



HAL
open science

La levure, un ingrédient durable pour améliorer l'efficacité des régimes à base de nouveaux ingrédients chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Laura Frohn

► To cite this version:

Laura Frohn. La levure, un ingrédient durable pour améliorer l'efficacité des régimes à base de nouveaux ingrédients chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Biologie animale. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2023. Français. NNT : 2023PAUU3027 . tel-04503598

HAL Id: tel-04503598

<https://theses.hal.science/tel-04503598>

Submitted on 13 Mar 2024

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

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

THÈSE

UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
École doctorale 211 – Sciences Exactes et leurs Applications

Présentée et soutenue le 07 juillet 2023

par **Laura Frohn**

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
Spécialité : Sciences Agronomiques

LA LEVURE, UN INGRÉDIENT DURABLE POUR AMÉLIORER L'EFFICACITÉ DES RÉGIMES À BASE DE NOUVEAUX INGRÉDIENTS CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)

RAPPORTEURS

- Luísa Maria Pinheiro Valente
- David Mazurais

EXAMINATEURS

- Mathilde Dupont-Nivet
- Patrick Kestemont

DIRECTRICE

- Sandrine Skiba-Cassy

CO-ENCADREMENT

- Karine Pinel

INVITÉS

- Nadège Richard

MEMBRES DU JURY

Professeure / CIIMAR
Chargé de recherches / IFREMER

Directrice de recherches / INRAE
Professeur / Université de Namur

Directrice de recherches / INRAE

Post-doctorante / E2S-UPPA

Responsable R&D / Phileo by Lesaffre

REMERCIEMENTS

Ce projet n'aurait pu voir le jour sans Sandrine Skiba-Cassy, Nadège Richard et Karine Pinel qui ont participé à la direction et à l'encadrement de ces 3 années de thèse. Je tiens à sincèrement vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée en me donnant l'opportunité de réaliser cette thèse qui représente pour moi un aboutissement professionnel et personnel dont je suis fière. Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Sandrine. Au-delà de cette thèse, tu m'as également encadré durant mon stage de Master durant lequel j'ai pris goût à la nutrition des poissons (sans mauvais jeu de mots). Tes qualités scientifiques et humaines m'ont ensuite permis de mener cette thèse à bien et de persévérer dans les moments de doutes. Je tiens également à sincèrement remercier Nadège qui m'a été d'un soutien infaillible durant ces trois années. Tu as été à l'écoute et tu as su me guider (en particulier lorsque j'avais des questions existentielles). Grâce à toi, j'ai également pris goût au monde de l'entreprise et j'ai su y trouver ma place.

Je remercie toute l'équipe NUMEA de Saint Pée-sur-Nivelle. Chacun d'entre vous m'a apporté son savoir technique et/ou scientifique et m'aura fait grandir scientifiquement. Remerciement spécial à Stéphane Panserat qui a continué à me conseiller et à m'apporter ses lumières durant ces années de thèse. Je remercie chaleureusement Peyo, Fred, Anthony et Franck pour avoir chouchouté mes poissons au cours de trois expériences. Merci pour votre professionnalisme, votre disponibilité et votre réactivité (surtout pour les demandes de dernière minute, oups). J'aimerais également remercier Elorri Errandonea qui a été ma stagiaire, Anne Surget et Laurence Larroquet qui ont fourni un travail énorme et de grande qualité dans le cadre des analyses de la composition des aliments et des fèces.

J'adresse mes sincères remerciements à l'équipe de Phileo qui m'a tout de suite intégré dans sa petite famille. Je vous remercie chaleureusement pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre réactivité lorsque j'avais besoin d'informations ou de conseils. Tous les moments que j'ai passé avec vous sont aujourd'hui d'excellents souvenirs (notamment le stage de survie où vous aurez réussi à me faire manger des insectes !). Je souhaite particulièrement remercier Marie Yammine et Isabelle Mouly pour le travail fourni dans le cadre de l'identification des peptides contenus dans l'extrait de levure.

Je tiens à remercier Martin Beaumont, Julien Bobe, Pauline Peltier-Pain et Emilie Cardona qui ont été les membres de mon comité de suivi individuel. La pertinence de vos suggestions m'ont permis d'étoffer mon travail de thèse et de le rendre plus riche. J'ai également apprécié votre écoute, votre soutien et surtout vos grandes qualités humaines.

Ce projet de thèse n'aurait pas non plus abouti sans l'évaluation de mon travail. Je remercie donc sincèrement Luísa Maria Pinheiro Valente et David Mazurais pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteurs. Mes remerciements se tournent également vers Mathilde Dupont-Nivet et Patrick Kestemont qui ont accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examineurs.

Cette thèse n'aurait pas été aussi riche sans ses nombreuses collaborations. First, I would like to thank the Animal Health and Aquaculture Team from CIIMAR with which I had the chance to collaborate during 3 months. My stay in Portugal allowed me to obtain essential results for the achievement of my project. I warmly thank Benjamin Costas for his kindness and his hospitality within his team. I would also like to thank Diogo Peixoto for his pedagogy, his help in the analysis of plasma immune parameters and his unlimited humor. I learned a lot from you, especially when it comes to pranks. I would also like to thank Carla Teixeira for her knowledge and her help in the realization of histological analysis. You gave me a new interest for this type of analysis. I sincerely thank all the members of the team for their kindness, their daily help and the great moments spent outside the laboratory. Finally, this experience would not have been the same without Tonka and Carlos. You remain precious friends and I miss you a lot.

La collaboration avec l'équipe de SIGENAE m'aura également permis d'utiliser des approches transcriptomiques. Je tiens à sincèrement remercier Christophe Klopp pour ses précieux conseils qui auront permis de mettre en place ces analyses. Je remercie de tout cœur Sarah Maman Haddad et Cervin Guyomar pour leur aide de qualité dans l'analyse bio-statistique des données. Ma patience aura été mise à rude épreuve (et la vôtre certainement aussi) mais vous avez su être là pour m'épauler. Je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Un grand merci à l'équipe TOXALIM de l'INRAE de Toulouse pour le prêt du matériel histologique sans lequel la qualité des coupes n'aurait pas été la même. Je remercie particulièrement Hervé Remignon et Christel Cartier pour leur accueil, leur pédagogie et leur intérêt pour mon sujet de thèse.

Je remercie sincèrement l'équipe du LPGP de l'INRAE de Rennes pour son accueil. Mes remerciements se tournent en particulier vers Jérôme Bugeon qui a développé une macro permettant d'automatiser l'analyse de mes nombreuses coupes histologiques. Sans toi, je serais peut-être encore en train de compter les cellules à mucus manuellement, qui sait ?

Qu'auraient été ces trois années de thèse sans mes acolytes Elodie, Soizig, Marius et Simon? C'est avec beaucoup d'émotion que je rédige ces quelques lignes car je mesure la chance de vous avoir eu à mes côtés. La liste va être très longue si je dois énumérer tous nos souvenirs mais l'amitié sincère qui nous lie aujourd'hui est la chose la plus importante à mes yeux. Par contre... Elodie, je n'oublierai pas le jour où tu as essayé de me rendre aveugle avec une Ginger Beer. Soizig, tu sais que je t'aime de tout mon cœur mais les critiques cruelles et malveillantes sur les caniches ça va 5 minutes, « tu arrêtes maintenant ». Marius, les *mental breakdown* pendant la rédaction (et aussi avant) n'auraient pas eu la même saveur si je ne les avais pas partagés avec toi. P.S. : la prochaine fois que tu fais un barbecue avec du laurier-rose tu ne m'appelles PAS, ok ? Simon, je t'attends toujours au Trampoline Park... Tu as fini de faire le ménage, c'est bon ? Je n'oublie pas non plus mes copines Camille et Stellia, présentes tous les matins pour partager un café dans la joie et la bonne humeur. Les débuts de journée sans vous vont être particulièrement difficiles. Raph, au-delà de m'avoir fait mourir de rire à l'ISFNF, tu m'as également partagé tes précieuses connaissances sur le microbiote et les probiotiques qui m'ont été très utiles pendant la rédaction de mon manuscrit. Enfin, comment oublier toutes ces personnes ayant participé à mon épanouissement personnel : Anne, Hélène, Mélanie, Léa, PJ, Amaïa, Edel et Ambra. Merci d'avoir été là au quotidien, j'ai ri jusqu'au bout grâce à vous. Nathan, on se connaît bien.

Aujourd'hui, je n'en serais pas arrivée là sans le soutien inconditionnel de mes parents, de mon frère et de ma grand-mère adorée. Au-delà de m'avoir apporté un appui financier durant ces longues années d'études, votre présence et vos conseils ont été décisifs dans toutes les étapes de ma vie. Je n'aurais pas pu réussir sans une famille aussi aimante. Loïc, tu as été mon échappatoire pendant ces trois années. Tu as particulièrement excellé dans ta capacité à tourner en dérision mes craquages et mes lubies (et contrairement à ce que tu crois, le caniche n'en est pas une). Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté et combien ta présence m'aura été importante et nécessaire au quotidien.

TABLE DES MATIÈRES

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	1
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	2
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	8
1. L'aquaculture : situation actuelle et importance dans la sécurité alimentaire mondiale	9
2. Une aquaculture durable pour pérenniser le développement du secteur.....	12
a. Généralités.....	12
b. La substitution des ingrédients marins par des ingrédients alternatifs	13
c. Les limites à l'utilisation d'ingrédients alternatifs dans les aliments aquacoles.....	15
d. Les stratégies nutritionnelles pour améliorer les régimes à base de nouveaux ingrédients	16
3. La truite arc-en-ciel, un modèle d'étude à haute valeur économique	17
4. Notions de nutrition en aquaculture et importance de produire un aliment efficient.....	19
a. Généralités.....	19
b. Besoins énergétiques	20
c. Besoins protéiques.....	20
d. Besoins lipidiques	21
e. Besoins vitaminiques et minéraux.....	21
f. Risques associés à la formulation de nouveaux ingrédients aquacoles	22
CHAPITRE 1 – REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	24
PARTIE 1 - Vers une aquaculture plus durable : l'utilisation de matières premières alternatives aux farines de poisson chez les espèces carnivores	25
1. Les matières premières végétales	27
a. Généralités et profil nutritionnel des principaux ingrédients végétaux utilisés dans la formulation des aliments aquacoles.....	27
b. Les facteurs antinutritionnels des ingrédients végétaux	31
c. Effets secondaires des régimes végétaux	34
2. Les protéines animales transformées.....	38
a. Généralités et profil nutritionnel des principaux coproduits d'animaux terrestres.....	38
b. Effets de l'inclusion de coproduits d'origine animale dans les aliments pour poissons carnivores	43
c. L'acceptabilité sociale des régimes à base de coproduits animaux en Europe	46

PARTIE 2 – Les interactions entre nutrition et immunité chez les poissons d'élevage	49
1. Anatomie gastro-intestinale et fonctions dans la physiologie digestive	51
2. Le système immunitaire des poissons téléostéens	57
a. L'immunité innée	57
b. L'immunité adaptative	65
c. Les tissus lymphoïdes	67
d. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses	67
3. Les facteurs nutritionnels modulant l'immunité et la santé des poissons	69
a. Le jeûne	69
b. Le profil nutritionnel de l'aliment aquacole	72
c. Les additifs fonctionnels	74
PARTIE 3 – La levure : un candidat multifonctions idéal pour améliorer l'efficacité des régimes sans farine de poissons ?	82
1. Généralités sur la levure	83
2. Les propriétés nutritionnelles des levures et de leurs dérivés	85
a. Propriétés nutritionnelles des levures entières	85
b. Propriétés nutritionnelles et bioactives des fractions pariétales et cytosoliques des levures	86
3. Les applications de la levure en nutrition aquacole	90
a. La levure entière en tant que substitut protéique à la farine de poisson	90
b. Les fractions levuriennes pariétales et cytosoliques en tant qu'additifs fonctionnels	91
CHAPITRE 2 – OBJECTIFS DE LA THÈSE	96
CHAPITRE 3 – PLANS EXPÉRIMENTAUX ET METHODOLOGIE	99
1. Travaux préliminaires : culture cellulaire d'une ligne intestinale de truite arc-en-ciel et essai de prolifération en présence d'extrait de levure	100
2. Formulation et production des aliments expérimentaux	103
3. Protocoles expérimentaux	107
a. Essai de digestibilité des aliments expérimentaux	107
b. Evaluation des performances zootechniques à travers un essai de croissance de 12 semaines	109
c. Cinétique de court terme	112
4. Protocoles analytiques	114
a. Mesure de la digestibilité des aliments expérimentaux	114
b. Calculs de l'utilisation des nutriments contenus dans les aliments expérimentaux	114
c. Analyses histologiques de l'intestin	115
d. Dosage des marqueurs inflammatoires plasmatiques	115
e. Analyses moléculaires	116
f. Analyses complémentaires : analyse peptidomique de l'extrait de levure	121
CHAPITRE 4 – RESULTATS	122
1. <i>In vitro</i> : prolifération d'entérocytes en présence d'extrait de levure dans un milieu carencé en acides aminés	123

a.	Contexte et objectif.....	123
b.	Résultats et éléments de discussion	123
2.	<i>In vivo</i> : effets à long-terme d’une supplémentation en extrait de levure dans un régime dépourvu de farine de poissons et à base de protéines animales transformées.....	125
a.	Contexte.....	125
b.	Objectif	125
c.	Résultats	126
d.	Eléments de discussion	126
e.	Article 1.....	128
f.	Résultats complémentaires : analyse des peptides bioactifs	166
3.	<i>In vivo</i> : effets à court-terme d’une supplémentation en extrait de levure dans un régime dépourvu en farine de poissons composé de protéines animales transformées ou de végétaux.....	167
a.	Contexte et objectifs	167
b.	Approche méthodologique.....	167
c.	Résultats	168
d.	Eléments de discussion	168
e.	Article 2.....	169
CHAPITRE 5 – DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		201
PARTIE 1 - Effets à long terme d’une supplémentation en extrait de levure dans un régime à base de protéines végétales et de coproduits animaux		202
1.	La supplémentation en extrait de levure améliore l’efficacité d’un régime sans farine de poissons composé d’ingrédients alternatifs	202
a.	Bénéfices de la supplémentation en extrait de levure sur les performances de croissance	203
b.	Les performances de croissance s’expliquent-t-elles par une altération de la digestibilité, de la consommation et/ou de l’utilisation métabolique des aliments expérimentaux ?	203
c.	La santé de l’intestin reflète-t-elle les phénotypes observés ?	205
2.	La supplémentation en extrait de levure amène des certitudes quant aux liens entre la nutrition et l’immunité chez la truite arc-en-ciel	208
a.	L’extrait de levure stimule les fonctions immunitaires sériques de manière modérée	208
b.	L’extrait de levure module l’expression de transcrits impliqués dans les fonctions immunitaires et la réponse au stress	211
PARTIE 2 - Les effets observés à long-terme résultent-ils d’une réponse précoce des truites aux aliments expérimentaux ?		217
1.	Les réponses de long terme ne résultent pas d’une réponse précoce aux aliments expérimentaux.....	217
2.	La physiologie intestinale et hépatique est davantage influencée par le jeûne de courte durée ayant précédé la réalimentation	218
PARTIE 3 - Conclusion générale et perspectives.....		223
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		227

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Article 1

Laura Frohn, Diogo Peixoto, Cervin Guyomar, Carla Teixeira, Frédéric Terrier, Pierre Aguirre, Sarah Maman Haddad, Julien Bobe, Benjamin Costas, Nadège Richard, Karine Pinel, Sandrine Skiba-Cassy. Yeast extract improves growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fishmeal-free diet and modulates the hepatic and distal intestine transcriptomic profile. Soumis dans *British Journal of Nutrition*.

Article 2

Laura Frohn, Diogo Peixoto, Frédéric Terrier, Benjamin Costas, Jérôme Bugeon, Christel Cartier, Nadège Richard, Karine Pinel, Sandrine Skiba-Cassy. Gut physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is influenced more by short-term fasting followed by refeeding than by feeding fishmeal-free diets. Soumis dans *American Journal of Physiology*.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales

Laura Frohn, Sandrine Skiba-Cassy, Frédéric Terrier, Pierre Aguirre, Cervin Guyomar, Sarah Maman Hadad, Julien Bobe, Christophe Klopp, Benjamin Costas, Carla Teixeira, Diogo Peixoto, Nadège Richard, Karine Pinel. A yeast product improves the efficiency of a processed animal protein diet in rainbow trout by modulating the gut response. XX International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (Sorrento, Italie, 2022).

Laura Frohn, Sandrine Skiba-Cassy, Frédéric Terrier, Pierre Aguirre, Cervin Guyomar, Sarah Maman Hadad, Julien Bobe, Christophe Klopp, Benjamin Costas, Carla Teixeira, Diogo Peixoto, Nadège Richard, Karine Pinel. Un extrait de levure améliore l'efficacité d'un régime à base de protéines animales transformées chez la truite arc-en-ciel et module la réponse intestinale. 7èmes Journées de la Recherche Piscicole – itavi (Paris, France, 2022).

Laura Frohn, Sandrine Skiba-Cassy, Frédéric Terrier, Pierre Aguirre, Cervin Guyomar, Sarah Maman Hadad, Julien Bobe, Christophe Klopp, Benjamin Costas, Carla Teixeira, Diogo Peixoto, Nadège Richard, Karine Pinel. A yeast product improves the efficiency of a processed animal protein diet in rainbow trout by modulating the gut response. Mucosal Health in Aquaculture (Madrid, Espagne, 2022).

Communication affichée

Laura Frohn, Diogo Peixoto, Carla Teixeira, Frédéric Terrier, Pierre Aguirre, Cervin Guyomar, Sarah Maman Haddad, Julien Bobe, Christophe Klopp, Benjamin Costas, Nadège Richard, Karine Pinel, Sandrine Skiba-Cassy. Yeast extract improves the efficiency of a fishmeal-free diet in rainbow trout: effects on the intestinal response. World Aquaculture Society (Singapore, 2022).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Composition nutritionnelle moyenne des animaux aquatiques et des animaux terrestres pour l'alimentation humaine (Tacon and Metian, 2013).....	11
Tableau 2 Besoins nutritionnels minimum de la truite arc-en-ciel permettant d'assurer des performances optimales (Hardy, 2021; Lall and Kaushik, 2021; NRC, 2011; Oliva-Teles et al., 2015).	23
Tableau 3 Compositions proximales moyennes des farines de poisson et des principaux ingrédients végétaux inclus dans les aliments aquacoles (Alfred, 2020; Gatlin III et al., 2007; IAFFD, 2022; Kaiser et al., 2022; Martineau-Côté et al., 2022; Mattila et al., 2018; Oliva-Teles et al., 2015; Pavan Kumar et al., 2014).....	30
Tableau 4 Compositions moyennes en acides aminés de la farine de poissons et des principales farines végétales incluses dans les aliments aquacoles (Kaiser et al., 2022; Oliva-Teles et al., 2015).	31
Tableau 5 Présence (♦) ou absence des principaux facteurs antinutritionnels dans les ingrédients végétaux (adapté de Oliva-Teles et al., 2015 et Francis et al., 2001).....	34
Tableau 6 Exemples de traitements appliqués aux matières premières végétales permettant de réduire ou d'annuler l'activité des facteurs antinutritionnels (adapté de Oliva-Teles, 2015 et Francis et al., 2001).....	38
Tableau 7 Compositions proximales moyennes et profil en acides aminés des principaux coproduits animaux pouvant être utilisés dans la formulation des aliments aquacoles (Ayadi et al., 2012; Bandara, 2018; Bureau, 2006; Woodgate et al., 2022).....	42
Tableau 8 Les catégories de coproduits animaux et leurs utilisations respectives en Europe (Woodgate et al., 2022).....	48
Tableau 9 Principales populations de leucocytes impliqués dans l'immunité chez les poissons téléostéens (Mokhtar and Abdelhafez, 2021).	60
Tableau 10 Composition nutritionnelle moyenne des principales espèces de levure utilisées en aquaculture (Agboola et al., 2021; Øverland and Skrede, 2017; Shurson, 2018).	88
Tableau 11 Teneurs en acides aminés dans la solution contenant l'extrait de levure (YE) utilisée dans l'essai de prolifération d'entérocytes et dans le milieu de culture MEM.	101
Tableau 12 Composition de l'extrait de levure (YE) (Prosaf®, Phileo by Lesaffre, Marcq-en-Barœul, France).....	104

Tableau 13 Formulation et composition proximale des aliments expérimentaux.	105
Tableau 14 Liste des gènes dont les expressions ont été mesurées par RT-qPCR dans les différents tissus.	120
Tableau 15 Résultats de l'analyse peptidomique de l'extrait de levure utilisé dans l'aliment PAP+YE.	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Evolution mondiale de la production halieutique issue des pêches de capture et de l'aquaculture de 1950 à 2020. Données issues du logiciel FishStatJ de la FAO (FAO, 2022a).	9
Figure 2 Evolution et perspectives de la disponibilité en protéines (A) et de la consommation (B) des principaux produits alimentaires au niveau mondial. Données issues des Statistiques et perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2022-2031 (OCDE and FAO, 2022b).	12
Figure 3 Evolution des prix moyens annuels de la tonne métrique des farines de poissons et des farines de soja de 2003 à 2022. Données issues de la base de données IndexMundi (https://www.indexmundi.com/).....	14
Figure 4 Parts des ingrédients utilisés (en %) dans les aliments pour saumons en Norvège en 1990 et 2020 (Aas et al., 2019). Les micronutriments regroupent les vitamines, les minéraux et les acides aminés. La catégorie « Autres » rassemble par exemple les farines d'insectes, les microalgues et les levures.	17
Figure 5 Production aquacole de truite arc-en-ciel dans le monde et en France en 2020 (FAO, 2022a). Les pourcentages représentent les quantités de truite arc-en-ciel produites rapportées aux volumes totaux produits dans le monde et en France, respectivement.....	19
Figure 6 Impact environnemental des farines de poisson, des produits à base de soja (farine et concentré protéique) et des coproduits d'origine animale (farines de plumes hydrolysées, de viande, d'os et de sang). Données brutes disponibles sur https://www.wur.nl/en/show/feedprint-calculate-co2-per-kilogram-meat-milk-or-eggs.htm	41
Figure 7 Profils moyens en acides aminés essentiels (en g/100g de protéines) de la farine de poisson et de plusieurs coproduits d'animaux terrestres (farines de viande, de sous-produits de volailles et de sang) (Cho and Kim, 2011).	43
Figure 8 Morphologie gastro-intestinale et principaux tissus impliqués dans les fonctions immunitaires chez la truite arc-en-ciel (Bjørngen et al., 2020).	53
Figure 9 Illustration des couches de l'intestin médian chez les poissons (vue transversale) (Bjørngen et al., 2020).....	54
Figure 10 Illustration des éléments d'une villosité intestinale chez les poissons (vue transversale) (Bjørngen et al., 2020).	54

