-en-ciel (trois lignées isogéniques et lignée sélectionnée). L'originalité de ce travail repose sur l'étude de la réponse de différentes lignées à un aliment 100 % V, en combinant des approches de physiologie nutritionnelle et de biologie moléculaire

sans *a priori* ou ciblées.

Ainsi les transcriptomes de trois lignées isogéniques, ayant des performances contrastées lorsqu'elles sont nourries avec des aliments V, ont été comparés à court et long terme. Puis des caractères liés à la nutrition, ainsi que l'expression de certains gènes, identifiés grâce à l'étude transcriptomique, ont été étudiés chez une lignée sélectionnée pour sa capacité à survivre et grandir avec un aliment V. Les résultats obtenus ont permis de conclure que l'acceptation de l'aliment V joue un rôle clef, notamment lors des stades précoces. Les résultats obtenus mettent également en avant le rôle prépondérant de la composante immunitaire qui est impactée différemment en fonction des génotypes. Finalement, après 6 mois d'alimentation, alors que le métabolisme des lipides participe à expliquer les différences d'utilisation de l'aliment V chez les lignées isogéniques, il ne paraît pas déterminant chez la lignée sélectionnée. Globalement, nos résultats suggèrent l'existence d'une grande diversité de mécanismes dans les populations de truites leur permettant de survivre et grandir avec un aliment à base de végétaux dépourvu de farine et huiles de poisson.

Title: Towards the identification of the functions involved in the ability of different rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genotypes to survive and grow with a total plant-based diet.

Keywords: Rainbow trout, aquaculture, plant-based diet, adaptation

Abstract: In the context of the exponential development of aquaculture, fish meal and oils, previously the main components of aquaculture feed, have been increasingly replaced by a blend of plant products. However, total replacement is not yet possible without impairing fish performance (survival and growth). To continue its sustainable development, aquaculture must further decrease its reliance on both fish oil and fish meal. In addition to the changes in diet composition, a possible way forward is the use of the genetic variability for the ability to survive and grow with plant-based diets (V diets) existing in trout populations. However, very few studies have investigated the mechanisms implemented by some genotypes to use these diets more efficiently.

The objective of this thesis was to study the characteristics that led to a better utilisation of V diet in different rainbow trout genotypes. The originality of this PhD work relies on the genetic rainbow trout lines whose responses to a 100% V diet were studied by combining nutritional physiology and molecular biology with or without a priori approaches.

Thus, the transcriptomes of three isogenic lines, which have contrasting performances when fed V diets, were compared at short and long term. Then nutrition-related traits, as well as the expression of some genes identified through the transcriptomics analysis, were studied in a line selected for its ability to survive and grow with a V diet.

The results obtained led to the conclusion that the acceptance of V diets plays a key role, particularly in the early stages. The results also highlight the essential role of the immune system, which is impacted differently according to genotypes. Finally, after 6 months of feeding, while lipid metabolism seems to play a role in the differences between genotypes for their ability to efficiently utilize the V diet, this pathway does not appear to play a determinant role in the selected line. Overall, our results suggest that there are a wide variety of mechanisms allowing trout to survive and grow with a total plant-based diet, devoid of both fish meal and oils.