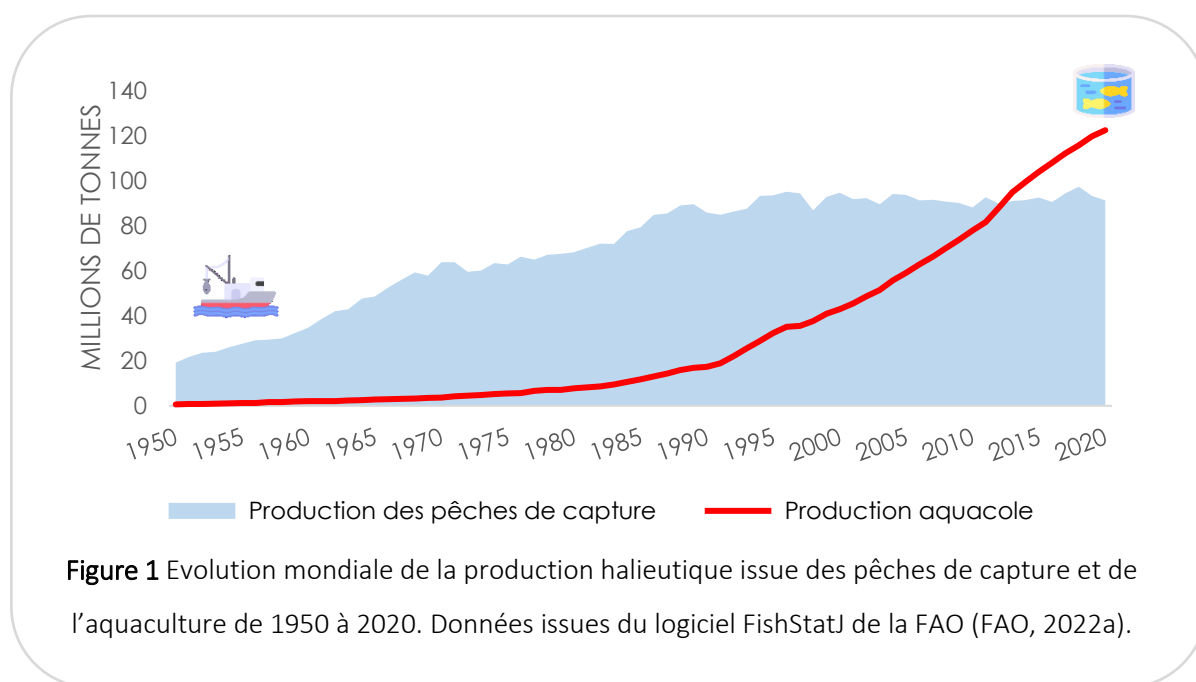
Figure 11 Schéma simplifié des trois voies de la cascade du complément (adapté de Holland and Lambris, 2002).....	63
Figure 12 Schéma de l'organisation cellulaire d'une levure (schéma issu de Jacques et al., 2003).....	84
Figure 13 Etapes de la production industrielle de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et de ses dérivés (adapté de Roques, 2019).....	84
Figure 14 Profils moyens des principaux acides aminés (en g/100g de protéines) de la farine de poisson, de plusieurs coproduits d'animaux terrestres (farines de viande, de sous-produits de volaille et de sang), de la farine de soja et de trois levures entières (<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. utilis</i> , <i>K. marxianus</i>) (Agboola et al., 2021; Cho and Kim, 2011; Øverland and Skrede, 2017; Shurson, 2018).....	89
Figure 15 Représentation schématique de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (adapté de Ribeiro et al., 2022).....	89
Figure 16 Profils moyens des principaux acides aminés (en g/100g de protéines) de levures entières et d'extraits de levure (Vieira et al., 2019).....	90
Figure 17 Schématisation de l'essai de prolifération cellulaire en présence d'extrait de levure (YE) dans un milieu carencé en acides aminés.	102
Figure 18 Distribution du poids moléculaire des peptides retrouvés dans l'extrait de levure Prosaf®.	106
Figure 19 Etapes de la fabrication des aliments expérimentaux.....	106
Figure 20 Expérience de digestibilité des aliments expérimentaux selon la méthode de tamisage automatique continue développée par Choubert et al. (Choubert et al., 1982).	108
Figure 21 Schématisation de l'expérience de croissance de 12 semaines.	111
Figure 22 Schématisation du plan expérimental de la cinétique de court-terme.	113
Figure 23 Etapes de l'étude du transcriptome hépatique et de l'intestin distal via l'analyse par séquençage à haut débit.....	118
Figure 24 Prolifération cellulaire observée en milieux complet (L-15), milieux carencés en acides aminés supplémentés en extrait de levure (HBSS _{CEL-1X} et HBSS _{CEL-0,3X}) et milieu salins (HBSS).....	124
Figure 25 Nombre de peptides bioactifs communs aux répliques techniques de l'analyse peptidomique de l'extrait de levure utilisée dans l'aliment PAP+YE.	167
Figure 26 Résumé des principaux résultats zootechniques et de leurs liens potentiels avec les performances de croissance obtenues à long terme.....	207
Figure 27 Activité de la peroxydase et niveaux d'immunoglobulines M (IgM) dans le plasma sanguin des truites arc-en-ciel à la fin de l'essai de croissance.	211
Figure 28 Diagrammes de Venn résumant les gènes différentiellement exprimés dans le foie (A) et dans l'intestin distal (B) suite au séquençage.....	216
Figure 29 Diagramme de Venn résumant les microARNs différentiellement exprimés dans le foie suite au séquençage.....	216

Figure 30 Résumé schématique des conséquences d'un jeûne court suivi d'une réalimentation. 222

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. L'aquaculture : situation actuelle et importance dans la sécurité alimentaire mondiale

L'aquaculture regroupe l'ensemble des activités humaines visant à cultiver des plantes et à élever des animaux d'origine aquatique à des fins commerciales. Historiquement, l'aquaculture est longtemps restée en retrait face aux activités de pêche. Jusqu'au début des années 1970, la production aquacole représentait moins de 5% du tonnage total soit une part infime du volume halieutique produit mondialement. A la fin du 20^{ème} siècle, l'état critique des populations de certains poissons sauvages a pointé une mauvaise gestion des stocks halieutiques mondiaux. Dès lors, le *Code de conduite pour une pêche responsable* (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 1995) a supporté la mise en place d'une gestion durable des milieux aquatiques dont les bénéfices ont été principalement observés dans les pays Européens et Nord-Américains (Coll et al., 2013). Bien que certains stocks soient encore surexploités, plus de 80 % des volumes débarqués sont aujourd'hui issus de pêcheries durables. Néanmoins, la réduction des pressions anthropiques sur les stocks halieutiques a entraîné un recul du volume des pêches qui a profité au développement de l'aquaculture. En 2013, le secteur aquacole est devenu le principal producteur de denrées aquatiques (poissons, mollusques, crustacés et algues). En 2020, l'aquaculture a produit 122,6 millions de tonnes de denrées aquatiques principalement destinées à la consommation humaines, représentant 57,6 % de la production au niveau mondial (Figure 1, p. 9) (FAO, 2022a).



La disponibilité alimentaire représente la quantité d'un produit brut ou transformé commercialisable et disponible pour la consommation humaine. Au niveau mondial, la disponibilité alimentaire en protéines s'est nettement améliorée depuis les années 1990 (**Figure 2A, p. 12**) grâce à une hausse de la production et de la distribution des denrées alimentaires, et l'augmentation des niveaux de vie des populations à revenus faibles et intermédiaires. En raison de l'augmentation de la population mondiale, la consommation en protéines animales et végétales devrait donc connaître un accroissement de 14% d'ici 2031 principalement dictée par les pays à revenus faibles et intermédiaires telle que la Chine dont la demande en viandes et poissons risque d'augmenter de 41 % et 34 % respectivement, et l'Inde dont la production de produits laitiers devrait augmenter de 41 % d'ici 2031 (**Figure 2B, p. 12**). A l'opposé, les projections de l'OCDE et de la FAO augurent une stagnation de la consommation moyenne de protéines animales pour la période 2023-2031 dans les pays à revenus élevés et à faible croissance démographique. En effet, du fait du changement des habitudes alimentaires, de la pandémie mondiale de coronavirus (COVID-19) et de la guerre russo-ukrainienne, la consommation moyenne de viande, de poisson et d'œufs s'est globalement essoufflée et ne prétendra pas à une hausse annuelle notable lors de la décennie à venir (OCDE and FAO, 2022a).

Pour autant, les produits carnés aquatiques ont été reconnus comme contributeurs majeurs à la sécurité alimentaire mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement. Au-delà de subsister aux besoins financiers de milliard de personnes, les denrées aquatiques constituent une base alimentaire et une source nutritive non négligeables pour de nombreuses populations. En moyenne, les mollusques, crustacés et poissons contiennent des teneurs en protéines, en acides aminés et en acides gras essentiels plus élevées que la plupart des animaux terrestres. De plus, leur chair est pauvre en graisses et présentent des teneurs intéressantes en micronutriments (vitamines et minéraux), leur conférant la caractéristique d'aliment sain et équilibré (**Tableau 1, p. 11**) (Byrd et al., 2021; Tacon and Metian, 2013).

Bien que l'aquaculture semble être en mesure de renforcer la sécurité alimentaire mondiale, la sous-alimentation demeure dans 15 pays où les populations souffrent de malnutrition aigüe (FAO, 2022b). Au cours des prochaines décennies, l'initiative *Transformation bleue* aura pour objectifs de promouvoir des stratégies durables de développement de la production halieutique et aquacole et d'assurer la sécurité alimentaire mondiale afin que le secteur puisse être en mesure de garantir un apport alimentaire suffisant aux populations (FAO, 2022c). En effet, les inquiétudes quant à la durabilité du secteur résident dans l'utilisation de ressources halieutiques sauvages pour la formulation des aliments aquacoles. Aujourd'hui, l'utilisation et la recherche d'ingrédients alternatifs sont primordiales pour l'évolution pérenne de l'aquaculture.

Tableau 1 Composition nutritionnelle moyenne des animaux aquatiques et des animaux terrestres pour l'alimentation humaine (Tacon and Metian, 2013).

Principaux nutriments	Mollusques, crustacés et poissons	Animaux terrestres ¹
Protéines (en mg/g)	17,3	13,8
Acides aminés essentiels		
<i>Méthionine (en % d'AAE²)</i>	6,1	5,7
<i>Lysine (en % d'AAE)</i>	19	19
Acides gras essentiels		
<i>EPA (en mg/100g)</i>	186	5
<i>DHA (en mg/100g)</i>	218	8
Lipides (en mg/g)	2,7	16,6
Vitamines		
<i>Vitamine A (en UI³/100 g)</i>	161,5	21,8
<i>Vitamine C (en mg/100g)</i>	2,1	0,1
<i>Vitamine B12 (en µg/100 g)</i>	6,1	1,1
<i>Acide folique (en µg/100 g)</i>	18,1	6,4
<i>Vitamine E (en mg/100g)</i>	1	0,21
<i>Vitamine D (en UI/100 g)</i>	44,9 ⁴	15,7
<i>Choline (en mg/100g)</i>	69,7	41,1
Minéraux essentiels		
<i>Calcium (en mg/100g)</i>	44,6	13,8
<i>Phosphore (en mg/100g)</i>	214,3	175,6
<i>Magnésium (en mg/100g)</i>	31,5	20,2
<i>Fer (en mg/100g)</i>	1,6	1,35
<i>Potassium (en mg/100g)</i>	278,5	278,2
<i>Sodium (en mg/100g)</i>	241	179,8
<i>Zinc (en mg/100g)</i>	5	3,45
<i>Cuivre (en mg/100g)</i>	0,57	0,07
<i>Manganèse (en mg/100g)</i>	0,22	0,01
<i>Sélénium(en µg/100 g)</i>	39	24,1
Calories (kcal/100 g)	101,3	209

¹ Porc, volaille et bœuf ; ² AAE pour acides aminés essentiels ; ³ UI pour unité internationale ;

⁴ Uniquement dans le poisson.

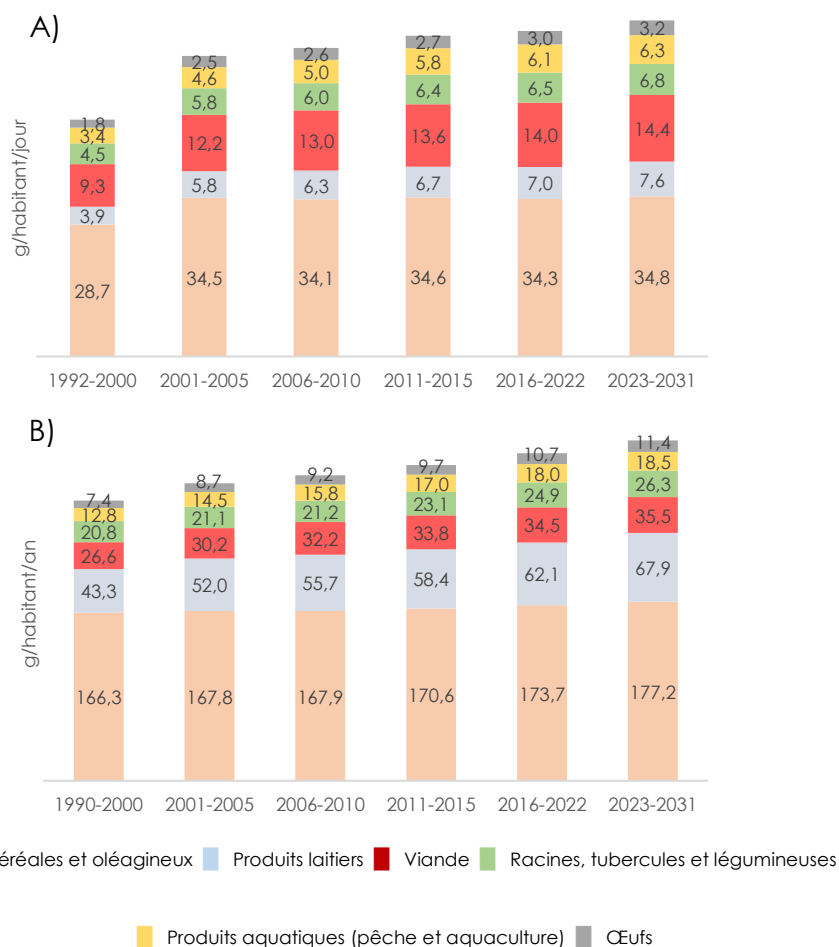


Figure 2 Evolution et perspectives de la disponibilité en protéines (A) et de la consommation (B) des principaux produits alimentaires au niveau mondial. Données issues des Statistiques et perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2022-2031 (OCDE and FAO, 2022b).

2. Une aquaculture durable pour pérenniser le développement du secteur

a. Généralités

Traditionnellement, les aliments aquacoles commerciaux sont composés d'huiles et de farines de poissons provenant de la transformation de coproduits issus d'usines de transformation de poissons ou d'espèces fourragères sauvages telles que les sardines (*Sardina pilchardus*), les maquereaux (*Scomber sp*), les anchois (*Engraulidae sp*), les harengs (*Clupea harengus*), les capelans (*Mallotus*

villosus) et les menhadens (*Brevoortia tyrannus*). Leur incorporation en tant qu'ingrédients dans les aliments aquacoles est alors possible sous forme de farines et d'huiles, respectivement obtenues lors d'un séchage et extraites lors d'un pressage ou d'une centrifugation. En plus d'être hautement digestes, ces ingrédients sont utilisés puisqu'ils couvrent parfaitement les besoins nutritionnels des poissons d'élevage carnivores. En effet, la teneur des farines de poisson en protéines (60 à 72 %), leur composition en acides aminés essentiels (lysine et méthionine) et en minéraux (calcium et phosphore) contribuent à la croissance optimale des poissons d'élevage. Les huiles de poissons sont quant à elles riches en lipides (4 à 20 %) et en acides gras polyinsaturés essentiels oméga 3 (n-3) (acide linoléique, acide docosahexaénoïque et acide eicosapentaénoïque), permettant d'assurer la qualité nutritionnelle de la chair pour la nutrition humaine (Cho and Kim, 2011; FAO, 2022c).

Bien qu'elle ne soit pas la seule industrie à utiliser ces matières premières, l'aquaculture était encore le principal demandeur d'huiles et de farines de poissons en 2020 et devançait largement l'industrie porcine, de volaille, et d'animaux domestiques (86 % des huiles et 73 % des farines de poissons produites étaient utilisés à des fins aquacoles) (FAO, 2022c). Par conséquent, l'aquaculture a été en partie responsable des fortes pressions anthropiques observées sur les stocks halieutiques de ces espèces, entraînant la mise en place urgente de quotas. Actuellement, l'offre en matières premières marines ne peut plus répondre à la demande du secteur aquacole. Par ailleurs, les farines de poisson ont fait face à une hausse des prix considérable en 2011, année pour laquelle le prix de la tonne métrique avait dépassé le millier d'euros (**Figure 3, p. 14**) (Froehlich et al., 2018; Naylor et al., 2000). C'est dans ce contexte que la recherche s'est tournée vers l'utilisation de substituts plus durables. Une des voies de pérennisation de l'aquaculture réside aujourd'hui dans la mise en place de nouvelles formulations d'aliments dans l'optique de remplacer les matières premières marines dans les aliments aquacoles.

b. La substitution des ingrédients marins par des ingrédients alternatifs

Les ingrédients marins ont initialement été substitués par des matières premières d'origine végétale, plus durables et couvrant les besoins nutritionnels des poissons d'élevage. A titre d'exemple, dans les années 1990, les aliments utilisés pour l'élevage de saumon Atlantique étaient composés de 24 % d'huiles et de 65,5 % de protéines d'origine marine. Au cours des décennies suivantes, les matières premières marines ont été substituées graduellement par des matières premières végétales permettant de réduire les teneurs cumulées en huiles et farines de poissons à 22,4 % et d'introduire plus de 60 % de végétaux dans les aliments pour saumon sans impacter la croissance (**Figure 4, p. 17**) (Aas et al.,

2019). Aujourd'hui, les sources de matières premières végétales utilisées en aquaculture sont diverses (céréales, oléagineuses, légumineuses). Une revue bibliographique sur les avantages et inconvénients de l'utilisation des ingrédients végétaux est proposée dans la suite du manuscrit.

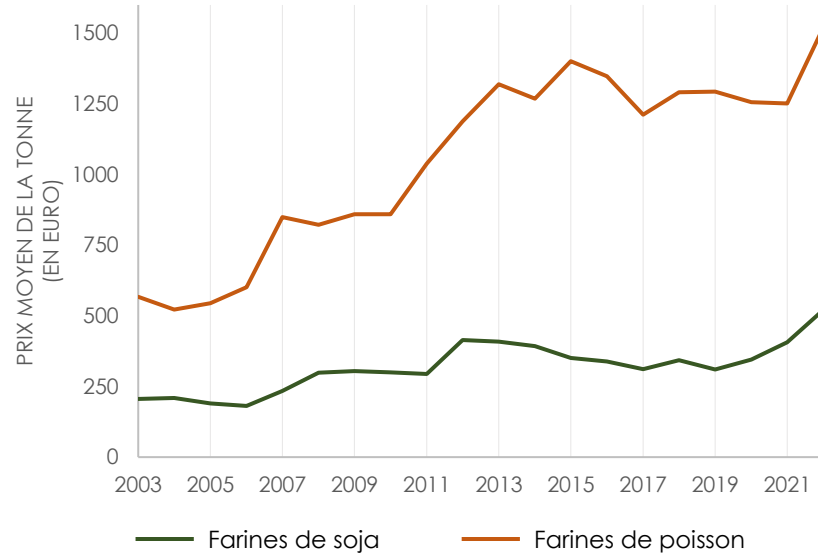


Figure 3 Evolution des prix moyens annuels de la tonne métrique des farines de poissons et des farines de soja de 2003 à 2022. Données issues de la base de données IndexMundi

(<https://www.indexmundi.com/>).

Les protéines animales transformées (farines de plumes, d'os et de sang), issues de coproduits de l'industrie de porc et de volaille, ont quant à elles également été considérées comme des alternatives prometteuses aux farines de poissons. Ces matières premières sont hautement digestibles, appétantes, contiennent des teneurs en protéines équivalentes à celles des farines de poissons et sont moins coûteuses que d'autres matières premières. Elles sont également dépourvues de facteurs antinutritionnels (Bureau et al., 1999; Oliva-Teles et al., 2015). L'utilisation de farines d'insectes, de levures et de microalgues est également apparue comme pertinente de par leur cycle de vie court et leur production constante au fil de l'année. Les farines d'insectes et les levures en tant que macro-ingrédients répondent aux besoins nutritionnels des poissons notamment de par leurs teneurs élevées en protéines (40 à 83 % pour les insectes et 50 à 70% pour les levures) et leurs profils en acides aminés (similaire aux farines de poissons pour les farines d'insectes et proche pour les levures) (Hua et al., 2019; Lapeña et al., 2020). Les microalgues sont quant à elles des alternatives intéressantes aux huiles de

poissons, puisque certaines d'entre elles sont riches en acides gras alpha-linolénique (ALA), eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), qui sont des acides gras essentiels au développement adéquat des poissons (Ansari et al., 2021; Roy and Pal, 2015; Ryckebosch et al., 2014).

c. Les limites à l'utilisation d'ingrédients alternatifs dans les aliments aquacoles

Chez la plupart des espèces carnivores strictes telles que les salmonidés (saumons et truites), moins tolérantes que les espèces omnivores, le remplacement total des matières premières marines par des ingrédients alternatifs reste problématique. En effet, il est bien connu que les régimes sans huiles et farines de poissons entraînent des retards de croissance importants et par conséquent, une perte économique pour les éleveurs. Les causes plausibles et les conséquences des régimes dépourvus de matières premières marines sont bien décrites dans la littérature pour la plupart des espèces d'intérêt aquacole, notamment chez les espèces sensibles tels que les salmonidés. Dans les matières premières végétales, la présence de facteurs antinutritionnels altèrent la prise alimentaire, la digestibilité, l'assimilation des nutriments et certains composants abrasifs sont susceptibles de provoquer une inflammation du tube digestif, affectant par conséquent la croissance et la santé des poissons (Bandara, 2018; Krogdahl et al., 2010; Lazzarotto et al., 2015). L'utilisation de protéines animales dans l'alimentation des animaux d'élevage est encore controversée et soumise à des réglementations strictes depuis les épisodes d'encéphalopathie spongiforme bovine ayant touché l'Europe à la fin du 20^{ème} siècle. Par ailleurs, la substitution partielle ou totale des farines marines par des protéines animales transformées provoquent des effets variables sur la croissance, la digestibilité et l'assimilation des nutriments en fonction des espèces de poissons étudiées. Ces effets sont généralement propres aux seuils de tolérance des espèces mais également liés à la variabilité de la composition et à la qualité de ces matières premières (Galkanda-Arachchige et al., 2020; Kumar et al., 2017; Lu et al., 2015). Le remplacement des ingrédients marins par des farines d'insectes dépend quant à lui de l'espèce d'insecte utilisée et de son stade de développement, puisque la présence de chitine affecte la digestibilité des protéines. De plus, les freins à leur utilisation résident également dans le déséquilibre entre acides gras saturés et polyinsaturés (teneurs élevées en acides gras saturés et faibles en acide gras polyinsaturés), ainsi que dans leur prix élevé et dans l'impact négatif de leur production sur l'environnement (Lock et al., 2018; Quang Tran et al., 2022). L'emploi de levures en tant que macro-ingrédient paraît pertinent dans un contexte de développement durable des aliments aquacoles. L'intérêt de les utiliser réside dans le fait qu'elle n'entre pas en compétition avec l'alimentation humaine et que leur production a un impact environnemental réduit puisque les levures sont majoritairement

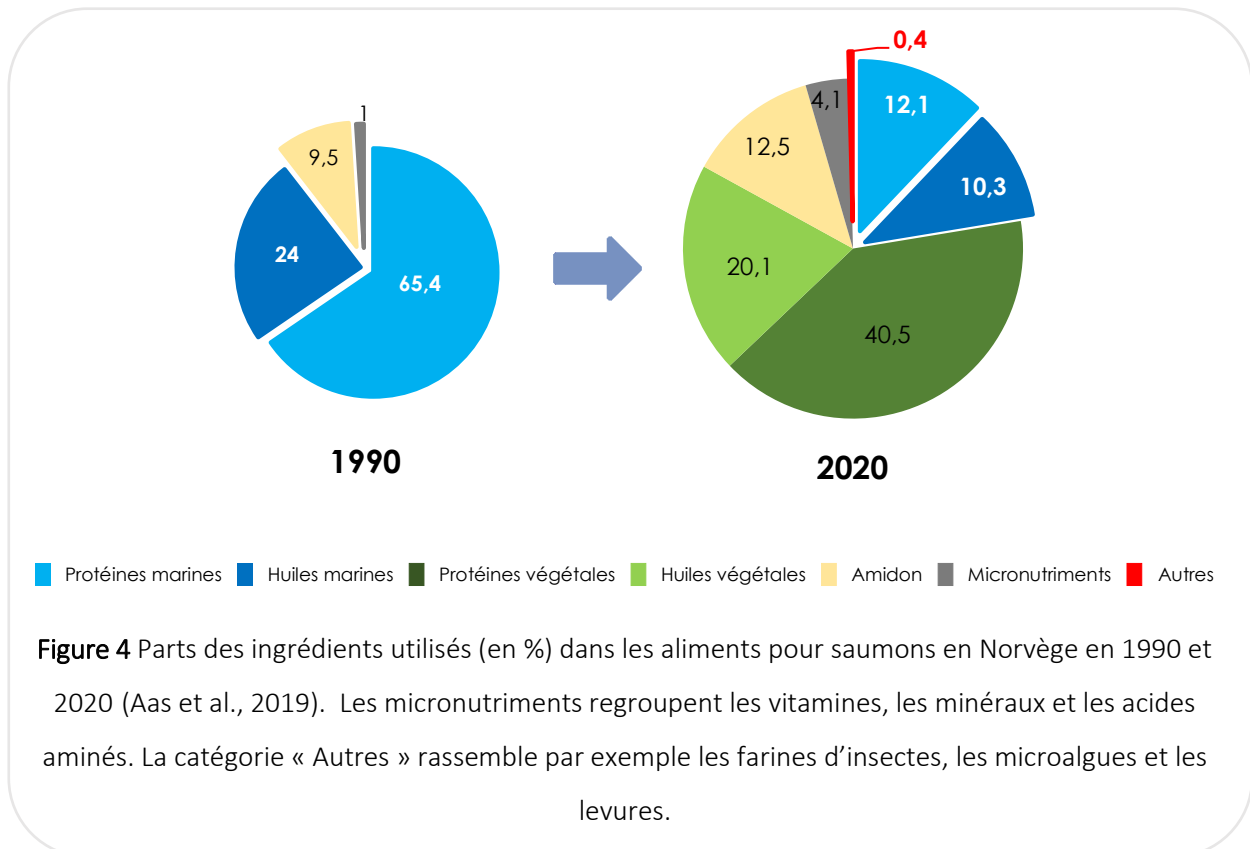
générées lors de la fabrication industrielle de bière ou de bio-carburant (Agboola et al., 2021; Øverland and Skrede, 2017). Par ailleurs, les levures sont utilisées en nutrition animale puisqu'elles présentent des propriétés nutritionnelles et immunostimulantes intéressantes (Vohra et al., 2016). Concernant les microalgues, leur incorporation en tant que macro-ingrédient est encore peu répandue bien que leurs teneurs en EPA et DHA permettent d'assurer les besoins en acides gras essentiels de poissons d'élevage. Au même titre que les insectes, les microalgues sont onéreuses et leur application en aquaculture se résume principalement à une utilisation en tant que micronutriment (Shah et al., 2018).

d. Les stratégies nutritionnelles pour améliorer les régimes à base de nouveaux ingrédients

L'utilisation d'additifs alimentaires est apparue pertinente pour contrer les effets délétères des régimes à base de nouveaux ingrédients et améliorer leur efficacité. Au-delà de faciliter la digestibilité des aliments et l'assimilation des nutriments, les additifs peuvent également améliorer la santé des organismes et réduire les stress liés à l'élevage. Divers additifs sont utilisés en nutrition animale et peuvent être classés dans deux grandes catégories. La première regroupe les additifs alimentaires qui améliorent la qualité de l'aliment. On y retrouve, par exemple, des conservateurs tels que les antioxydants qui ralentissent ou empêchent l'oxydation, les protéases ou les amylases qui augmentent la disponibilité des nutriments et les phytases qui agissent sur l'activité de certains facteurs antinutritionnels. La seconde catégorie réunit les additifs fonctionnels. Leur inclusion dans les aliments aquacoles réside principalement dans leur capacité à améliorer les performances de croissance et à renforcer la santé des animaux. A titre non exhaustif, on y retrouve par exemple les probiotiques, les prébiotiques, les immunostimulants, les composés phyto-géniques et les acides organiques (Dawood et al., 2018; Encarnação, 2016). Au sein de cette catégorie, on retrouve par exemple la levure qui n'est pas uniquement utilisée en tant que macro-ingrédient en nutrition animale mais également en tant qu'additif fonctionnel. Lorsqu'elles ne sont pas utilisées comme macro-ingrédient, les levures peuvent être incluses entières et vivantes dans les aliments en tant que probiotique, ou en supplémentation sous forme de dérivés (parois, extraits, composants levuriens purifiés). Leurs applications et bénéfices sont vastes et sont décrits dans la littérature pour la plupart des animaux d'élevage terrestres mais également chez les organismes aquatiques. De manière générale, leurs propriétés nutritionnelles et leurs composants immunostimulants améliorent la croissance et la santé des organismes qui les ingèrent. Ces caractéristiques pourraient ainsi permettre de mitiger les conséquences néfastes des

régimes dépourvus de farines et d'huiles de poissons (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Mahdy et al., 2022; Patterson et al., 2023).

Etant inhérents au sujet de thèse, une revue bibliographique plus étoffée sur l'utilisation et les effets des ingrédients végétaux et des protéines animales transformées est proposée dans la suite du manuscrit. D'autre part, le manuscrit se focalisera plus particulièrement sur les bénéfices d'une inclusion de levure en tant qu'additif fonctionnel dans les aliments aquacoles sans farines de poissons.



3. La truite arc-en-ciel, un modèle d'étude à haute valeur économique

La truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* est un poisson téléostéen originaire d'Amérique du Nord. Elle fait partie des premières espèces d'eau douce à avoir été introduite et élevée en Europe. Au 15^{ème} siècle, les essais fructueux d'insémination artificielle ont participé au développement de l'élevage de cette espèce, qui a initialement débuté dans le but de repeupler les populations de truites sauvages en déclin. Au milieu du 20^{ème} siècle, la modernisation de l'aquaculture et l'utilisation d'aliments granulés ont encouragé la production de cette espèce à des fins de consommation humaine (Tidwell, 2012).

Le succès de la production de truite arc-en-ciel réside principalement dans la maîtrise de son cycle de vie et de son alimentation. Premièrement, la reproduction de la truite peut être contrôlée au travers de la modulation de la photopériode, permettant une production d'alevins tout au long de l'année. Contrairement à d'autres espèces dont les œufs sont plus petits, les alevins sont également aptes à se nourrir avec un aliment artificiel dès la résorption de leur sac vitellin. Ainsi, la maîtrise des apports nutritifs dès le premier repas permet de contribuer au bon développement des futurs juvéniles. La conversion efficace de l'aliment en chair chez cette espèce (indice de conversion de l'aliment de 0,9 à 1,3) permet ensuite aux truites d'atteindre le stade portion commercialisable (250 grammes en France) en quelques mois (Craig and Helfrich, 2002). De plus, bien qu'elles préfèrent les eaux fraîches et bien oxygénées, les truites sont tolérantes à une gamme de températures importante (0 à 28°C) ce qui facilite leur élevage dans la plupart des régions soumises à un climat continental (Fornshell, 2002). L'alimentation des truites arc-en-ciel est également bien maîtrisée et permet de répondre à leurs besoins nutritionnels. Initialement, l'alimentation des poissons d'élevage ne consistait pas à leur fournir un aliment exogène mais reposait sur une alimentation naturelle (insectes et algues présents dans les bassins). Néanmoins, ce type d'alimentation ne permettait pas d'assurer une production élevée et par conséquent, de répondre à la demande croissante en produits aquatiques. En 1950, l'arrivée des premiers aliments artificiels pour animaux aquatiques a permis d'intégrer le secteur dans une économie de production (Le Gouvello, 2017).

En 2020, la truite arc-en-ciel figurait parmi les quinze principales espèces produites en milieu continental, marins et côtiers dans le monde, précédée entre autres par la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idellus*) et le saumon Atlantique (*Salmo salar*) (FAO, 2022c). Cette même année, la production mondiale aquacole de truite arc-en-ciel s'élevait à 959 690 tonnes soit 3,82 % de la production aquacole totale. D'autre part, la France figurait parmi les dix plus gros producteurs et se plaçait en 8^{ème} position. En effet, la truite arc-en-ciel est la première espèce de poisson produite dans l'hexagone (36 700 tonnes) suivie de loin par le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) et la dorade royale (*Sparus aurata*), dont les productions s'élevaient respectivement à 2 380 et 2 000 tonnes en 2020 (FAO, 2022a) (**Figure 5, p. 19**).

L'importance d'étudier la truite arc-en-ciel en nutrition aquacole découle de sa robustesse face à l'élevage et de sa position en tant qu'espèce à haute valeur économique. L'évolution des aliments vers des alternatives plus durables a soulevé des limites à l'utilisation de nouveaux ingrédients en particulier chez les saumons qui font partie des espèces les plus consommées dans le monde. Ainsi, l'utilisation de la truite arc-en-ciel en tant qu'animal modèle en nutrition est évidente puisque les effets observés peuvent être transposables à d'autres espèces carnivores telles que le saumon dont la truite est proche phylogénétiquement (Polakof and Moon, 2013).

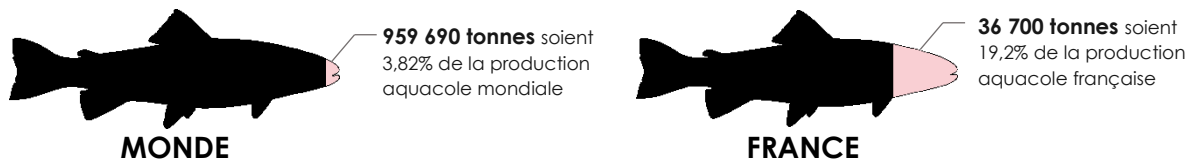


Figure 5 Production aquacole de truite arc-en-ciel dans le monde et en France en 2020 (FAO, 2022a). Les pourcentages représentent les quantités de truite arc-en-ciel produites rapportées aux volumes totaux produits dans le monde et en France, respectivement.

4. Notions de nutrition en aquaculture et importance de produire un aliment efficient

a. Généralités

Bien que certaines espèces élevées en étang soient capables de se nourrir principalement de la production intrinsèque des bassins (insectes, algues, phytoplancton, déchets organiques), l'alimentation naturelle chez les espèces de plus hauts niveaux trophiques ne permettait plus de contenir la demande croissante en produits aquatiques au fil du temps. Depuis le 20^{ème} siècle, le développement de l'aquaculture et l'intensification des systèmes d'élevage ont impliqué la mise en place d'une alimentation artificielle sous forme de granulés. L'alimentation artificielle a permis de contrôler les apports nutritionnels des poissons et de veiller à la couverture des besoins spécifiques. Aujourd'hui, le succès d'un aliment aquacole réside dans sa multi-performance, à savoir l'obtention de performances de production satisfaisantes (croissance, reproduction, rendements), la rentabilité économique, la capacité à prévenir des pathologies nutritionnelles ou des maladies, ou encore à faire face à des fluctuations de son environnement. Afin de mieux comprendre les performances d'un aliment aquacole équilibré, il est fondamental de s'intéresser aux besoins nutritionnels des espèces (Prabu et al., 2017). En effet, les exigences nutritionnelles des poissons d'élevage ont été largement investiguées à travers l'étude de leurs habitudes alimentaires naturelles, de modèles statistiques ou encore, à l'aide d'essais expérimentaux. Ces différentes approches ont permis de formuler des aliments répondant aux besoins des organismes mais également aux attentes économiques du secteur (Hardy, 2021; NRC, 2011).

b. Besoins énergétiques

Tout organisme vivant se nourrit pour produire de l'énergie et assurer ses fonctions métaboliques *via* l'hydrolyse des nutriments lors de la digestion. Les différents composants issus de la digestion sont alors absorbés par les cellules, utilisés métaboliquement ou excrétés. Le flux énergétique des animaux repose sur des bases de bioénergétique et est initié par l'ingestion d'une énergie brute apportée par l'alimentation. Les nutriments dits non digestibles et non métabolisables sont respectivement excrétés sous forme fécale ou par voies branchiale et urinaire. L'énergie métabolisable est quant à elle utilisée pour la motricité, la croissance, la reproduction et le maintien du métabolisme basal ou stockée dans les tissus. L'énergie en excès est excrétée sous forme de chaleur (Hardy, 2021). La truite arc-en-ciel est un poisson carnivore de haut niveau trophique. Son régime alimentaire est dit opportuniste puisqu'il s'agit d'une espèce prédatrice, et repose principalement sur des besoins élevés en protéines et en lipides. A l'inverse des espèces herbivores et omnivores, la truite est considérée comme une très mauvaise utilisatrice de glucides. Chez cette espèce, les teneurs en glucides digestibles de l'aliment ne dépassent généralement pas 20 % de l'aliment, sous peine d'altérer la croissance (Hilton and Atkinson, 1982; Stone, 2003; Wilson, 1994). Ses besoins énergétiques et nutritionnels sont couverts par son alimentation ou par ses réserves en période de privation alimentaire (migration et reproduction, jeûne imposé en élevage lors d'épizooties) et varient en fonction du stade de vie de l'animal. L'énergie digestible nécessaire à une croissance optimale a été estimée à 4 200 kcal par kilogramme d'aliment chez la truite arc-en-ciel (NRC, 2011) (**Tableau 2, p. 23**).

c. Besoins protéiques

Les protéines sont impliquées dans de nombreuses et diverses fonctions physiologiques (structure tissulaire, motricité, transports cellulaires, cycle cellulaire, immunité, activités enzymatiques...) ainsi que dans la croissance. La digestion entraîne le fractionnement des protéines en peptides et en acides aminés qui seront utilisés pour la synthèse des protéines corporelles, utilisés pour la synthèse de nouvelles molécules (glucose, glycogène, acides gras) ou dégradés pour produire de l'énergie. Chez la truite d'élevage, en fonction de son stade de développement ou de son statut physiologique, l'aliment doit être composé de 30 à 50 % de protéines brutes afin de couvrir ses besoins protéiques qui s'élèvent à 13,13 g/kg de poisson/jour (**Tableau 2, p. 23**). Ces besoins protéiques sont nettement supérieurs à ceux d'une espèce herbivore comme la carpe commune (8,74 g/kg de poisson/jour). Il est important de noter que ce besoin protéique est plutôt associé à un besoin en acides

aminés essentiels dont les teneurs doivent être équilibrées pour assurer les fonctions physiologiques et éviter une excrétion importante d'azote (Hardy, 2021; Kaushik and Seiliez, 2010; NRC, 2011).

d. Besoins lipidiques

Les lipides sont les constituants majeurs des membranes biologiques. Accumulés sous forme de réserves dans les tissus adipeux, ils se retrouvent également en abondance dans le cerveau et le système nerveux en général. Au-delà d'avoir des fonctions structurelles, les lipides sont également impliqués dans une multitude de fonctions physiologiques. Ils sont essentiels à la croissance, à la reproduction et à la santé des organismes vivants. Les lipides sont également préférentiellement utilisés par les organismes pour produire de l'énergie. La fraction lipidique des aliments destinés à la truite ne dépasse généralement pas les 10 à 18 %. Les besoins lipidiques des poissons sont principalement liés à leurs besoins en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3, tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, oméga 3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, oméga 3) qui sont particulièrement abondants en milieux marins. Ces acides gras sont également retrouvés en eaux douces, mais restent néanmoins moins présents dans ces écosystèmes. Par conséquent, les poissons d'eau douce tels que la truite ont développé la capacité de synthétiser ces acides gras à longue chaîne à partir de précurseurs que sont l'acide gras alpha-linolénique (ALA) pour les acides gras de la série n-3 (oméga 3), et l'acide alpha-linoléique (AL) pour les acides gras de la série n-6 (oméga 6). Dans l'alimentation de la truite d'élevage, il est donc recommandé de couvrir ses besoins en ALA et en AGPI-LC à hauteurs de 0,7 à 1,0 % et de 0,4 à 0,5 %, respectivement (Hardy, 2021; NRC, 2011; Oliva-Teles et al., 2015) (**Tableau 2, p. 23**).

e. Besoins vitaminiques et minéraux

D'autres nutriments doivent également être apportés par l'alimentation mais sont requis en plus faibles quantités. C'est notamment le cas des minéraux ou des vitamines dont l'absence ou la déficience peuvent par exemple induire des retards de croissance, une réduction de la prise alimentaire, des malformations, une dérégulation des fonctions antioxydantes, ou encore entraîner des anémies et des cataractes. Afin de s'affranchir des potentiels effets d'une déficience en micronutriments, les aliments aquacoles sont généralement supplémentés avec un mélange de minéraux et de vitamines à hauteurs de 1 % chacun (Hardy, 2021; NRC, 2011) (**Tableau 2, p. 23**).

f. Risques associés à la formulation de nouveaux ingrédients aquacoles

Les aliments commerciaux à base d'ingrédients marins (farines et huiles de poissons) couvrent parfaitement les besoins nutritionnels de la truite arc-en-ciel de par leurs teneurs en protéines et de leurs profils en acides aminés essentiels et en AGPI-LC. Ces profils garantissent une croissance, une reproduction et une santé optimales qui sont des paramètres primordiaux dans un contexte d'élevage. Comme toutes filières de production, l'intérêt principal du secteur aquacole est d'assurer sa croissance tout en étant rentable. Aujourd'hui, le développement du secteur est néanmoins freiné par son impact environnemental et est contraint de se tourner vers d'autres pratiques d'élevage moins efficaces, notamment par le biais de la substitution des farines et huiles de poissons dans les aliments aquacoles. D'après Glenncross et al., la recherche d'aliments alternatifs repose sur sept grandes étapes : (1) la caractérisation nutritionnelle des nouvelles matières premières, (2) l'appétence de l'aliment, (3) la digestibilité des nouvelles matières premières et de l'aliment, (4) l'utilisation des nutriments et de l'énergie, (5) l'impact des nouveaux aliments sur la santé et la robustesse des poissons, (6) la rhéologie de l'aliment et les effets de la transformation des matières premières (7) et enfin, la perception sensorielle du consommateur à travers l'évaluation de la qualité de la chair (Glenncross, 2020). En ce sens, une revue du même auteur suggère également d'identifier les risques associés aux nouvelles pratiques nutritionnelles. Parmi ces risques figurent l'approvisionnement en nouvelles matières premières, leurs coûts, la variabilité de leur profil nutritionnel, la présence de contaminants (métaux, toxines, bactéries et virus) ou de facteurs antinutritionnels, la transmission de maladies aux Hommes (encéphalopathie spongiformes bovines, parasites) et la qualité du produit final (Glenncross et al., 2020a).

Tableau 2 Besoins nutritionnels minimum de la truite arc-en-ciel permettant d'assurer des performances optimales (Hardy, 2021; Lall and Kaushik, 2021; NRC, 2011; Oliva-Teles et al., 2015).

Nutriments	Besoins
Protéines (en g/kg de poisson/jour)	13,13
Acides aminés (en %)	
<i>Arginine</i>	1,3-2,8
<i>Histidine</i>	0,6-1
<i>Isoleucine</i>	0,8-1,4
<i>Leucine</i>	1,4-3,4
<i>Lysine</i>	1,3-2,9
<i>Méthionine</i>	0,2-1,0
<i>Méthionine + Cystéine</i>	1,1
<i>Phénylalanine</i>	0,7-1,6
<i>Phénylalanine + tyrosine</i>	1,8
<i>Thréonine</i>	0,7-1,4
<i>Tryptophane</i>	0,2-0,3
<i>Valine</i>	1-1,8
Acides gras essentiels (en %)	
<i>ALA (18:3n-3)</i> ¹	0,7-1,0
<i>AGPI-LC n-3</i> ²	0,4-0,5
<i>AL (18:2n-6)</i> ³	1,0
Minéraux (en %)	
<i>Phosphore</i>	0,24-0,8
<i>Magnésium</i>	0,033-0,06
<i>Calcium</i>	0,34-0,80
<i>Manganèse</i>	12-13
<i>Cuivre</i>	3
<i>Zinc</i>	15-30
<i>Fer</i>	3
<i>Sélénium</i>	0,15-0,38
<i>Iode</i>	1,1

¹ Acide alpha-linolénique

² Acides gras polyinsaturés à longue chaîne, oméga 3

³ Acide alpha-linolénique

Nutriments	Besoins
Vitamines	
<i>A (en mg/kg)</i>	0,75
<i>D (en µg/kg)</i>	40
<i>E (en mg/kg)</i>	50
<i>K (en mg/kg)</i>	R ⁴
<i>B6 (en mg/kg)</i>	3
<i>B12 (en mg/kg)</i>	R
<i>C (en mg/kg)</i>	20
<i>Thiamine (en mg/kg)</i>	1
<i>Riboflavine (en mg/kg)</i>	4
<i>B5 (en mg/kg)</i>	20
<i>Niacine (en mg/kg)</i>	10
<i>Biotine (en mg/kg)</i>	0,15
<i>Acide folique (en mg/kg)</i>	1

⁴ Requis mais non déterminé

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1

Vers une aquaculture plus durable : l'utilisation de matières premières alternatives aux farines de poisson chez les espèces carnivores

En 2018, 14 millions de tonnes des pêches de capture étaient destinées à la production de farines et d'huiles de poissons. Sur la production totale d'ingrédients d'origine marine, 70,2 % des farines de poissons et 51 % de l'huile de poissons provenaient des activités de pêche. Le reste était issu de la transformation de coproduits de différentes espèces aquacoles tel que le thon, le tilapia, le panga, le saumon ou encore le krill (IFFO, 2022). Chez les espèces carnivores (salmonidés, poissons marins), les aliments à base d'ingrédients marins permettent d'obtenir des performances optimales de croissance et de reproduction, de maintenir les poissons en bonne santé ainsi que de fournir des produits nutritionnellement qualitatifs pour l'alimentation humaine. L'utilisation historique des farines de poissons et la difficulté de les substituer dans la formulation des aliments aquacoles résident dans le profil nutritionnel idéal de ces ingrédients marins, notamment en termes de teneurs en protéines (70 à 75 % de la matière sèche), en lipides (11 % de la matière sèche), en acides aminés (lysine et méthionine), en acides gras oméga-3 essentiels (EPA, acide eicosapentaénoïque et DHA, acide gras docosahexaénoïque), en minéraux (calcium, phosphore, iode et sélénium) et en vitamines (choline, biotine, B12, A, D et E). Néanmoins, les farines de poissons sont aujourd'hui très coûteuses (1 520 € la tonne en 2022) et ne répondent plus aux critères de durabilité environnementale et économique auxquels doit répondre le secteur aquacole (Cho and Kim, 2011; Gibson T. Gaylord et al., 2010; Napier et al., 2020).

Dans un contexte de *Transformation bleue* et de développement durable de l'industrie aquacole, les candidats au remplacement des farines de poisson sont nombreux et répondent généralement aux critères de rentabilité économique, de disponibilité de la matière première et possèdent des profils nutritionnels potentiellement intéressants. Néanmoins, malgré une évolution considérable des formulations et l'incorporation conséquente de matières premières végétales dans les aliments pour poissons carnivores (Aas et al., 2019; FAO, 2022c), des progrès doivent encore être réalisés afin d'améliorer l'utilisation des ingrédients alternatifs par les poissons d'élevage carnivores et de pouvoir s'affranchir totalement de l'utilisation de la farine et de l'huile de poissons. De plus, les aliments représentent la principale source de dépense du secteur aquacole en raison notamment du

coût élevé des sources protéiques. L'enjeu réside donc également dans l'identification de substituts moins coûteux pour assurer la pérennité économique du secteur.

Dans cette partie, nous aborderons l'utilisation de macro-ingrédients alternatifs en remplacement des farines de poissons. Plus précisément, nous examinerons l'utilisation de matières premières végétales et de protéines animales transformées issues de coproduits industriels, qui est au cœur du projet de thèse. Nous discuterons les avantages et les limites de leur utilisation.

1. Les matières premières végétales

a. Généralités et profil nutritionnel des principaux ingrédients végétaux utilisés dans la formulation des aliments aquacoles

Les principales catégories de végétaux utilisées dans la formulation des aliments aquacoles sont les céréales (blé, maïs et orge), les oléagineux (soja, tournesol, colza et coton) et les légumineuses (lupin et féverole) issus de plantations dédiées à l'alimentation animale ou de la transformation de matières premières végétales (production de biofuel et de bioéthanol). De manière générale, l'ensemble des farines végétales présentent des teneurs en protéines inférieures à celles retrouvées dans les farines de poissons et ne peuvent donc pas être utilisées en tant que source protéique unique (**Tableau 3, p. 30**). De plus, les déséquilibres prononcés en acides aminés essentiels (lysine et méthionine) et acides gras essentiels (EPA et DHA) sont caractéristiques de ces ingrédients végétaux (**Tableau 4, p. 31**) (Bandara, 2018; Gatlin III et al., 2007). Par ailleurs, la présence de glucides non digestibles dans ces matières premières freine considérablement leur inclusion dans les aliments destinés aux salmonidés. En effet, ces poissons ont une capacité réduite à les digérer et à les assimiler par rapport aux espèces omnivores et herbivores (Stone, 2003). Bien que les propriétés nutritionnelles des matières premières végétales soient moins intéressantes que celles des farines de poissons, leur incorporation dans les aliments aquacoles restent néanmoins possibles au-delà de certains seuils d'inclusion (maximum 60 % d'ingrédients végétaux chez le saumon Atlantique) et l'association de plusieurs matières premières végétales permet de couvrir les besoins nutritionnels des poissons carnivores (Aas et al., 2022; NRC, 2011). Leur inclusion se fait sous forme de farines (broyage de graines entières), de tourteaux (résidus de graines issus de l'extraction d'huile) et de concentrés protéiques ou protéines quasi pures (gluten de blé et gluten de maïs).

Les **farines de céréales** se distinguent par une teneur en protéines faible qui ne dépasse généralement pas les 13 %. En revanche, elles présentent une proportion élevée d'amidon, représentant environ 60 % de la matière sèche (**Tableau 3, p. 30**). Cette composition en fait une matière première intéressante pour les poissons herbivores, qui à la différence des espèces carnivores, peuvent utiliser efficacement cette source énergétique. Chez les espèces carnivores, la présence d'amidon dans l'aliment permet principalement d'extruder les granulés qui absorberont l'huile lors de l'enrobage. Parmi les céréales, le **blé tendre** (*Triticum aestivum*) est souvent utilisé en nutrition animale en raison de son faible coût. Les teneurs protéiques et lipidiques du blé (respectivement, 12,3 % et 1,7 à 2 % de la matière sèche) sont néanmoins bien inférieures à celles des farines de poissons (autour de 73 % de la matière sèche pour les protéines et 11 % pour les lipides) (**Tableau 3, p. 30**) et présentent un

déséquilibre prononcé en lysine (**Tableau 4, p. 31**). Le **gluten de blé**, coproduit de l'amidonnerie, représente une matière première intéressante car très riche en protéines (29,5 à 78,2% de la matière sèche) et est faiblement concentrée en fibres (< 10 % de la matière sèche) (**Tableau 3, p. 30**). Les **farines de maïs** (*Zea mays*) sont quant à elles rarement incluses en l'état dans les aliments aquacoles car elles sont pauvres en protéines (9,0 % de la matière sèche) (**Tableau 3, p. 30**). En revanche, le **gluten de maïs**, dérivé de la farine de maïs, se distingue par ses qualités nutritionnelles, notamment sa très bonne digestibilité et sa teneur en protéines élevée (21,4 à 67,7 % de la matière sèche) (**Tableau 3, p. 30**) (Gatlin III et al., 2007).

Les **graines oléagineuses** issues du soja (*Glycine max*), du tournesol (*Helianthus annuus*), du colza (*Brassica rapa*) et du coton (*Gossypium hirsute*) sont majoritairement transformées pour en extraire l'huile. Les huiles sont obtenues par trituration, procédé au cours duquel les graines sont broyées et pressées, laissant alors un coproduit communément appelé tourteau. Ces tourteaux contiennent d'intéressantes teneurs en protéines bien qu'inférieures à celles des farines de poissons (**Tableau 3, p. 30**). Les **tourteaux, les graines entières et les coproduits** (concentrés protéiques, protéines isolées) **du soja** sont les ingrédients oléagineux les plus couramment inclus dans les aliments aquacoles. Leurs teneurs en protéines (40 à 54 % de la matière sèche dans les farines de soja, 48 à 55,2 % de la matière sèche dans les tourteaux, 62,6 % de la matière sèche dans les concentrés protéiques de soja) ainsi que leur profil en acides aminés se rapprochent de ceux des farines de poissons mais restent tout de même inférieures. Les farines de soja sont également déséquilibrées en acides gras essentiels et inadéquates pour couvrir les besoins des poissons d'élevage. Néanmoins, l'inclusion additionnelle de concentré protéique de soja, plus riche en acides aminés (**Tableau 3, p. 30**), permet de rehausser les teneurs en acides aminés des aliments. Les teneurs élevées en fibres (**Tableau 3, p. 30**) ainsi qu'une disponibilité variable en calcium, phosphore et sodium dans les farines et produits de soja sont en revanche problématiques.

Les farines de **graines de tournesol** sont intéressantes pour leur richesse en lipides (48 % de la matière sèche) mais leurs teneurs élevées en fibres (17 % de la matière sèche) rendent cette matière première peu digestible pour les poissons (**Tableau 3, p. 30**). Les **farines et tourteaux** (résidus de l'extraction d'huile) **de graines de colza** peuvent également être utilisés en alimentation aquacole. Mais au même titre que le soja, le colza présente un déséquilibre prononcé en acides aminés essentiels (isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine) (**Tableau 4, p. 31**) et une absence d'EPA et de DHA (comme dans toutes les plantes non génétiquement modifiées) qui sont problématiques pour la formulation d'un aliment aquacole efficient. Les **farines et tourteaux de coton** possèdent quant à elles des caractéristiques intéressantes notamment en ce qui concerne les teneurs en protéines (40 % de la matière sèche) mais leur inclusion dans les aliments aquacoles reste à ce jour trop coûteuse (**Tableau 3,**

p. 30) (Burel and Kaushik, 2008; Chakraborty et al., 2019; Gatlin III et al., 2007; Jannathulla et al., 2019; Pavan Kumar et al., 2014; Sanz et al., 1994).

Les légumineuses telles que le **lupin** (*Lupinus sp*) sont intéressantes d'un point de vue lipidique avec des valeurs se rapprochant de celles trouvées dans les farines de poissons (6,8 à 8,0 % de la matière sèche en fonction du produit contre 11 % de la matière sèche dans les farines de poissons) (**Tableau 3, p. 30**). Les **féveroles** (*Vicia faba*) sont des plantes à fèves utilisées en nutrition animale et couramment incluses dans les aliments pour poisson. Les farines, tourteaux et concentrés protéique de féveroles sont jusqu'à deux fois plus riches en protéines que les céréales (27,4 à 66,3 % de la matière sèche) (**Tableau 3, p. 30**). Ce sont aussi des sources importantes d'amidon (36,4 % de la matière sèche dans les farines de féverole), de minéraux, de vitamines (folate) et de composants bioactifs phénoliques et flavonoïques ayant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. Néanmoins, leurs teneurs élevées en glucides (51 à 68 % de la matière sèche), en fibres (8,2 à 30 % de la matière sèche) et l'indisponibilité du phosphore piégé dans les phytates peuvent limiter leurs incorporations dans les aliments aquacoles (**Tableau 3, p. 30**). Les farines et concentrés protéiques de **pois** (*Pisum sp*) possèdent des caractéristiques nutritionnelles proches de la farine de lupin mais sont moins concentrés en lipides (< 7 % de la matière sèche) (**Tableau 3, p. 30**) (Dhull et al., 2021; Gatlin III et al., 2007; Martineau-Côté et al., 2022).

Au-delà de ne pas répondre parfaitement aux besoins nutritionnels des poissons carnivores, les matières premières végétales abondent en facteurs antinutritionnels qui affectent la digestibilité, l'assimilation des nutriments et la santé des poissons carnivores. Cette caractéristique, propre aux végétaux, freine considérablement leur inclusion dans les aliments aquacoles.

Tableau 3 Compositions proximales moyennes des farines de poisson et des principaux ingrédients végétaux inclus dans les aliments aquacoles (Alfred, 2020; Gatlin III et al., 2007; IAFFD, 2022; Kaiser et al., 2022; Martineau-Côté et al., 2022; Mattila et al., 2018; Oliva-Teles et al., 2015; Pavan Kumar et al., 2014).

	Matières premières	Matière sèche (%)	Protéines (% MS)	Lipides (% MS)	Cendres (% MS)	Fibres (% MS)	Amidon (%MS)
	Farines de poisson ¹	92	73	11	14	<1	0
Céréales	Farine de graines de maïs	86,7	9,0	3,9	1,4	2,5	60,1
	Gluten de maïs	90,5	21,4 - 67,7	1,6 - 9,5	1,5	1,2-9	4,2 - 17,6
	Farine de blé entier	88,3	12,3	1,7-2	1,6	2,6-4,2	57,7
	Gluten de blé	89,7	29,5 - 78,2	2,4 - 9,7	0,7 - 4	2,4 - 9,7	1,5 - 11,2
	Farine de graines de colza	92	20-38	44,9	4,2	5,2 - 10	1,8
Oléagineux	Tourteau de colza	89	38,1	1,8	7,1	11	5,7
	Farine de graines de coton	91,5	20,7 - 45	18,2	3,5 - 6,4	6,4 - 22	3,5
	Tourteau de coton	90,1	40	2,6	2,5	43,5	2,5
	Farine de graines de soja	89	40 - 54	21	5,7	6,2	6,4
	Tourteau de soja	88	48 - 55,2	1,4	6,2	4	6,4
	Concentré protéique de soja	92	62,6	1,0	6,0	3,7	1,0
	Farine de graines de tournesol	93	16	48	3,4	17	1,3
	Tourteau de tournesol	90	35,1	2,0	7,7	22,8	1,9
	Farine de lupin	90,3	36,7	8	3,5	5 - 16	10,1
Légumineux	Concentré protéique de lupin	94	39,4	6,8	4	0	7,0
	Farine de pois	90,3	16,2 - 24	1,7	3,3	5,5	40
	Concentré protéique de pois	90,2	54,4	1,7	7,3	0	13,9
	Farine de féverole	90	27,4	1,4	3,4 - 6	8,2-30	36,4
	Tourteau de féverole	88,7	30	1,6	3,0	1,7	3,7
	Concentré protéique de féverole	88	66,3	4,7	2,6	4,1	2,0

¹ Hareng, menhaden, anchois, capelan, foie de morue

Tableau 4 Compositions moyennes en acides aminés de la farine de poissons et des principales farines végétales incluses dans les aliments aquacoles (Kaiser et al., 2022; Oliva-Teles et al., 2015).

% de protéines	Poisson	Maïs	Blé	Graines de colza	Graines de coton	Soja	Graines de tournesol	Lupin	Pois	Féverole
ARG	5,8	4,5	4,7	6,2	11,1	7,2	7,2	10	8,4	9,0
HIS	2,2	2,8	2,3	2,9	2,9	2,6	1,8	2,3	2,5	2,6
ILE	4,3	3,5	3,4	4,3	3,2	4,5	3,9	4,7	4,2	4,1
LEU	7,0	12	6,5	7,3	5,9	7,5	5,9	7,4	7,1	7,1
LYS	7,5	3,1	2,9	6,3	4,2	6,2	4,1	5,0	7,2	6,3
MET	2,8	2,1	1,6	2,0	1,4	1,4	2,3	0,9	1,0	0,8
CYS	0,8	2,3	2,2	2,5	1,6	1,5	1,8	1,8	1,4	1,2
PHE	3,8	4,8	4,5	4,3	5,1	5,0	4,3	3,9	4,7	4,0
THR	4,1	3,6	2,9	4,8	3,3	3,9	3,8	3,9	3,8	3,5
TRY	1,1	0,7	1,2	1,3	1,1	1,3	1,4	0,7	0,9	0,8
VAL	4,9	4,8	4,3	5,5	4,2	4,7	4,6	4,4	4,8	4,6

ARG, arginine ; HIS, histidine ; ILE, isoleucine ; LEU, leucine ; LYS, lysine ; MET, méthionine ; CYS, cystéines ; PHE, phénylalanine ; THR, thréonine ; TRY, tryptophane ; VAL, valine.

b. Les facteurs antinutritionnels des ingrédients végétaux

Par définition, les facteurs antinutritionnels sont des composés qui affectent ou influencent négativement les fonctions physiologiques des organismes qui les ingèrent. Les facteurs antinutritionnels, aussi appelés antinutriments, sont présents dans la plupart des végétaux et assurent des fonctions défensives contre les prédateurs (**Tableau 5, p. 34**). Leurs effets et modes d'action sont variables et leur présence dans les aliments sont susceptibles d'entraîner des réactions allergiques, une mauvaise assimilation des nutriments, une digestion déficiente, une baisse de la prise alimentaire et de bouleverser les voies métaboliques. Les poissons carnivores, et particulièrement les salmonidés, sont hautement sensibles à ces antinutriments et les conséquences des régimes végétaux se traduisent généralement par des inflammations de la muqueuse intestinale et des baisses de croissance (Krogdahl et al., 2010).

On retrouve plusieurs catégories de facteurs antinutritionnels au sein des ingrédients végétaux utilisés dans la formulation des aliments aquacoles (Francis et al., 2001). La première catégorie regroupe les **composés interférant avec la digestion et l'assimilation des nutriments**. A titre non exhaustif, cette catégorie rassemble par exemple les inhibiteurs de protéases, les phytates, les tannins, les

polysaccharides non amylacés, les oligosaccharides et les anti-vitamines. Les **inhibiteurs de protéase** tels que l'inhibiteur de trypsine, présent dans les farines de soja à hauteur de 2 à 6 g/kg, ainsi que les tannins que l'on retrouve particulièrement dans les oléagineux, ont pour effets de réduire les activités protéolytiques en se liant aux enzymes digestives (protéases) ou aux nutriments (protéines, minéraux) présents dans le tube digestif. Cela affecte la digestion et empêche l'assimilation des nutriments. Les **phytates ou acides phytiques** sont très concentrés dans les farines de soja (10 à 15 g/kg), de colza (50 à 75 g/kg) et de sésame (24 g/kg). Au même titre que les inhibiteurs de protéases, ils sont enclin à diminuer la digestion des protéines et diminuent la disponibilité des minéraux en se liant aux cations divalents (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) de par leur charge hautement négative. Par ailleurs, les phytates sont associés au phosphore dans les graines et rendent le phosphore indisponible à l'assimilation pour des animaux non-ruminants (Fekadu Gemedo, 2014). En plus d'être indigestes pour les poissons, les **polysaccharides non amylacés et les oligosaccharides**, très présents dans les farines de soja (20 % et 15 %, respectivement), réduisent considérablement l'absorption des nutriments (lipides, minéraux, eau) en augmentant la viscosité intestinale (production excessive de mucus) et en bloquant l'activité des enzymes digestives (Sinha et al., 2011). Aussi bien retrouvées dans les céréales, les oléagineux que les légumineux, les **anti-vitamines** (antithiamines et antiniacine) empêchent quant à elles l'assimilation des vitamines. Néanmoins, la plupart des ingrédients végétaux et les aliments sont transformés à chaud ce qui permet d'annuler les effets de ces antinutriments souvent sensibles aux fortes températures (Hajra et al., 2013).

Les **glucosinolates** sont les principaux antinutriments retrouvés dans les farines de colza (3 à 8 % de la matière première) mais des concentrations faibles ($< 20 \mu\text{mol/g}$ d'aliment) sont suffisantes pour impacter le métabolisme et la croissance des poissons. L'hydrolyse de ces hétérosides soufrés relâchent des composants toxiques (goitrine, nitriles) responsables de dysfonctionnements thyroïdiens, d'hémorragies tissulaires rénales et hépatiques et de réduction de la prise alimentaire chez les volailles (Seskeviciene et al., 2004), les porcs (Bourdon and Aumaître, 1990) et les poissons (Burel et al., 2000). Les composants libérés, notamment la progoitrine et les isothiocyanates, peuvent également provoquer une baisse de l'appétence de l'aliment en provoquant une sensation d'amertume (Tripathi and Mishra, 2007).

Les **phyto-œstrogènes** (isoflavones), présents dans la plupart des ingrédients végétaux, traversent la muqueuse intestinale et se retrouvent dans la circulation entéro-hépatique sans être dégradés ou éliminés. Chez l'esturgeon, les phyto-œstrogènes sont capables de se fixer aux récepteurs des œstrogènes et d'induire la vitellogenèse (Pelissero and Sumpter, 1992). Les **alcaloïdes** (acides oxalique, malique, tartrique ou citrique) contenus dans les légumineuses sont quant à eux responsables de dérèglements nerveux (augmentation des transmissions nerveuses). Ils impactent également l'intégrité de la muqueuse intestinale (déstabilisation des parois cellulaires) et influencent la prise

alimentaire en raison de leur amertume. Les truites arc-en-ciel sont particulièrement sensibles aux alcaloïdes très présents dans les farines de lupin. La truite peut toutefois supporter des niveaux d'incorporation de lupin jusqu'à 50 % de l'aliment, sans effet délétère sur l'efficacité aliment, à condition que les variétés de lupin contiennent une faible quantité d'alcaloïdes (< 20 mg/kg) (Burel et al., 1998; Fekadu Gemedo, 2014; Francis et al., 2001).

Une autre catégorie d'antinutriments regroupent les **composants abrasifs** qui augmentent la perméabilité du tube digestif et bouleversent considérablement la structure de la paroi intestinale. Les principaux antinutriments de cette catégorie sont la **saponine** et la **lectine** dont les teneurs s'élèvent respectivement à 60 mg/kg et entre 10 et 200 µg/g dans les farines de soja. Les saponines et lectines attaquent l'ensemble des muqueuses et leurs propriétés détergentes provoquent des entérites qui ont de sérieuses conséquences sur les fonctions absorbatives intestinales et provoquent des réactions immunitaires prononcées, entraînant des baisses de croissance chez les poissons. Ces antinutriments sont capables de se lier à des nutriments ou à des enzymes, réduisant ainsi l'absorption intestinale (Fekadu Gemedo, 2014; Francis et al., 2002; Gatlin III et al., 2007). Les **gossypols** sont des pigments toxiques retrouvés principalement dans les graines de coton (400 à 800 mg/kg). Chez les animaux, leurs effets sont divers et rejoignent ceux décrits pour les saponines et la lectine (perturbation de l'intégrité et l'absorption intestinales). De plus, ces antinutriments peuvent provoquer des pathologies rénales et hépatiques (accumulation de céroïdes dans le foie, dégénérescences tissulaires) et peuvent être toxiques pour la reproduction (infertilité, activité et morphologie anormales des spermatozoïdes) (Wang et al., 2009).

Les **molécules antigéniques**, telles que la **glycine** ou la **β-conglycinine** retrouvées dans le soja, sont quant à elles responsables de réactions allergènes induisant une réponse immunitaire (production d'anticorps, stimulation de cellules immunitaires). Bien que leur présence soit très faible dans les farines végétales, des fortes concentrations peuvent néanmoins provoquer des lésions intestinales et des mouvements intestinaux anormaux (Francis et al., 2001).

Tableau 5 Présence (◆) ou absence des principaux facteurs antinutritionnels dans les ingrédients végétaux (adapté de Oliva-Teles et al., 2015 et Francis et al., 2001).

Antinutriments	CEREALES		OLEAGINEUX				LEGUMINEUX		
	Maïs	Blé	Colza	Coton	Soja	Tournesol	Lupin	Pois	Féverole
Inhibiteurs de protéases	◆	◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆
Phytates	◆	◆	◆	◆	◆			◆	◆
Glucosinolates			◆		◆				
Saponines					◆	◆	◆	◆	
Tannins				◆	◆	◆			
Lectines ou hémagglutinines		◆			◆			◆	◆
Polysaccharides non amylacés et oligosaccharides					◆			◆	
Phyto-œstrogènes	◆	◆	◆	◆	◆		◆		
Alcaloïdes							◆	◆	
Composants antigéniques					◆				
Gossypols				◆					
Anti-vitamines	◆			◆	◆	◆	◆	◆	

c. Effets secondaires des régimes végétaux

Au cours des dernières décennies, l'utilisation des ingrédients végétaux en remplacement des farines marines a largement été étudiée (**Figure 4, p. 17**) (Aragão et al., 2022). Néanmoins, le remplacement des farines de poisson par des quantités encore plus importantes d'ingrédients végétaux restent un défi pour le secteur aquacole qui doit également faire face à la hausse des prix des matières premières végétales. Les procédés de transformation des matières premières végétales, réalisés en amont de leur inclusion dans les aliments aquacoles, a permis d'inclure de plus grandes quantités d'ingrédients végétaux dans les aliments pour poissons carnivores. Les traitements sont divers et permettent par exemple de réduire ou d'annuler l'activité de certains facteurs antinutritionnels (**Tableau 6, p. 38**), d'augmenter la biodisponibilité des nutriments en fractionnant les matières initialement non assimilables ou de réduire la quantité de fibres (Drew et al., 2007). La sélection génétique de plantes pauvres en gossypols s'est révélée être une stratégie concluante pour augmenter l'utilisation de farines de coton dans les aliments aquacoles (Rathore et al., 2020).

La sévérité des effets néfastes des facteurs antinutritionnels est souvent liée à leur quantité dans les aliments. C'est la raison pour laquelle des contraintes d'incorporation sont appliquées à certaines matières premières lors de la formulation des aliments, pour éviter ces effets négatifs. De

manière générale, les régimes comportant d'importantes quantités d'ingrédients végétaux, et par extension de facteurs antinutritionnels, sont susceptibles d'induire des retards de croissance et d'impacter les performances de reproduction (Lazzarotto et al., 2015; Romarheim et al., 2008). Ils peuvent également désorganiser les communautés bactériennes intestinales (Desai et al., 2012; Serra et al., 2021; Zhou et al., 2018), provoquer des réactions immunitaires et inflammatoires ainsi que des entérites (G. Baeverfjord and Krogdahl, 1996; Urán et al., 2008; van den Ingh et al., 1991) et avoir un impact sur la qualité nutritionnelle et sensorielle de la chair (Brinker and Reiter, 2011; De Francesco et al., 2007; Valente et al., 2016). Les mécanismes que les poissons doivent mettre en place pour lutter contre les effets néfastes des facteurs antinutritionnels et maintenir leurs fonctions physiologiques sont souvent coûteux en énergie qui ne sera pas utilisée pour la croissance ou pour lutter contre des agents pathogènes (Krogdahl et al., 2000; Reda et al., 2021). Les conséquences de l'inclusion d'ingrédients végétaux dans les aliments aquacoles sont très liées aux espèces et les effets observés sont étroitement corrélés au niveau trophique, au temps d'exposition à l'aliment ainsi qu'au type et la quantité de matériel végétal utilisé (Couto et al., 2016; Reverter et al., 2021).

Le succès d'un régime comportant des ingrédients végétaux réside tout d'abord dans le choix des matières premières utilisées puisque les plantes ne sont pas toutes équivalentes en termes de valeurs nutritionnelles et de conséquences sur les poissons (Rodiles et al., 2015). Chez les principales espèces carnivores (salmonidés et poissons marins), des études ont montré qu'une substitution partielle des farines marines par des matières premières végétales impacte peu, voire pas du tout, la croissance, la consommation de l'aliment, l'utilisation des nutriments et la composition de la chair (Collins et al., 2013; Daniel, 2018). Néanmoins, des effets néfastes peuvent être observés au-delà de certains seuils de substitution des farines de poissons. Bien que quelques études aient montré qu'une substitution totale des farines de poissons pouvait être sans conséquences sur la croissance des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Daniel, 2018), cette espèce reste généralement sensible à des niveaux de substitution élevés et tolèrent des niveaux moyens d'inclusion de végétaux ne dépassant pas 50 % de l'aliment (Cheng et al., 2003; Lund et al., 2011). Un essai de croissance conduit par Gomes et al. chez la truite arc-en-ciel montre qu'un régime strictement composé de protéines végétales entraîne une baisse significative de croissance principalement expliquée par une réduction de la prise alimentaire (Gomes et al., 1995). Chez cette même espèce, une étude plus récente a érigé les mêmes constats au niveau de la croissance et de la prise alimentaire pour des niveaux d'inclusion de concentré protéique de maïs dépassant les 90 g par kg dans un aliment composé de niveaux constants de tourteau de soja (250 g/kg) et de farine de blé entier (100 g/kg). De plus, l'étude met en évidence une augmentation de l'activité du lysozyme plasmatique suggérant une activation de la réponse immunitaire innée, ainsi qu'une coloration de la chair de ces poissons en jaune susceptible d'affecter l'appréciation visuelle du produit par les consommateurs (Hosseini Shekarabi et al., 2021). Le saumon Atlantique (*Salmo salar*)

est également sensible aux régimes végétaux et particulièrement aux farines de soja. Krogdahl et al. ont montré que les réponses physiologiques du saumon Atlantique sont fortement corrélées aux niveaux d'inclusion de farines de soja dans l'alimentation, y compris à de faibles teneurs (10 %). Contrairement à d'autres études conduites sur le saumon Atlantique avec des régimes végétaux (Espe et al., 2006; Pratoomyot et al., 2010), les auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet notable de la farine de soja sur les performances zootechniques, excepté pour des niveaux d'inclusion supérieurs à 15 % qui s'accompagnent d'une diminution du taux spécifique de croissance et d'une réduction de la digestibilité de l'énergie et des lipides. En revanche, une inflammation de la partie distale de l'intestin, se traduisant par des changements morphologiques de la muqueuse intestinale, est couramment observée chez cette espèce. Dans cette étude, les auteurs confirment l'apparition de symptômes caractéristiques de l'entérite, à savoir une réduction de la vacuolisation des cellules absorbatives, une infiltration de cellules immunitaires dans la *lamina propria*, des variations de la taille et de la largeur des villosités et une réduction de l'activité de plusieurs enzymes digestives. Ces effets sont par ailleurs accentués pour des niveaux d'inclusion de soja élevés (> 15 %) (Krogdahl et al., 2003). Deux études annexes montrent des effets similaires sur les paramètres zootechniques chez la morue Atlantique (*Gadus morhua*) nourrie durant 28 semaines avec des niveaux d'inclusion de farines végétales croissants (25 %, 50 %, 75 % et 100 % d'inclusion) (Hansen et al., 2007; Olsen et al., 2007). Les poissons nourris avec un régime contenant plus de 50 % de matières premières végétales affichaient une baisse de la consommation de l'aliment et du taux spécifique de croissance pouvant s'expliquer par un déséquilibre en acides aminés de l'aliment. Les régimes composés de 75 % et 100 % de végétaux présentaient des teneurs en méthionine très faibles au regard des besoins des poissons. Les auteurs ont également souligné une présence importante d'eau et de saponines non dégradées dans les fèces se traduisant par des diarrhées, ainsi qu'une hypertrophie et hyperplasie des cellules à mucus typiques des entérites induites par les farines de soja.

Certaines espèces de haut niveau trophique sont néanmoins beaucoup plus tolérantes face à de forts taux d'inclusion d'ingrédients végétaux dans l'aliment. Une étude d'un an conduite sur la daurade royale (*Sparus aurata*) a par exemple montré qu'un régime composé de 75 % de végétaux n'affectait pas significativement la croissance des poissons. En revanche, les auteurs de l'étude ont souligné qu'une alimentation avec ce type de régime provoquait un engraissement symptomatique de la chair et du foie (De Francesco et al., 2007). Une étude plus courte de 12 semaines sur le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) a montré des phénotypes similaires en termes d'accumulation de lipides au niveau musculaire mais pour des teneurs en matières premières végétales dans l'aliment nettement plus conséquentes (95 %) (Kaushik et al., 2004).

Les poissons plats ont également fait l'objet d'études sur la substitution des farines de poisson par des matières premières végétales avec des réponses variables en fonction des espèces. Au même

titre que la truite arc-en-ciel, le turbot (*Psetta maxima*) peut supporter des régimes comportant 50 % d'ingrédients végétaux. Au-delà, cette espèce subit une baisse de croissance et de la prise alimentaire, une diminution de l'utilisation et du dépôt protéiques, des bouleversements métaboliques au niveau lipidique et protéique, ainsi qu'une augmentation de certains marqueurs plasmatiques du stress (cortisol) et de l'immunité innée (lysozyme) (Bonaldo et al., 2015, 2011). La sole Sénégalaise (*Solea senegalensis*) tolère au contraire des régimes plus concentrés en matières premières végétales. Jusqu'à 75 % d'inclusion et pendant 20 semaines d'alimentation, aucun effet majeur n'a été observé sur la digestibilité et la qualité de la chair des poissons. Les teneurs musculaires en lipides, protéines, acides gras polyinsaturés n-3 et DHA étaient similaires aux poissons nourris avec un régime plus traditionnel à base de farine et d'huile de poissons. Dans cette même étude, un régime strictement végétal a également été testé. Il a engendré une baisse de la prise alimentaire, de la croissance et de la rétention d'azote chez les poissons. Ces effets ont été expliqués par le déséquilibre en acides aminés de l'aliment, la présence de facteurs antinutritionnels et une mauvaise utilisation métabolique des protéines végétales illustrée par un indice de conversion de l'aliment plus élevé (Cabral et al., 2013).

En dépit de leurs conséquences sur la plupart des espèces carnivores, les matières premières végétales restent les principales candidates à la substitution des farines marines et d'énormes progrès ont déjà été réalisés pour permettre une augmentation de leur incorporation dans les régimes aquacoles notamment ceux destinés aux salmonidés (Aas et al., 2022). Néanmoins, les recherches doivent se poursuivre pour continuer à améliorer l'efficacité des nouveaux aliments aquacoles et pousser encore plus loin la substitution des farines de poissons par des matières premières alternatives, en particulier chez les poissons carnivores.

Tableau 6 Exemples de traitements appliqués aux matières premières végétales permettant de réduire ou d'annuler l'activité des facteurs antinutritionnels (adapté de Oliva-Teles, 2015 et Francis et al., 2001).

Antinutriments	Traitement Thermique ¹	Traitement physique ²	Extraction par solvant	Digestion enzymatique et fermentation	Sélection génétique
Inhibiteurs de protéase	◆				
Phytates	◆	◆		◆	◆
Glucosinolates	◆		◆		◆
Saponines			◆		
Tannins	◆	◆	◆	◆	
Lectines ou hémagglutinines	◆				
Polysaccharides non amylacés et oligosaccharides	◆	◆		◆	
Phyto-œstrogènes			◆		
Alcaloïdes		◆	◆		◆
Gossypols		◆	◆		◆
Anti-vitamines	◆				

¹ Autoclave et autocuiseur humide

² Décorticage des graines, extrusion et pré-compression

2. Les protéines animales transformées

a. Généralités et profil nutritionnel des principaux coproduits d'animaux terrestres

Les protéines animales transformées d'animaux terrestres sont des coproduits industriels issus de l'abattage de bétails et de volailles destinés à l'alimentation humaine. Les carcasses et sous-produits sont généralement exposés à un chauffage vapeur sous haute pression afin de déshydrater et de stériliser les matières premières. Les étapes de séparation permettent ensuite d'obtenir une fraction protéique solide et une fraction lipidique liquide. Les deux fractions peuvent être utilisées en nutrition animale (animaux d'élevage ou de compagnie) après filtration ou broyage, traitements complémentaires et vérification de la qualité des produits obtenus (Woodgate et al., 2022). L'abattage des poulets de chair produit environ 20 % de coproduits inutilisables en alimentation humaine. Ils sont obtenus lors de la plumaison (plumes), de la saignée (sang), de l'éviscération (cœurs, estomacs, foies,

intestins, poumons, rates, reins et appareils reproducteurs) et du désossement (os, têtes et pattes). Avant broyage, les plumes et les déchets mous de volailles sont respectivement hydrolysés à la vapeur et cuits (130 °C en moyenne). Ces étapes de transformations permettent de solubiliser la kératine, de rendre les nutriments biodisponibles et digestibles, de séparer les graisses des produits bruts et de stériliser le produit (Bureau, 2006; Ozdemir and Yetilmezsoy, 2020). Le sang de volaille ou de porc est souvent collecté indépendamment des autres coproduits pour éviter toutes contaminations. Les premiers processus de traitement du sang, tel que le séchage en cuve, entraînait une perte importante des propriétés nutritionnelles du produit (dégradation des acides aminés essentiels) et diminuait également son appétence. Des avancées techniques ont ensuite permis de s'affranchir de cette contrainte en développant de nouvelles méthodes de séchage. Aujourd'hui, la technique la plus communément utilisée comprend une étape de cuisson permettant d'évaporer l'eau et un séchage rapide par vaporisation ou une coagulation sous vapeur. Le produit est ensuite broyé pour obtenir des farines de sang (King and Campbell, 1978; Meeker, 2006).

Au niveau mondial, 60 millions de tonnes de coproduits d'animaux terrestres sont produits chaque année. Dans le cadre d'une réduction de la dépendance de l'industrie aquacole vis-à-vis des farines végétales et marines, leur incorporation dans la formulation des aliments aquacoles semble donc pertinente. Par ailleurs, l'utilisation de ces coproduits en tant qu'ingrédients pourrait réduire l'impact environnemental de l'élevage bovin, porcin et de volaille qui représentent 14,5% des émissions annuelles des gaz à effet de serre (Shurson, 2020). L'outil Feedprint, développé par l'Université de Wageningen et Blonk Milieu Advies, regroupe des données concernant l'impact environnemental de diverses matières premières au cours de leur cycle de vie, notamment en termes d'eutrophisation des milieux aquatiques et terrestres, d'acidification des océans, d'utilisation des ressources en eau, d'occupation des terres, d'épuisement des ressources naturelles fossiles et d'appauvrissement de la couche d'ozone. Les coproduits d'origine animale présentent une empreinte environnementale bien plus réduite au cours de leur chaîne de production que les farines de poisson et de soja, pour l'ensemble des marqueurs considérés (**Figure 6, p. 41**). Une étude récente a également montré que l'introduction de farines de plumes et de sang de volailles dans les aliments pour truite arc-en-ciel, en défaveur d'ingrédients végétaux tels que le soja et la féverole, permettait de réduire sensiblement l'impact environnemental de l'aliment et *in fine* celui de la production d'un kilogramme de truite tout en restant économiquement viable (Wilfart et al., 2023).

Les protéines animales transformées sont très riches d'un point de vue nutritionnel (**Tableau 7, p. 42**). Elles présentent des teneurs moyennes en protéines brutes égales ou supérieures à 50 % (50 % dans la farine de viande et d'os, 84,5 % dans la farine de sang, 83 % dans la farine de plumes hydrolysées et 59 % dans la farine de sous-produits de volaille). Exceptée la farine de sang qui ne contient qu'une

faible concentration en lipides (1 %), les farines de viande et d'os, de plumes hydrolysées et de sous-produits de volailles atteignent en moyenne 10 % de lipides. Les farines de sous-produits de volaille sont en revanche pauvres en acides gras oméga 3 (EPA et DHA) et riches en acides gras saturés, susceptibles d'affecter la digestibilité et la qualité de la chair des poissons destinés à l'alimentation humaine. Les profils moyens en acides aminés essentiels des coproduits animaux sont également très proches, voire plus intéressants que ceux des farines de poissons notamment pour ce qui concerne les apports en leucine, phénylalanine, valine et histidine (**Figure 7, p. 43**). Les farines de sang (principalement de porc) contiennent des teneurs en lysine et en leucine supérieures à celles retrouvées dans les farines de poissons (respectivement 14,3 % pour la lysine et 9,1 % pour la leucine contre 7,5 % et 7 % dans la farine de poisson) mais présentent un déficit en isoleucine (0,9 %). Par ailleurs, les farines de viande, d'os et de sous-produits de volailles sont d'excellentes sources de minéraux tels que le calcium et le phosphore. Bien que la plupart des espèces aquatiques utilisent bien les coproduits animaux, les niveaux d'inclusion de ces matières premières dans les aliments aquacoles sont très dépendants des espèces considérées et doivent respecter les besoins respectifs en protéines de chaque espèce pour ne pas altérer leur croissance (Luthada-Raswiswi et al., 2021). Une méta-analyse comparant les espèces d'eau douce et marines a d'ailleurs montré que les poissons d'eau douce toléraient mieux les régimes à base de coproduits de volailles que les espèces marines (Galkanda-Arachchige et al., 2020). La digestibilité des protéines animales transformées, et particulièrement celle des farines de plumes, est longtemps restée variable en fonction du coproduit utilisé dans la formulation des aliments pour poisson. Néanmoins, les techniques de transformation se sont aujourd'hui améliorées et permettent d'obtenir des coproduits plus digestes (Ayadi et al., 2012; Meeker, 2006).

De manière générale, les qualités environnementales et nutritionnelles des protéines animales transformées sont en adéquation avec leur utilisation dans les régimes aquacoles. Contrairement aux farines de poissons et aux sources protéiques végétales, ces matières premières ne dépendent pas d'une saisonnalité et restent disponibles tout au long de l'année. Leurs prix sont également attractifs car généralement inférieurs à celui des farines de poissons (farine de sous-produits de volaille : 1 040 €/tonne ; farine de plumes hydrolysées : 1 070 € / tonne ; farine de sang de porc : 1 200 €/tonne ; farine de poisson : 1 800 € / tonne en janvier 2023) (valeurs fournies en mars 2023 par la coopérative agricole Le Gouessant, France). Ainsi, une substitution partielle ou totale des farines de poisson par des sources protéiques d'origine animale permet de réduire considérablement le prix de l'aliment (Li et al., 2020; Moutinho et al., 2017).

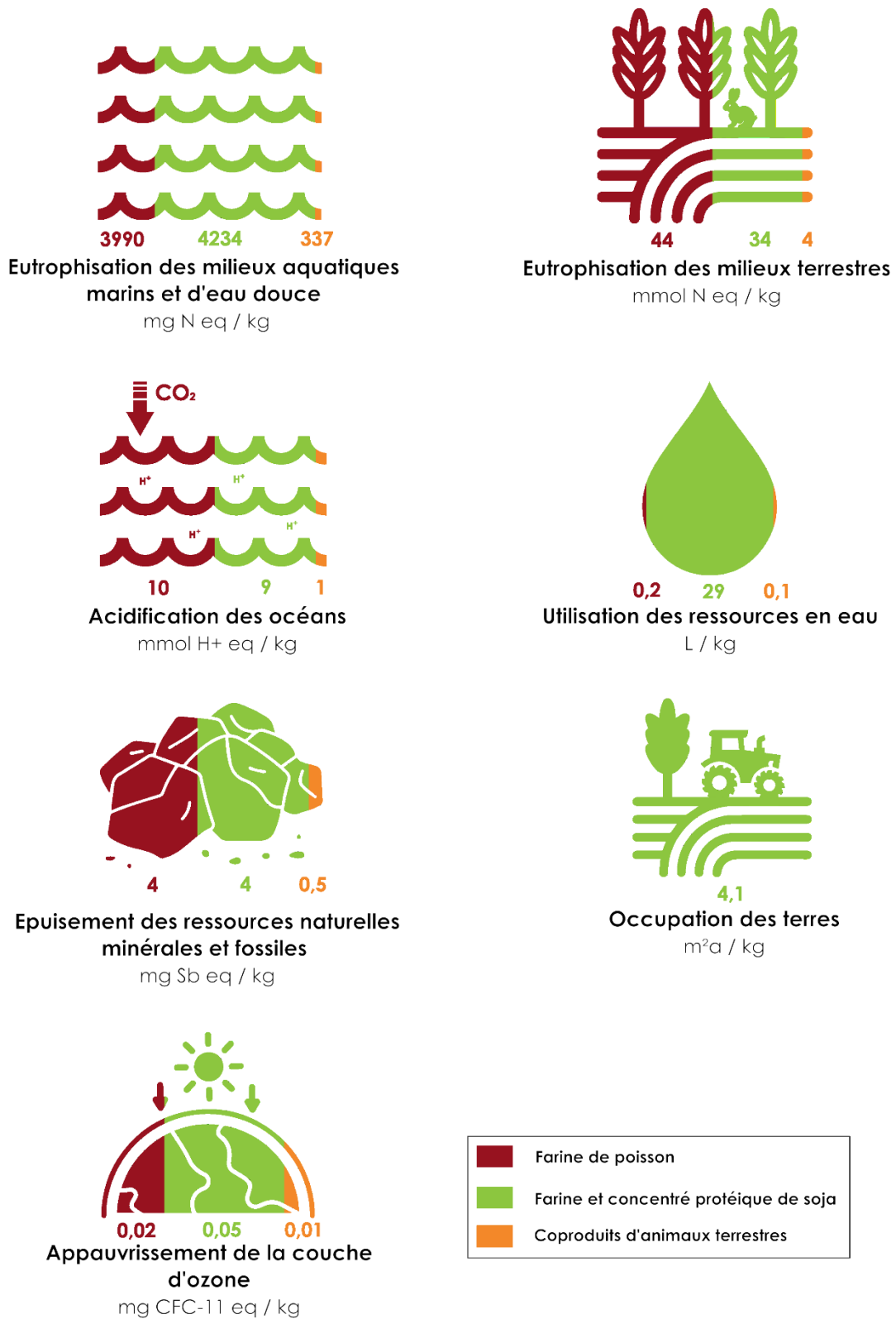


Figure 6 Impact environnemental des farines de poisson, des produits à base de soja (farine et concentré protéique) et des coproduits d'origine animale (farines de plumes hydrolysées, de viande, d'os et de sang). Données brutes disponibles sur <https://www.wur.nl/en/show/feedprint-calculate-co2-per-kilogram-meat-milk-or-eggs.htm>.

Tableau 7 Compositions proximales moyennes et profil en acides aminés des principaux coproduits animaux pouvant être utilisés dans la formulation des aliments aquacoles (Ayadi et al., 2012; Bandara, 2018; Bureau, 2006; Woodgate et al., 2022).

Composition (%)	Farine de viande et d'os ¹	Farine de sang ²	Farine de plumes hydrolysées ³	Farine de sous- produits de volailles ⁴
Matière sèche	93	89	92-93	93
Protéines brutes	50	80-89	81-85	56-62
Lipides	10	1	6-7	11-17
Cendres	5,7	4,1	2,8	17-26
Calcium	10	0,4	0,3	3,0
Phosphore	5	0,3	0,5	1,7
Acides aminés				
<i>Méthionine</i>	0,7	0,8	0,6	1,0
<i>Cystine</i>	0,7	0,5	4,3	1,0
<i>Lysine</i>	2,6	7	2,2	3,1
<i>Thréonine</i>	1,7	3,5	4,3	2,2
<i>Isoleucine</i>	1,5	0,9	4	2,2
<i>Valine</i>	2,4	6,3	5,7	2,9
<i>Tryptophane</i>	0,3	1,3	0,6	0,4
<i>Arginine</i>	3,3	3	6	3,9
<i>Histidine</i>	1,0	3,3	1,3	1,1
<i>Leucine</i>	3,3	10	7	4,0
<i>Phénylalanine</i>	1,8	5,5	4,2	2,3
<i>Tyrosine</i>	1,2	1,5	0,3-2,5	1,7
<i>Glycine</i>	6,7	4,6	6,1	6,2
<i>Serine</i>	2,2	4,3	8,5	2,7

^{1, 2} Mammifères

³ Plumes de poulet, de dinde, de canard et d'oie

⁴ Pattes et cous de volailles, œufs mal développés

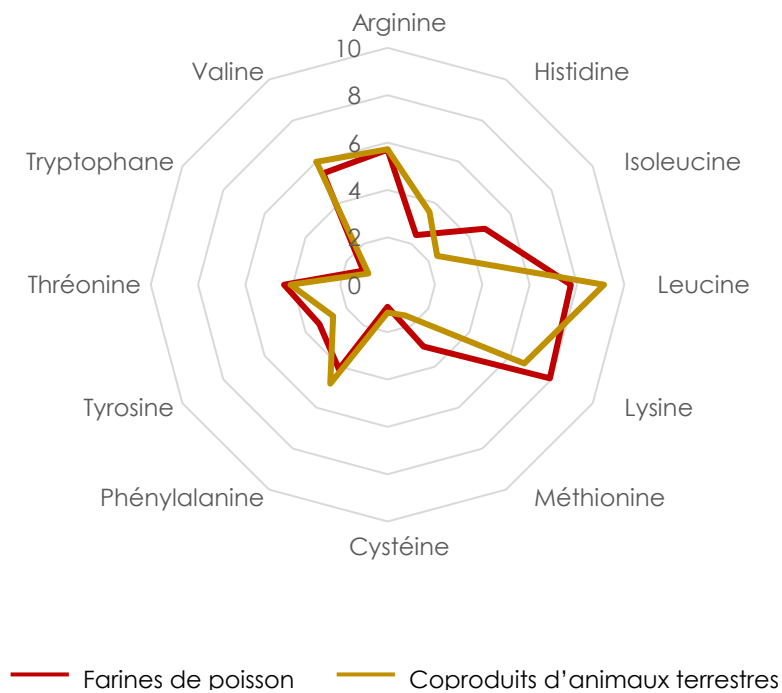


Figure 7 Profils moyens en acides aminés essentiels (en g/100g de protéines) de la farine de poisson et de plusieurs coproduits d'animaux terrestres (farines de viande, de sous-produits de volailles et de sang) (Cho and Kim, 2011).

b. Effets de l'inclusion de coproduits d'origine animale dans les aliments pour poissons carnivores

Les processus de transformation des coproduits animaux se sont nettement améliorés depuis le début du 21^{ème} siècle et ont permis d'optimiser la digestibilité des nutriments de ces matières premières (Bureau et al., 1999). Néanmoins, la qualité nutritionnelle et la composition des protéines animales transformées restent très variables en fonction de leur provenance et des traitements appliqués, ce qui peut provoquer des effets inconstants chez les poissons carnivores. Par ailleurs, la plupart des espèces carnivores ne tolèrent pas d'importants niveaux d'inclusion de protéines animales. En effet, la substitution totale des farines de poissons par des protéines d'origine animale entraîne des retards de croissance résultant d'une altération de l'assimilation des nutriments en lien avec des déséquilibres en acides aminés et en acides gras. Une substitution partielle reste néanmoins possible chez la plupart des espèces carnivores telles que la daurade royale (Moutinho et al., 2017), le tambour à gros yeux (*Pseudosciaena crocea*) (Ai et al., 2006) ou encore le bar rayé hybride (*Morone chrysops* x

Morone saxatilis) (Bharadwaj et al., 2002), qui tolèrent des niveaux de substitution des farines de poissons par des farines de viande et d'os de 50 %, 45 % et 45 %, respectivement, sans variation significative des performances de croissance.

Les retards de croissance observés pour des taux élevés de protéines d'origine animale ont été attribués à une altération de l'assimilation des nutriments et à une diminution de la biodisponibilité des acides aminés (Guimarães et al., 2008). Bien que quelques acides aminés soient limitants (lysine, méthionine et isoleucine), le profil en acides aminés des protéines animales se rapproche pourtant de celui des farines de poisson (**Figure 7, p. 43**). Néanmoins, lors du traitement thermique des farines animales, les protéines et les acides aminés sont susceptibles d'être dégradés, rendant ces nutriments moins disponibles pour les organismes. Ceci est particulièrement observé avec les farines provenant de l'Union Européenne qui sont soumises à des traitements thermiques plus extrêmes que celles provenant de pays en dehors du périmètre de l'Europe (Moutinho et al., 2017). Les effets de la cuisson prolongée des farines de sang ont notamment été observés sur la croissance du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Kiriimi et al., 2016). Durant 100 jours, des tilapias ont été nourris avec des régimes contenant respectivement 0 %, 50 % ou 100 % de farines de sang en substitution de la farine de poissons. Bien que les teneurs en protéines des aliments étaient identiques entre les différents régimes, le groupe de poissons nourri avec le régime substitué à 100 % présentait un retard de croissance comparé à celui alimenté avec le régime non substitué (0 %). Les auteurs ont attribué ces retards de croissance à un potentiel déséquilibre en acides aminés résultant de la dégradation de certains acides aminés au cours de la cuisson de la farine de sang. En effet, les déséquilibres en acides aminés et le déficit de certains acides aminés essentiels limitent la synthèse protéique, dégrade l'efficacité alimentaire et donc freine la croissance (Kiriimi et al., 2017). Une étude chez la truite arc-en-ciel a également évalué la biodisponibilité de la lysine des farines de sang de volailles transformées par séchage sur disque ou par séchage par pulvérisation, et celle des farines de sang de bovin transformées par séchage express (El-Haroun and Bureau, 2007). Pour chaque matière première, deux niveaux d'inclusion de farines de sang (10 % et 20 % de l'aliment représentant théoriquement 1,8 % et 2,2 % de lysine dans l'aliment) ont été testés dans des aliments contenant également 18 % de farine de poissons. Ces aliments ont également été comparés à des régimes composés de 18 % de farine de poissons mais supplémentés avec de la L-lysine HCL, communément utilisée dans la formulation des aliments aquacoles et considérée comme 100 % biodisponible. Les poissons nourris pendant 12 semaines avec les régimes contenant 10 % de farines de sang (1,8 % de lysine) (toutes transformations confondues) présentaient des performances zootechniques supérieures aux poissons nourris avec les aliments dont les niveaux d'inclusion de farine de sang atteignaient 20 % (2,2 % de lysine). De plus, les truites alimentées avec les régimes composés de farines transformées par pulvérisation (sang de volailles) ou

par séchage rapide (sang de bovin) présentaient les meilleures valeurs de gains de poids, de taux de conversion de l'aliment, de rétention de l'azote et de rétention énergétique corporelle par rapport aux poissons nourris avec le régime composé de farines de sang séché sur disque (sang de volailles). Les résultats étaient par ailleurs similaires voire meilleurs que ceux obtenus avec les régimes supplémentés avec la L-lysine HCL. Dans le cadre de cette étude, les performances de croissance réduites ont été expliquées par le fait que d'autres nutriments devenaient limitants (notamment l'isoleucine dont les niveaux avaient été surestimés) dans les aliments contenant 20 % de farine de sang. De plus, l'intensité du processus de séchage sur disque était plus extrême et donc susceptible d'affecter la digestibilité des protéines et des acides aminés. De manière générale, la biodisponibilité des acides aminés de la farine de sang est donc très dépendante des procédés de fabrication utilisés.

L'équilibre en acides aminés de l'aliment est également susceptible d'affecter l'appétence de l'aliment et donc, la prise alimentaire (Kaushik and Seiliez, 2010). Une étude portant sur le poisson chat africain (*Clarias gariepinus*), a révélé que l'augmentation du taux de farines de sous-produits de volailles dans l'aliment entraînait une réduction significative de la prise alimentaire. Cet effet a été associé à une diminution des teneurs en acides aminés essentiels lorsque les teneurs de farines de sous-produits de volaille dans les aliments deviennent trop élevées (Abdel-Warith et al., 2001). Par ailleurs, les fortes teneurs en cendres retrouvées dans les farines d'os et de plume impactent la digestibilité et l'assimilation de certains nutriments. En effet, la présence de cendres dans les aliments a souvent été mise en relation avec une diminution de la digestibilité des protéines et de la disponibilité du phosphore (Ai et al., 2006; Watanabe and Pongmaneerat, 1991).

Le déséquilibre en acides gras et la forte présence d'acides gras saturés dans les farines de viande et les sous-produits de volaille peuvent expliquer la mauvaise assimilation des lipides. En effet, l'inclusion croissante de farines de viande et d'os dans les aliments est corrélée à une hausse des teneurs en acides gras saturés et mono-insaturés. Comparés aux acides gras polyinsaturés à longues chaînes qui sont préférentiellement absorbés par les poissons, les acides gras mono-insaturés et saturés sont faiblement assimilés par les poissons, réduisant ainsi la disponibilité des lipides et de l'énergie pour les organismes (Campos et al., 2019; Moutinho et al., 2017). Les poissons téléostéens, en particulier les espèces marines, tolèrent très peu ces déséquilibres en acides gras (Spisni et al., 1998). C'est notamment ce qui a été observé chez le bar du Japon (*Lateolabrax japonicus*) nourri avec des niveaux croissants de protéines animales (mélange de sous-produits de volailles, de farines de viande, de farines de sang et de farines de plumes hydrolysées) en remplacement de la farine de poissons (20%, 40%, 60% et 80% de substitution). Dans cette étude, Hu et al. ont montré que les poissons nourris pendant 8 semaines avec des niveaux d'inclusion de protéines animales égaux ou supérieurs à 60% présentaient des signes de stéatoses hépatiques (présence de gouttelettes lipidiques au niveau du foie) reflétant une

mauvaise utilisation des lipides alimentaires carencés en acides gras polyinsaturés (n-3) et une diminution des lipides corporels, signes d'une perturbation du métabolisme lipidique chez ces poissons (Hu et al., 2013).

Les freins à l'utilisation des coproduits d'animaux terrestres dans l'alimentation des poissons d'élevage sont souvent plus de l'ordre de la variabilité de la qualité nutritionnelle des matières premières utilisées. Un autre obstacle majeur à leur inclusion dans les aliments d'élevage relève de l'acceptabilité sociétale, comme c'est particulièrement le cas en Europe et surtout en France.

c. L'acceptabilité sociale des régimes à base de coproduits animaux en Europe

Bien qu'il y ait des limites métaboliques à l'utilisation de taux d'inclusion élevés de certains coproduits animaux dans les aliments aquacoles, l'utilisation modérée de protéines animales transformées en aquaculture reste pertinente et compétitive dans le cadre du remplacement des farines de poissons. Toutefois, un évènement historique majeur continue d'entraver l'acceptation des aliments aquacoles contenant des coproduits animaux. Entre 1986 et 1992, le Royaume-Uni est touché par une épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine qui s'est rependue au reste de l'Europe et dans quelques pays asiatiques. L'utilisation, pour l'alimentation des bovins, de farines de viande et d'os contaminées car les modalités de traitement n'avaient pas été strictement respectées, est à l'origine de cette épidémie. Cette maladie à prions touche principalement les bovins et les ovins mais est susceptible de se transmettre à d'autres espèces telles que l'Homme et de provoquer des lésions neurodégénératives cérébrales mortelles. En 1990, l'Europe interdit l'utilisation de farines de viande et d'os pour l'alimentation des bovins puis pour l'ensemble des ruminants six ans plus tard, malgré la mise en place de processus de traitement des matières premières à risque (Directive 90/667/CEE du Conseil du 27 novembre 1990 et Décision de la Commission 97/18/CE du 16 décembre 1996). En 2001, l'Union Européenne finit par interdire l'utilisation de tous les coproduits animaux dans l'alimentation des espèces à viande (Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001). Ce n'est qu'en 2013 que la Commission Européenne réautorise l'introduction de coproduits de catégorie 3 provenant d'animaux non-ruminants et dits à risque faible pour la santé animale ou publique, dans l'alimentation des poissons d'élevage (Règlement (UE) n° 56/2013 de la Commission du 16 janvier 2013) (**Tableau 8, p. 48**). Dans le reste du monde (Amérique du Nord, Amérique du Sud et Australie), les réglementations appliquées ont été moins strictes et concernent aujourd'hui encore principalement les coproduits de ruminants et les tissus à risque (cerveau et moelle épinière). Dans ces

pays, l'utilisation de coproduits d'animaux non ruminants et de volailles dans les aliments aquacoles n'a d'ailleurs jamais été vraiment soumise à réglementation.

Quelques études ont évalué la pathogénie des maladies à prions chez les poissons. Chez la truite arc-en-ciel et le turbot, une liaison spécifique de la protéine à prion à la muqueuse intestinale a été observée, mais aucun transport actif à travers la paroi intestinale n'a été décelé, ce qui suggère une élimination rapide de la charge infectieuse (Dalla Valle et al., 2008; Ingrosso et al., 2006). Les poissons exposés à des homogénats de cerveaux de souris contaminées avec la souche de la tremblante ovine (139A), n'ont d'ailleurs développé aucun symptôme de la maladie sur toute la période post-infection qui s'étendait sur 90 jours. Dans cette même étude, la transmission de la tremblante du poisson vers la souris a été évaluée par le biais d'une inoculation d'homogénats de tissus de poissons prélevés à différents temps post-infection. Les résultats obtenus n'ont montré aucun développement pathologique de la tremblante chez les rongeurs (Ingrosso et al., 2006). Une étude de Salta et al. a évalué la transmission potentielle de deux maladies à prions (encéphalopathie spongiforme bovine et tremblante ovine) chez la daurade royale. Après l'infection, les poissons ont été suivis durant 24 mois. A la fin de cette période, bien qu'aucun symptôme clinique n'ait été observé chez les poissons inoculés avec les deux souches, des signes de neurodégénérescence et la présence de dépôts ont tout de même été relevés dans le cerveau. Ces résultats suggèrent que les symptômes ou signes de transmission des maladies à prions pourraient exister chez les poissons. L'utilisation de protéines animales en aquaculture doit donc également faire l'objet d'une attention particulière (Salta et al., 2009).

Bien que les risques associés à l'utilisation de coproduits animaux aient été identifiés et peuvent être contrôlés, l'acceptabilité sociale reste faible en Europe et en particulier en France où les consommateurs sont réticents à la consommation d'animaux nourris avec des protéines d'origine animale (Anses, 2013; Glencross et al., 2020a; Woodgate et al., 2022).

Tableau 8 Les catégories de coproduits animaux et leurs utilisations respectives en Europe (Woodgate et al., 2022).

	Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3
Source	<ul style="list-style-type: none"> • Coproduits ovins et bovins à risque • Animaux euthanasiés ou morts (à risque ou non) • Animaux et organes contenant des résidus médicamenteux 	<ul style="list-style-type: none"> • Animaux (toutes espèces confondues) morts ne présentant pas de risque • Organes et tissus issus des autopsies 	<ul style="list-style-type: none"> • Animaux non ruminants déclarés propres à la consommation par une autorité vétérinaire
Traitement	<ul style="list-style-type: none"> • Incinération • Combustion 	<ul style="list-style-type: none"> • Techniques d'équarrissage • Digestion anaérobique • Compostage 	<ul style="list-style-type: none"> • Digestion anaérobique • Compostage • Transformations diverses
Utilisations	<ul style="list-style-type: none"> • Production d'énergie • Production de biofuel 	<ul style="list-style-type: none"> • Production de biofuel • Production de fertilisants 	<ul style="list-style-type: none"> • Production de biofuel • Production de fertilisants • Production d'aliments pour animaux de compagnie et d'élevage

PARTIE 2

Les interactions entre nutrition et immunité chez les poissons d'élevage

En aquaculture, le rôle premier d'un aliment est de couvrir les besoins nutritionnels des poissons pour obtenir des performances de croissance satisfaisantes et des produits de qualité, mais on attend également de l'alimentation qu'elle promeuve la santé des poissons. En effet, chez les poissons d'élevage, la nutrition joue un rôle primordial dans la capacité des organismes à faire face à des stress ou à des maladies et les interactions entre nutrition et immunité sont bien décrites chez ces animaux (Pohlenz and Gatlin, 2014). Au-delà de la stricte composition en macronutriments, la capacité d'un aliment à répondre réellement aux besoins nutritionnels des poissons dépend de la nature des matières premières qui constituent l'aliment. En théorie, les apports en protéines, lipides, acides aminés et acides gras peuvent être couverts mais en pratique, on s'aperçoit que les performances peuvent varier en fonction des matières premières utilisées. Par exemple, les régimes à base de protéines animales peuvent entraîner une mauvaise assimilation intestinale des acides aminés et des acides gras, et les régimes à base de farines de soja peuvent provoquer une inflammation du tube digestif et impacter les fonctions immunitaires. Certains aliments peuvent fragiliser la robustesse des poissons et les rendre plus sensibles à des épizooties ou vis-à-vis de stress environnementaux. Pour améliorer la santé des animaux et leur robustesse, le secteur de l'alimentation animale y compris aquacole, a parfois recours à l'utilisation d'additifs fonctionnels (Lall, 2000; Trichet, 2010).

L'immunité des vertébrés supérieurs (Homme et souris) est largement décrite dans la littérature. Les fonctions immunitaires des poissons sont en revanche moins bien connues, bien qu'elles soient assez similaires à celles des mammifères et des oiseaux. Chez les téléostéens et notamment chez la truite arc-en-ciel, on retrouve un système immunitaire inné et adaptatif leur permettant de répondre et de se défendre lors d'une attaque pathogène, de dommages tissulaires ou d'un stress inflammatoire. Ces mécanismes impliquent des tissus, des épithéliums et des muqueuses qui constituent non seulement des barrières physiques contre l'entrée d'agents infectieux dans l'organisme, mais jouent également un rôle dans la production et la différenciation de cellules immunitaires. Les fonctions immunitaires sont gouvernées par des facteurs cellulaires et humoraux impliqués à la fois dans l'élimination des pathogènes et dans la transmission de messages entre les différents agents du système immunitaire (Boltana et al., 2013). Dans un contexte d'élevage aquacole, une meilleure compréhension

des mécanismes modulant les fonctions immunitaires pourrait permettre au secteur aquacole de s'affranchir des certaines conséquences néfastes de l'utilisation d'aliments à base de nouveaux ingrédients. L'enjeu est important pour l'éleveur car les maladies ont un coût important puisqu'elles entraînent généralement une chute de la production et donc une perte économique. Ainsi, une meilleure connaissance des interactions entre nutrition et immunité chez les poissons parait pertinente dans le cadre de l'amélioration des régimes à base d'ingrédients alternatifs et dans la prévention des pathologies d'origines nutritionnelle ou microbienne.

Cette partie a pour objectif premier de rappeler l'anatomie gastro-intestinale de la truite arc-en-ciel et ses fonctions dans la physiologie digestive. Dans un second temps, les principales fonctions immunitaires des poissons téléostéens ainsi que les organes et tissus impliqués dans l'immunité seront détaillés. Enfin, les facteurs nutritionnels susceptibles de moduler l'immunité des poissons seront également évoqués.

1. Anatomie gastro-intestinale et fonctions dans la physiologie digestive

Comparée aux mammifères et aux oiseaux, l'anatomie du tractus gastro-intestinal des poissons est plus simple mais reste variable en fonction du niveau trophique et du régime alimentaire des espèces. Cette partie se focalisera donc plus particulièrement sur l'anatomie digestive des salmonidés puisque la truite arc-en-ciel a été utilisée comme modèle biologique dans le cadre de la thèse. Un schéma descriptif simplifié du tractus gastro-intestinal de la truite arc-en-ciel est proposé dans la **Figure 8 (p. 53)**. Il est composé de trois grandes parties. La première partie comprend la bouche et le pharynx qui ont pour rôle l'acquisition de la nourriture. La seconde partie est constituée de l'œsophage et de l'estomac où débute la digestion chimique des aliments. L'intestin compose la troisième partie du tractus gastro-intestinal. Il représente la partie du système digestif qui s'étend de la sortie de l'estomac au rectum. Chez la truite, l'intestin est subdivisé en trois parties : le caecum pylorique, l'intestin médian et l'intestin distal. Le caecum pylorique est une partie de l'intestin qui se situe à la jonction entre l'estomac et l'intestin médian et se présente sous la forme d'évaginations de la muqueuse intestinale appelées tubes pyloriques. Contrairement aux thonidés et aux esturgeons qui possèdent un caecum pylorique fusionné, les salmonidés présentent de nombreux tubes pyloriques bien définis et de grande taille. L'intestin médian jouxte le caecum pylorique et représente la partie la plus longue de l'intestin. Il est constitué d'une partie proximale et d'une partie distale dont les rôles principaux sont la digestion chimique et l'absorption des nutriments. Les deux parties de l'intestin médian sont séparées par un coude indiquant le début de l'intestin distal qui se distingue également de l'intestin proximal par un diamètre plus important (Bjørngen et al., 2020; Martin, 2013; Wilson and Castro, 2010).

La paroi de l'intestin médian est composée de trois couches : la *tunica serosa*, la *tunica muscularis* et la muqueuse intestinale, cette dernière étant en contact avec la lumière intestinale (**Figure 9, p. 54**). La *tunica serosa* est une couche mince composée de cellules mésothéliales formant un tissu conjonctif vascularisé et innervé. La *tunica muscularis* est une couche musculuse épaisse composée de muscles striés et lisses. La muqueuse intestinale comprend une sous-muqueuse constituée d'une fine couche de tissus connectifs lâches et de la *tunica mucosa*. Cet ensemble forme des invaginations vers la lumière intestinale, appelées villosités intestinales et dont l'axe comprend la *lamina propria* (**Figure 10, p. 54**). Chaque villosité est composée d'un épithélium principalement formé d'entérocytes dont les fonctions sont absorbatives et sécrétoires ainsi que de cellules caliciformes qui produisent du mucus constituant une barrière physique et chimique contre l'entrée de toxines et de pathogènes. D'autres types cellulaires sont retrouvés tout le long de l'épithélium tels que des cellules endocrines sécrétrices impliquées dans la production et la sécrétion d'hormones (exemple : les entérochromaffines sécrètent la sérotonine qui est un neurotransmetteur du système nerveux), ou des cellules à bâtonnets

exclusivement retrouvées chez les téléostéens et impliquées dans les fonctions immunitaires et les réponses de type inflammatoire (Bjørngen et al., 2020; Khojasteh, 2012; Sayyaf Dezfuli et al., 2022; Wilson and Castro, 2010). Les entérocytes adjacents sont reliés entre eux par des jonctions spécifiques sur leurs bases latérales. Ces jonctions serrées appelées aussi *zona occludens* permettent aux entérocytes de former une barrière étanche qui limite le passage de molécules et de bactéries à travers l'espace intracellulaire. Elles sont composées entre autres de protéines appelées claudines et occludines. Ces protéines transmembranaires sont présentes dans tous les épithéliums et donc dans l'intestin où elles jouent un rôle essentiel dans la perméabilité paracellulaire en régulant le passage des fluides intestinaux. Elles constituent aussi une barrière physique contre l'entrée des toxines et autres pathogènes à travers la membrane intestinale (Günzel and Yu, 2013; Kolosov et al., 2013). Les aquaporines sont des petites protéines transmembranaires également présentes dans les membranes cellulaires intestinales. De manière sélective, elles facilitent et régulent le passage et l'excrétion de l'eau (aquaporines orthodoxe) et des solutés tel que le glycérol (aquaglycéroporines), à travers la membrane intestinale (Breves et al., 2020; Sundell and Sundh, 2012).

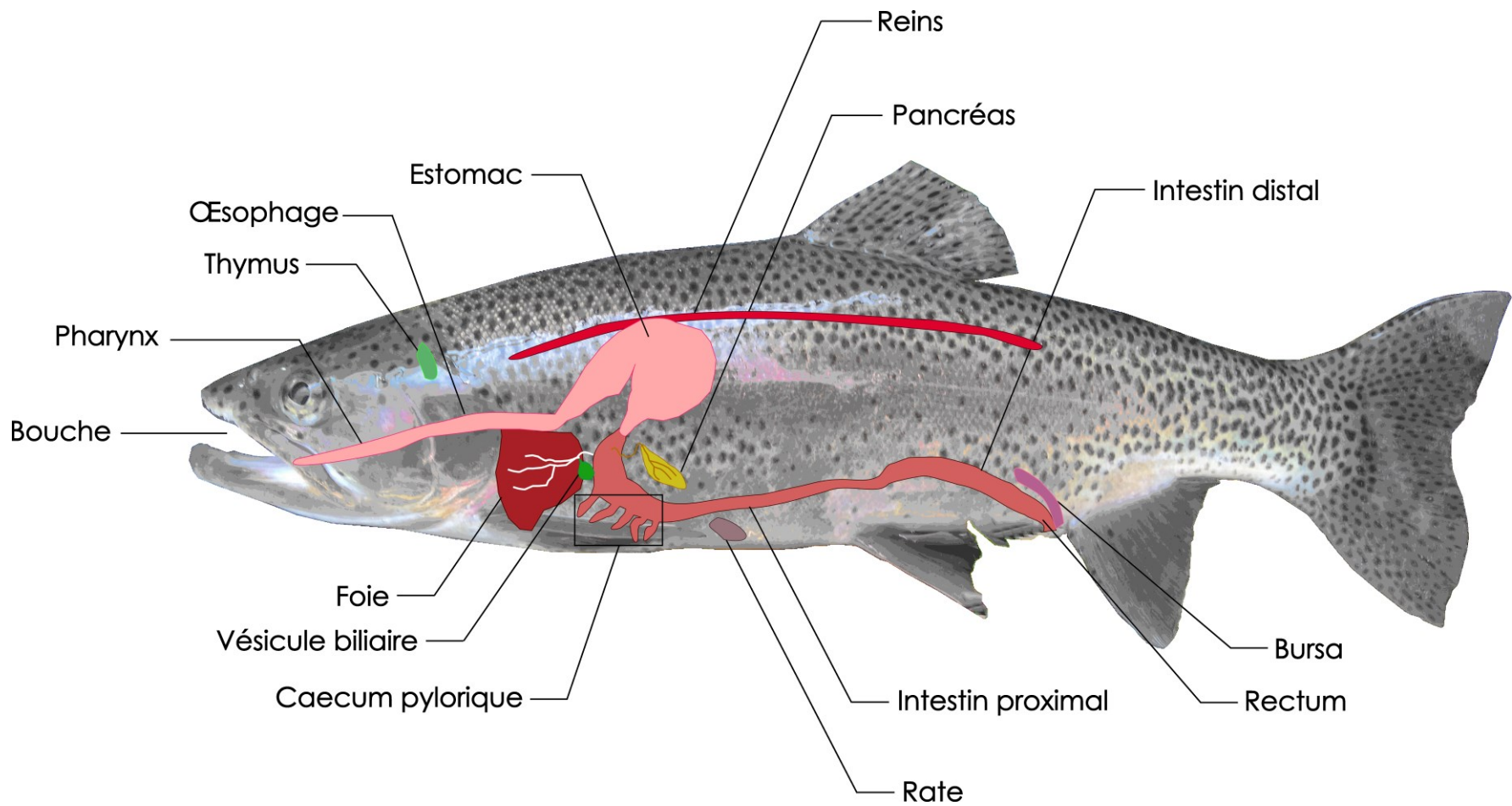


Figure 8 Morphologie gastro-intestinale et principaux tissus impliqués dans les fonctions immunitaires chez la truite arc-en-ciel (Bjørngen et al., 2020).

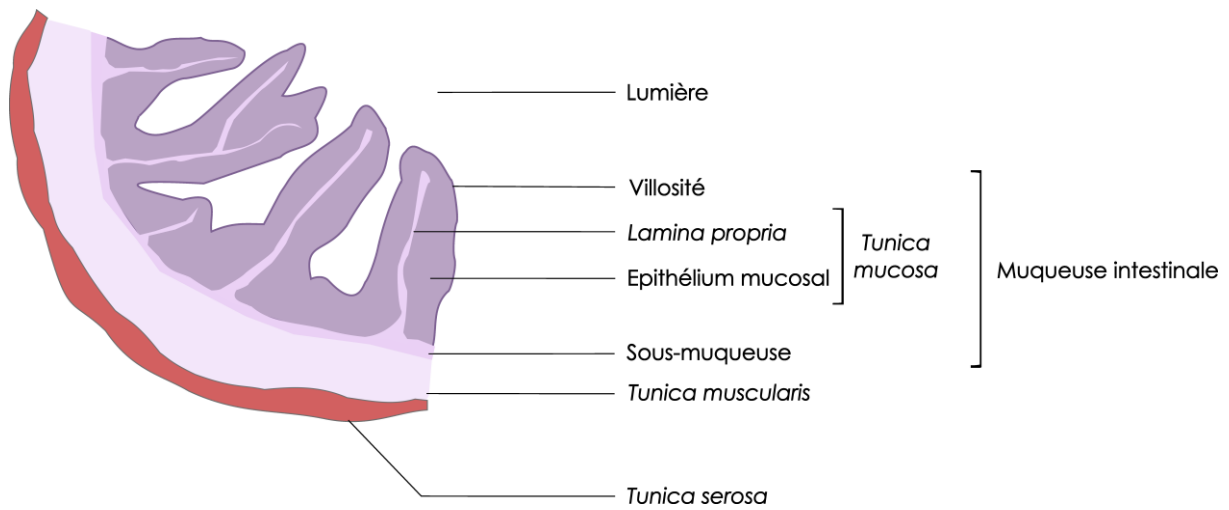


Figure 9 Illustration des couches de l'intestin médian chez les poissons (vue transversale) (Bjørngen et al., 2020).

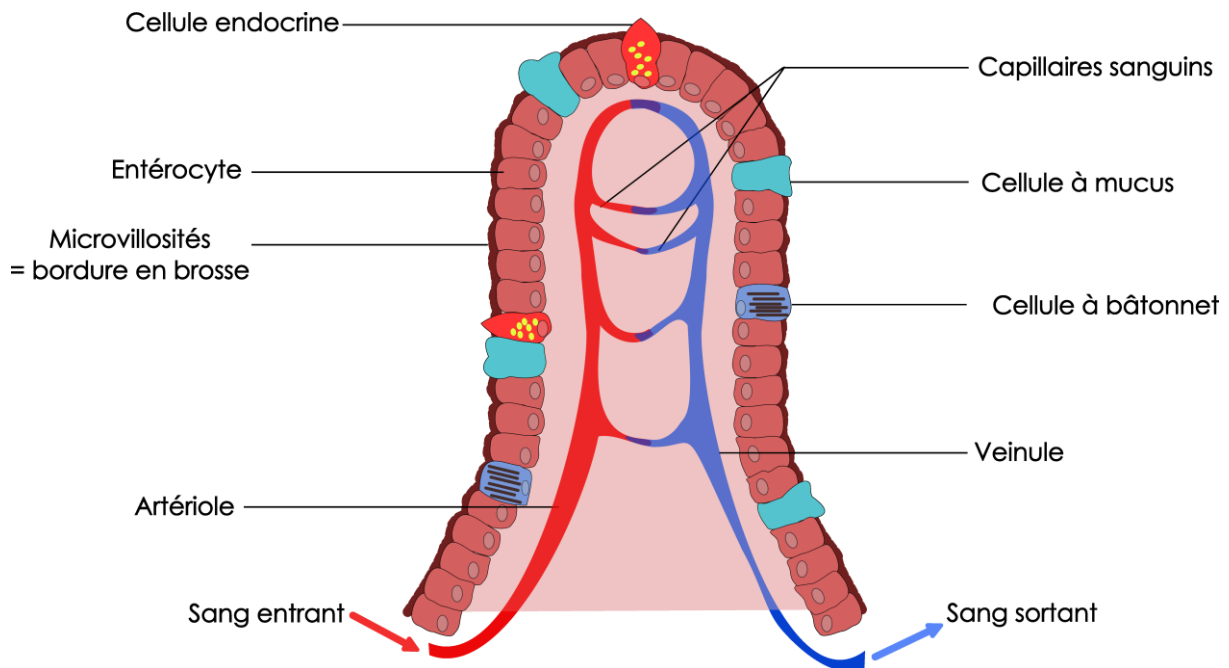


Figure 10 Illustration des éléments d'une villosité intestinale chez les poissons (vue transversale) (Bjørngen et al., 2020).

La fonction principale de l'intestin est d'assurer la digestion. Cette fonction physiologique permet d'hydrolyser et de solubiliser les nutriments ingérés afin de faciliter leur transport à travers la muqueuse intestinale. Au cours du processus de digestion, les protéines sont hydrolysées en peptides et acides aminés, les lipides en acides gras libres et les glucides digestibles en sucres simples. Le fractionnement des macronutriments est rendu possible grâce à la production d'enzymes sécrétées par les organes du tractus gastro-intestinal. Chez les poissons à estomac comme la truite arc-en-ciel, la sécrétion endocrine d'acide chlorhydrique par certaines cellules (cellules calciformes et cellules oxyntiques) ou par des glandes gastriques constitue la première étape de la digestion. Le milieu acide de l'estomac dont le pH varie entre 1 et 5, joue un rôle essentiel dans l'activation des enzymes protéolytiques. Ainsi, la pepsine, qui est initialement produite sous forme inactive appelée pepsinogène, est activée et convertie en pepsine dans un environnement acide. Elle peut alors fractionner les protéines et les polypeptides. Le chyme, qui est composé d'aliments partiellement dégradés, est ensuite acheminé vers l'intestin médian et les caeca pyloriques, où il se mélange avec des pro-enzymes exocrines sécrétées par le pancréas *via* des canaux pancréatiques ou biliaires. Certaines enzymes comme l'alpha-amylase et la phospholipase, peuvent être sécrétées sous forme active tandis que d'autres telles que la pro-carboxypeptidase et la pro-colipase doivent être activées dans la lumière intestinale par les entérokinases. Les entérokinases activent également le trypsinogène en trypsine. Dans cette partie de l'intestin, le pH est alcalin (7 à 9) et est réajusté par la sécrétion d'électrolytes tels que le bicarbonate, contenu notamment dans la bile produite par le foie et stockée dans la vésicule biliaire (**Figure 8, p. 53**). La bile possède également des propriétés détergentes et émulsifiantes. La sécrétion de la bile et des enzymes pancréatiques dans la lumière intestinale est commandée par l'entrée du chyme dans l'intestin. Les nutriments fractionnés et solubilisés lors du processus de digestion sont ensuite transportés ou absorbés à travers la bordure en brosse des entérocytes (Bakke et al., 2010; Volkoff and Rønnestad, 2020).

Chez les poissons, les **acides aminés** et **peptides** sont majoritairement absorbés par transports passif et actifs, et de manière négligeable par la voie paracellulaire (Debnath and Saikia, 2021). Des transporteurs actifs spécifiques aux acides aminés et aux petits peptides ont été mis en évidence chez les téléostéens mais les mécanismes d'absorption qui leur sont associés sont encore mal connus. On trouve néanmoins des transporteurs de type « *solute carrier* » qui permettent l'absorption des acides aminés couplés ou non à des échanges ioniques, ainsi que des transporteurs d'oligopeptides comme PepT1 et SLC15. Une fois absorbés, les oligopeptides peuvent être hydrolysés en acides aminés au sein de la cellule ou laissés intacts puis exportés. Les poissons carnivores comme la truite, ont un taux d'absorption des acides aminés plus élevé que les espèces omnivores et herbivores. Cette caractéristique est notamment liée à la taille de leur intestin qui est plus court, réduisant ainsi le temps

de présence des nutriments dans l'intestin. Chez les salmonidés, l'absorption des peptides et des acides aminés suit un gradient décroissant entre les parties antérieures et postérieures de l'intestin. Ainsi, les petits peptides et les acides aminés sont absorbés rapidement dans la partie antérieure de l'intestin et particulièrement au niveau du caecum pylorique. Les protéines et les gros peptides non hydrolysés sont quant à eux absorbés plus tardivement par endocytose dans la partie distale de l'intestin (Debnath and Saikia, 2021; Verri et al., 2017, 2010).

L'absorption intestinale des **lipides** est encore mal connue chez les poissons mais semble suivre les processus décrits chez les mammifères. L'absorption des lipides est à priori plus lente chez les espèces aquatiques que chez les mammifères terrestres (Olsen, 1997). Chez la truite arc-en-ciel, l'absorption des lipides se déroule essentiellement dans le caecum pylorique et l'intestin proximal, mais les taux d'absorption dépendent fortement du nombre d'atomes de carbone et du degré de saturation des acides gras. Les produits de l'hydrolyse des lipides que sont les monoglycérides et les acides gras libres à chaînes courtes (acides gras insaturés et faiblement saturés) sont solubilisés dans des micelles de sels biliaires puis supposément absorbés par les entérocytes par diffusion passive. Une fois entrés dans l'entérocyte, des triglycérides sont synthétisés à partir des monoglycérides dans le réticulum endoplasmique lisse. Les phospholipides sont quant à eux synthétisés par la voie du L- α -glycérophosphate dans le réticulum endoplasmique rugueux. Les triglycérides se lient à des protéines dans l'appareil de Golgi pour former des chylomicrons qui sont exportés avec des lipoprotéines de très faibles densités, par exocytose dans la circulation sanguine où ils rejoindront les tissus adipeux et le foie (Izquierdo et al., 2000; Olsen, 1997; Petit et al., 2007; Tocher, 2003).

Les **monosaccharides** comme le D-glucose et le D-galactose sont obtenus par digestion des glucides alimentaires (polysaccharides) (Kamalam et al., 2017). Chez les poissons carnivores, ils sont principalement absorbés dans la partie antérieure de l'intestin *via* les transporteurs SGLT1/2. Les monosaccharides sont ensuite transportés dans la circulation sanguine par le transporteur GLUT2 et dirigés vers le foie où ils seront stockés sous forme de glycogène (glycogénèse) ou convertis en lipides (lipogénèse), puis utilisés en tant que sources énergétiques par les poissons (Debnath et al., 2021; Polakof et al., 2012).

De manière générale, les **minéraux** sont solubilisés dans le mucus intestinal ce qui permet de faciliter leur absorption. La plupart des éléments traces traversent l'épithélium intestinal *via* des transporteurs spécialisés (*Cu transporter 1* pour le cuivre ; *divalent-metal transporter* et *ferroportine* pour le fer ; *ZnT* et *ZrT/IRT* pour le zinc). Certains micro-minéraux, tels que sélénium et le zinc, peuvent se lier à des acides aminés (chélation) et entrer dans les entérocytes par le biais de transporteurs spécifiques des acides aminés. L'iode est quant à lui principalement absorbé au niveau branchial. En

effet, 80 % des apports en iode proviennent de l'eau, 19 % de l'alimentation et 1 % de la dégradation des hormones thyroïdiennes. Le phosphore est absorbé au niveau intestinal par des cotransporteurs sodium-phosphore. L'absorption intestinale du calcium et du magnésium semble être régulée par des transporteur situés sur la face apicale des entérocytes. Une fois dans la circulation sanguine et lorsqu'ils ne sont pas utilisés par les tissus périphériques, les minéraux sont généralement métabolisés dans le foie et excrétés par la bile, par les urines *via* les reins ou par les fèces. Chez les poissons, l'absorption intestinale des **vitamines** reste peu décrite dans la littérature. Néanmoins, certaines d'entre elles sont supposées passer la barrière intestinale par diffusion (vitamines hydrosolubles : acide ascorbique, riboflavine, biotine, acide folique) ou par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques saturables (vitamines liposolubles : A, D, E, K ; caroténoïdes) (Bakke et al., 2010; Lall and Kaushik, 2021; Prabhu et al., 2016).

2. Le système immunitaire des poissons téléostéens

Au même titre que les vertébrés supérieurs tels que l'Homme et la souris, les poissons téléostéens sont capables de répondre à des substances étrangères ou de faire face à des pathogènes *via* des défenses impliquant des fonctions immunitaires régies par deux systèmes : le système inné impliqué dans la réponse immédiate non spécifique et le système adaptatif responsable de la réponse spécifique acquise. Les fonctions innées et acquises interagissent entre elles mais impliquent toutefois des facteurs cellulaires et humoraux spécifiques à chaque système.

a. L'immunité innée

Le **système immunitaire inné** constitue la première ligne de défense des organismes vivants lors d'une attaque pathogène ou d'un stress infectieux. Les fonctions innées réagissent immédiatement et ne sont pas induites pas des liaisons spécifiques, c'est-à-dire qu'elles sont indépendantes des antigènes des agents infectieux. L'immunité innée est composée d'une ligne de défense externe qui comprend des barrières physiques telles que la peau et les muqueuses, mais aussi le mucus sécrété par la peau et l'intestin par le biais des cellules caliciformes. La peau et les muqueuses empêchent l'entrée des agents pathogènes dans l'organisme et le mucus permet de les piéger et de les évacuer dans le cas d'une infection gastro-intestinale. La ligne de défense interne implique quant à elle des facteurs cellulaires et

humoraux qui empêchent la prolifération des agents infectieux et induisent leur élimination (Cain and Swan, 2010; Mokhtar et al., 2023).






Médiateurs cellulaires et récepteurs impliqués dans l'immunité innée

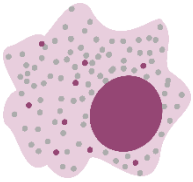
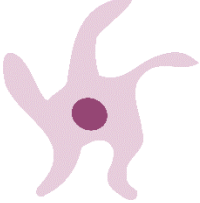

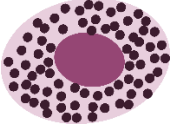

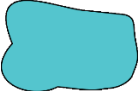
L'immunité innée des vertébrés est médiée par des **récepteurs de type PRR** « *Pattern Recognition Receptor* » exprimés à la surface des cellules immunitaires. Parmi ces récepteurs figurent les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs RIG-I-like. Ces récepteurs ont la capacité de détecter des motifs moléculaires connus sous le nom de PAMP « *Pathogen Associated Molecular Patterns* », qui sont des signaux caractéristiques des microorganismes pathogènes et parmi lesquels figurent les lipopolysaccharides des bactéries gram négatives et les peptidoglycanes des bactéries gram positives. Ces récepteurs sont également capables de reconnaître des toxines et des motifs chimiques appelés DAMP « *Danger Associated Molecular Pattern* » et produits par exemple, par des cellules ou des tissus endommagés. Chez la truite arc-en-ciel, la diversité des récepteurs TLR (TLR1, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR22) est une conséquence des multiples événements de duplication du génome des salmonidés (Rebl et al., 2010). Cette diversité offre une multiplicité de liaisons et de réponses possibles face à des agents pathogènes. Lorsque qu'un PAMP ou un DAMP est reconnu par un PRR, les fonctions immunitaires innées sont induites *via* l'activation de facteurs de transcription et de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et les voies immunitaires. Cela se traduit par exemple, par l'activation de la voie NF- κ B, la stimulation de gènes codant pour les médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines, les interférons et le facteur de nécrose tumorale, mais aussi la maturation et l'activation de cellules immunitaires telles que les leucocytes (Dalmo and Børgwald, 2022; Tort and Balasch, 2022).

Les cellules impliquées dans l'immunité innée sont principalement composées de différentes populations de leucocytes (**Tableau 9, p. 60**). Les **monocytes** sont des leucocytes circulants qui se différencient en macrophages lorsqu'ils colonisent des tissus ou des organes. Ils représentent moins de 1 % des leucocytes chez les poissons et leur présence a été démontrée chez peu d'espèces. Présents chez la daurade royale, ils sont quasiment absents chez la carpe de roseau (*Ctenopharyngodon idella*). Les **macrophages** sont des cellules immunitaires multifonctionnelles fixes ou mobiles. Ils représentent les principales cellules phagocytaires de l'immunité innée. Ils sont impliqués dans la dégradation d'antigènes, le remodelage des tissus abimés, la production de médiateurs inflammatoires (chimiokines et cytokines) et la production de facteurs de croissance. Néanmoins, et au même titre que les cellules dendritiques des poissons, les macrophages sont également considérés comme des cellules présentatrices d'antigènes « *antigen-presenting cells* » (APC) (Mokhtar and Abdelhafez, 2021). Les APC sont capables de présenter des antigènes ayant été internalisés dans les cellules lors de l'endocytose ou

de la phagocytose, faisant intervenir des complexes de reconnaissance appelés complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC). Les antigènes sont essentiellement présentés aux lymphocytes T qui initient la réponse immunitaire adaptative. Les **granulocytes** sont des cellules à granules plus ou moins abondantes chez les poissons. Les **neutrophiles** représentent la sous-population de granulocytes la plus abondante (jusqu'à 25% des leucocytes) chez les téléostéens. Ces cellules mobiles sont les premières à se diriger vers les sites d'inflammation ou infectés. Leurs granules sont composées d'enzymes telles que la myéloperoxydase et le lysozyme, capables de dégrader les agents microbiens lors de la dégranulation des granules cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire. Les **éosinophiles** sont des granulocytes possédant à leur surface des récepteurs à chimiokines dont la fixation induit une migration des éosinophiles vers le site de l'inflammation ou parasité. Cette sous-population est rare, voire absente chez la truite arc-en-ciel mais est présente chez d'autres espèces de salmonidés comme le saumon Atlantique (entre 17 et 20 % des leucocytes). Les **basophiles** sont également rarement rencontrés chez les poissons. Ils sont supposés interagir avec les lymphocytes T en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Les **thrombocytes** sont en revanche bien présents chez les poissons mais leurs fonctions sont encore mal connues. Chez les téléostéens ces cellules sont supposées être impliquées dans la phagocytose en milieu sanguin, dans la coagulation et pourraient se comporter comme des APC. Les **cellules à bâtonnets « rodlet cells »** sont exclusivement retrouvées chez les poissons téléostéens. Ces cellules sont majoritairement impliquées dans les infections parasitaires et potentiellement dans la réparation des tissus endommagés et la lubrification. Comme leur nom l'indique, elles contiennent des structures en forme de bâtonnets dans leur cytoplasme. Ces petits bâtonnets possèdent des activités enzymatiques protéolytiques (peroxydase) et sont expulsés dans le milieu extracellulaire en présence d'un parasite. Les **mastocytes** des poissons ont des fonctions identiques à ceux des mammifères et sont impliqués dans la génération de médiateurs inflammatoires tels que les chimiokines et les cytokines (Abós et al., 2022; Mokhtar and Abdelhafez, 2021).

Tableau 9 Principales populations de leucocytes impliqués dans l'immunité chez les poissons téléostéens (Mokhtar and Abdelhafez, 2021).

Type cellulaire	Biologie et principales fonctions
<p>Neutrophiles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Noyau irrégulier et segmenté • Principales sous-populations de granulocytes (25% des leucocytes) • Cellules mobiles dont les granules sont composées d'enzymes qui dégradent les agents microbiens
<p>Eosinophiles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Noyau lobé • Cellules mobiles possédant des récepteurs membranaires à chimiokines • Sous-population rare, voire absente chez la truite arc-en-ciel
<p>Basophiles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Noyau irrégulier • Potentiellement impliqués dans la présentation d'antigène chez les poissons
<p>Lymphocytes</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Noyau rond occupant quasiment toute la cellule • Principales sous-populations de leucocytes (70 à 90 % des leucocytes totaux) • 3 types chez les poissons : <ul style="list-style-type: none"> Lymphocytes B : médiateurs de l'immunité humorale, interagissent avec les cellules présentatrices d'antigènes, sécrètent des immunoglobulines (IgM, IgD, IgZ/T), possèdent des fonctions phagocytaires Lymphocytes T : médiateurs de l'immunité cellulaire, interagissent avec les cellules présentatrices d'antigènes <i>via</i> MHCI et MHCII NK-like/NCC : provoquent l'apoptose spontanée des virus, des bactéries et des parasites <i>via</i> la sécrétion d'enzymes
<p>Monocytes</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Noyau en forme de rein • Cellules circulantes qui se différencient en macrophages lorsqu'elles colonisent des tissus ou des organes • Présents chez peu d'espèces

<p>Macrophages</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Morphologie variée • Cellules multifonctions principalement impliquées dans la phagocytose et dans la présentation d'antigènes • Forment des agrégats pigmentés appelés mélano-macrophages
<p>Cellules dendritiques</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Morphologie variée avec prolongements cytoplasmiques appelés dendrites • Cellules principalement impliquée dans la présentation d'antigènes et la phagocytose
<p>Cellules à bâtonnets</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Présence de structures en forme de bâtonnets dans leur cytoplasme • Exclusivement retrouvées chez les poissons téléostéens • Principalement impliquées lors d'infections parasitaires et potentiellement dans la réparation des tissus endommagés et la lubrification
<p>Mastocytes</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Présence de nombreuses granules cytoplasmiques • Impliqués dans la génération de médiateurs inflammatoires tels que le chimiokines et le cytokines
<p>Thrombocytes</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules allongées, fusiformes • Potentiellement impliqués dans la coagulation sanguine en agissant comme des plaquettes
<p>Cellules caliciformes</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules impliquées dans la production de mucus

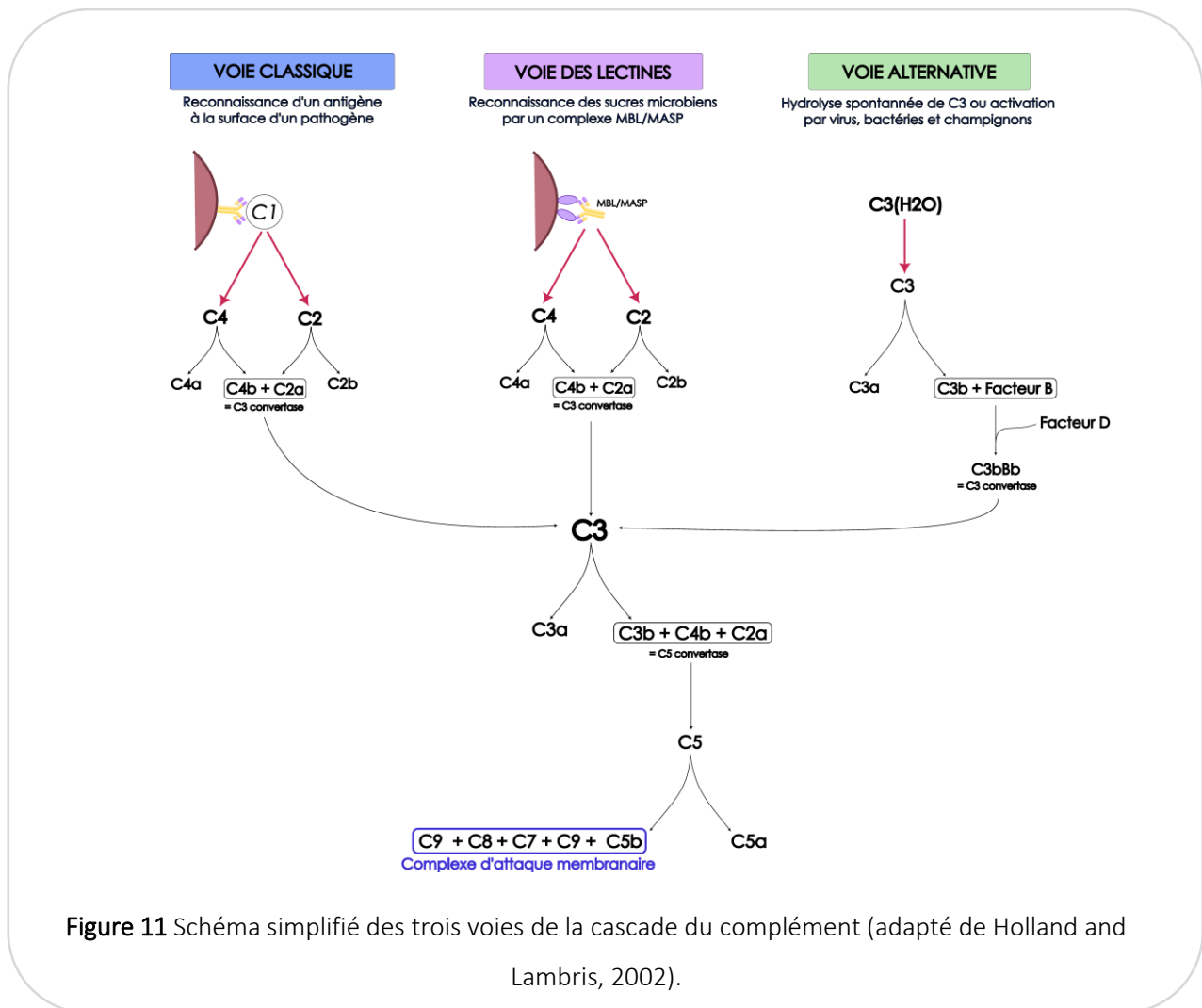
Médiateurs humoraux de l'immunité innée

La réponse immunitaire innée des poissons fait également intervenir des médiateurs humoraux présents dans le sang, le mucus et sur les surfaces épithéliales. Ces médiateurs sont impliqués dans l'élimination des agents pathogènes et jouent un rôle dans l'induction de réactions cellulaires et inflammatoires (Cain and Swan, 2010; Dalmo and Bøggwald, 2022; Lieschke and Trede, 2009).

Parmi ces médiateurs humoraux, le **système du complément** joue un rôle important. Ce système fait intervenir une cascade enzymatique au cours de laquelle les protéines sont activées par clivages successifs. Chaque protéine clivée joue alors un rôle dans le clivage de la protéine suivante. Chez les mammifères, la cascade implique 35 protéines produites par les hépatocytes et relarguées dans la circulation sanguine. Chez les poissons téléostéens, on retrouve des protéines homologues mais toutes les protéines de la cascade du complément des mammifères n'ont pas été identifiées. Le complément est activé à partir de trois voies distinctes : la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines (**Figure 11, p. 63**). La voie classique est induite par la reconnaissance spontanée d'un pathogène (dans le cadre de l'immunité innée) ou par liaison d'un anticorps spécifique à la surface d'un pathogène (dans le cadre de l'immunité adaptative). La voie alternative est induite par l'hydrolyse spontanée de la molécule C3 et fait entrer en jeu les facteurs B et D. Quant à la voie des lectines, cette dernière répond à la présence de mannoses, molécules que l'on retrouve à la surface de certains pathogènes. Cette activation fait appel au complexe MBL (*mannose-binding lectine*) - MASP (*MBL associated serine protease*). Les composants des trois voies activent de manière commune la molécule C3 qui représente le facteur pivot de la cascade du complément. Le clivage de la molécule C3 conduit ensuite à la formation d'un complexe d'attaque membranaire composé des molécules C5b, C6, C7, C8 et C9 et impliqué dans les mécanismes d'élimination directe des pathogènes mais également dans le recrutement des lymphocytes B et des macrophages (Boshra et al., 2006; Holland and Lambris, 2002).

Le **lysozyme** constitue un autre médiateur humoral. C'est une protéine sanguine impliquée dans l'élimination des bactéries pathogènes. Le lysozyme, produit et sécrété par les granulocytes et les monocytes, est retrouvé dans le sang, le mucus et au niveau des tissus épithéliaux. Chez les poissons, il est connu que le lysozyme agit contre les bactéries gram positives et gram négatives et possède une activité lytique sur les parois composées de peptidoglycanes (Watts et al., 2001). Chez la truite arc-en-ciel, on retrouve le lysozyme dans le plasma, le mucus de la peau et de l'intestin, le foie et également aux niveaux du rein et des branchies (Saurabh and Sahoo, 2008). Chez les poissons, les concentrations en lysozyme varient en fonction de l'espèce, de l'âge, du sexe et du stade de vie. Chez la truite arc-en-ciel, les niveaux plasmatiques de lysozyme se situent entre 600 et 1 000 unités/mL, alors qu'ils ne sont que de 270 à 350 unités/mL chez le bar Européen, 29,4 unités/mL chez la daurade Japonaise (*Pagrus*

major) et 76,3 unités/mL chez l'anguille Japonaise (*Anguilla japonica*) (Table 2, Saurabh and Sahoo, 2008).



Les **protéines de phase aiguë** sont un groupe de protéines produites rapidement par l'organisme en réponse à une inflammation, une infection ou un traumatisme. Ces protéines sont principalement produites par les leucocytes hépatiques et sont sécrétées dans le sang à l'occasion d'une blessure ou lors d'une infection par un agent pathogène. Leur production et leur libération sont induites par des signaux moléculaires proinflammatoires tels que l'interleukine 1, l'interleukine 6 et le TNF- α . Ces protéines induisent la voie du complément mais sont également impliquées dans l'activation de l'opsonisation, l'induction de la phagocytose et la réparation des tissus (Bayne and Gerwick, 2001). Les pentraxines, les protéines sériques amyloïdes, la transferrine et l'alpha-2-macroglobuline font partie des protéines de phase aiguë identifiées chez les poissons et en particulier chez la truite arc-en-ciel (Gerwick et al., 2007; Jensen et al., 1995; Raida and Buchmann, 2009), le saumon Atlantique (Jensen et

al., 1997; Jørgensen et al., 2000; Krasnov et al., 2021; Lund and Olafsen, 1999), le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) (Lund and Olafsen, 1998; Park et al., 2005), la plie commune (*Pleuronectes platessa*) (Baldo and Fletcher, 1973; White et al., 1981) et la daurade royale (Davey et al., 2011; Isani et al., 2011). Les pentraxines sont une catégorie de protéines de phase aiguë comportant la protéine C-réactive (CRP). Chez les humains, la CRP est un marqueur de l'inflammation dosé dans le plasma et est conservée chez la plupart des vertébrés dont les poissons. Chez les mammifères, ses fonctions sont associées à l'activation de la voie du complément, l'opsonisation des bactéries et des pathogènes et l'induction de la production d'immunoglobulines (Hoole et al., 2003). La transferrine est produite par les hépatocytes. Son rôle est de capter le fer absorbé par l'intestin et de le transporter vers le foie. Chez les mammifères, la fixation du fer par la transferrine permet de diminuer la prolifération de certaines bactéries comme *Escherichia coli* (Vaulont and Schalk, 2015).

Les **cytokines** constituent d'autres médiateurs cellulaires et leur rôle est de guider les cellules immunitaires vers les sites d'inflammation ou infectés. Elles sont sécrétées par les cellules impliquées dans l'immunité innée et dans l'immunité adaptative. Elles interviennent dans de nombreuses fonctions régulatrices comme par exemple l'activation des cellules immunitaires. La majeure partie d'entre elles est conservée entre les mammifères et les poissons. Chez les poissons, on retrouve principalement sept grandes familles de cytokines : les interleukines 1, les interleukines 10, les interleukines 17, les interleukines 2, les chimiokines, les interférons et les facteurs de nécrose tumorale. Dans la famille des cytokines proinflammatoires on retrouve les interleukines 1 telles que l'IL1- β qui est impliquée dans l'activation des lymphocytes et des phagocytes, ainsi que les interleukines-6 (IL-6), les interleukines 11 et le facteur neurotrophique ciliaire CNTF-like qui intervient dans l'hématopoïèse (production de cellules sanguines) et l'induction de la prolifération des phagocytes. La production de l'IL1- β est induite par la reconnaissance des PAMPS et des DAMPS par des PRR, et sa présence dans le milieu extracellulaire agit comme chimio-attractant pour les cellules immunitaires (Zou and Secombes, 2016). Les facteurs de nécrose tumorale (TNF) appartiennent également à la famille des cytokines proinflammatoires et sont principalement représentés par TNF- α chez les poissons. Cette cytokine est impliquée dans les mouvements de leucocytes et dans les fonctions apoptotiques des cellules NCC « *non specific cytotoxic cells* ». A l'inverse, la famille des interleukines 10 est constituée de cytokines anti-inflammatoires. Elle est composée de l'IL-10, l'IL-19/20, l'IL-22 et de l'IL-24 qui participent à l'atténuation de l'inflammation et de l'INFN- γ qui intervient dans la réponse aux infections virales (Robertsen, 2006). Les poissons possèdent plusieurs interleukines de la famille IL-17, notamment IL-17A/F1, IL-17A/F2, IL-17A/F3, IL-17C, IL-17D et IL-17N. Ces cytokines jouent un rôle dans l'induction de l'expression d'autres interleukines notamment TNF- α , IL1- β et IL-6. De plus, elles sont susceptibles d'activer les phagocytes, de stimuler la voie NF κ B (« *nuclear factor κ B* » qui régule la transcription de

gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation), d'induire l'expression de certaines chimiokines (en particulier CXCL-8 chez la truite arc-en-ciel) et de réguler l'expression de peptides antimicrobiens tels que la β -défensine. Les interleukines 2 sont également présentes chez les poissons mais leurs fonctions sont encore mal connues (Sakai et al., 2021). La famille de chimiokines regroupe quant à elle des médiateurs cellulaires directement produits sur les sites d'inflammation. Elles sont responsables du mouvement des leucocytes et de la différenciation des cellules recrutées. De nombreuses chimiokines ont été identifiées chez les poissons. On compte une centaine de chimiokines chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) dont CXCL8 et CXCL11. De son côté, la truite arc-en-ciel exprime entre autres l'IL-8, CXCL14 et CXCL10 (Alejo and Tafalla, 2011). Les interférons sont une famille de cytokines produits lors d'un signal inflammatoire induit par une infection virale ou bactérienne, ou en présence de LPS. Chez les mammifères et les poissons, les interférons de type I tels que l'INF- α jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire innée contre les virus. En revanche, les interférons de type II, notamment l'interféron gamma (INF- γ), sont principalement impliqués dans la lutte contre les infections bactériennes. Chez les mammifères, l'INF- γ est produit par les cellules NK de l'immunité innée mais aussi par les lymphocytes T CD4 et CD8 de l'immunité adaptative (Cao et al., 2023). Chez les poissons, sa sécrétion stimule l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les réactions inflammatoires et la production de protéines antivirales qui dégraderont et inhiberont la transcription de l'ARN viral. C'est notamment le cas des protéines Mx chez le saumon Atlantique et le cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*) (Cain and Swan, 2010).

b. L'immunité adaptative

Le **système immunitaire acquis ou adaptatif** est quant à lui dépendant et spécifique des antigènes des agents infectieux et répond plus lentement que le système immunitaire inné. Il permet aux organismes d'acquérir une mémoire immunitaire qui leur sera bénéfique dans le cas de réinfection par un agent pathogène identique. Ce système est propre aux vertébrés et est essentiellement régi par des populations de leucocytes agranulaires spécifiques, caractérisées par la faible présence voire l'absence de granules cytoplasmiques. Au même titre que chez les vertébrés supérieurs, les lymphocytes sont les cellules les plus abondantes chez les poissons (70 à 90 % des leucocytes). Chez les téléostéens, on distingue trois sous-populations de lymphocytes : les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK-like « Natural Killer » et NCC « *non specific cytotoxic cells* ». Elles représentent le pilier de la réponse adaptative. Les lymphocytes B et T sont des cellules-clés impliquées dans la

reconnaissance d'antigènes spécifiques *via* des récepteurs propres à chaque population cellulaire (Lieschke and Trede, 2009; Mokhtar and Abdelhafez, 2021) (**Tableau 9, p. 60**).

Les **lymphocytes B** sont des médiateurs de la réponse humorale contre les virus, les bactéries et les parasites. Leurs récepteurs appelés BCR pour *B-cell receptors* sont retrouvés sous forme fixe à la surface des lymphocytes ou sous forme libre (anticorps) dans le milieu extracellulaire. L'activation des lymphocytes B se fait par la liaison des BCR à un antigène libre ou présenté par une cellule présentatrice d'antigènes. Une fois activées, ces cellules sécrètent des anticorps spécifiques dirigés contre le pathogène à éliminer ou se différencient en lymphocytes B mémoires qui répondront de manière spécifique dans le cas d'une seconde exposition à l'agent pathogène. A l'inverse des lymphocytes B des mammifères, les lymphocytes B des poissons sont également dotés de la capacité à phagocyter des agents pathogènes par opsonisation. Les lymphocytes B sécrètent des anticorps spécifiques appelés **immunoglobulines**. Il en existe trois formes chez les téléostéens : les immunoglobulines M, D et Z/T. Les immunoglobulines M (IgM) ont été les premières immunoglobulines à avoir été identifiées chez les poissons. Elles abondent dans le plasma et le mucus sous forme libre, et sont retrouvées à la surface des lymphocytes B. Les IgM ont un rôle dans l'activation de la voie du complément et induisent les activités phagocytaires par opsonisation. Les immunoglobulines D (IgD) sont également présentes chez les poissons téléostéens comme le saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel. Cependant, leurs fonctions sont encore mal connues chez les poissons. Les immunoglobulines Z/T (IgZ/T) sont des types d'anticorps spécifiques des poissons osseux tels que le poisson zèbre (IgZ) et la truite arc-en-ciel (IgT). Elles jouent un rôle important dans les réponses immunitaires des muqueuses, notamment dans le mucus où elles constituent une première ligne de défense contre les agents pathogènes qui tentent de pénétrer dans l'organisme (Abós et al., 2022; Kaattari, 1992).

Les **lymphocytes T** possèdent des récepteurs spécifiques appelés TCR pour *T-cell receptors* en anglais. Ces récepteurs sont toujours présents sous forme fixée à la membrane des lymphocytes T. Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T réagissent à des antigènes présentés par des cellules présentatrices d'antigènes *via* les complexes majeurs d'histocompatibilité de type I (MHCI) et de type II (MHCII), dont la liaison active les réponses adaptatives cellulaires. Chez les téléostéens, il existe deux sous-populations de lymphocytes T dont la différenciation est induite par des cytokines générées par les APC. Ces cytokines comprennent notamment les interleukines et les interférons. Les lymphocytes T CD8 interagissent avec le complexe MHCI et ont des fonctions cytotoxiques permettant de détruire directement les cellules cibles. Les lymphocytes T CD4 réagissent quant à eux avec le complexe majeur d'histocompatibilité de la classe II (MHCII) et peuvent activer d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes B. Ils peuvent également induire la production de cytokines qui permet la différenciation d'autres lymphocytes T (Abós et al., 2022; Cao et al., 2023).

Chez certaines espèces de poissons téléostéens comme la barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*), le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel, on retrouve également des cellules homologues aux **lymphocytes NK** (*Natural Killer*) des mammifères. Les **cellules NK-like** et **NCC** pour « *non specific cytotoxic cells* » en anglais, sont impliquées dans l'induction de l'apoptose spontanée des virus, des bactéries ou des parasites en les détruisant par un mécanisme de lyse. Ce processus implique principalement des enzymes telles que les perforines et les granzymes dont le mode d'action est supposé être similaire à celui décrit chez les mammifères (Hay and Slansky, 2022).

c. Les tissus lymphoïdes

Par définition, les tissus lymphoïdes regroupent des organes où résident les lymphocytes et d'autres cellules immunitaires. Chez les mammifères comme chez les poissons, les tissus lymphoïdes sont catégorisés en organes primaires et secondaires. Chez les téléostéens, le thymus et la partie antérieure du rein sont considérés comme les principaux organes lymphoïdes et hématopoïétiques (**Figure 8, p. 53**). Ils sont spécialisés dans la maturation et le stockage des cellules immunitaires. De par ses fonctions, le rein des poissons est par ailleurs assimilé à la moelle osseuse des mammifères. Ces deux tissus comportent de nombreuses populations de leucocytes dont les lymphocytes T CD4 et CD8, les lymphocytes B, les mélanomacrophages mais également des cellules à mucus et des cellules à bâtonnets. Chez les salmonidés, la rate et la bursa représentent des organes lymphoïdes secondaires (**Figure 8, p. 53**). La pulpe rouge de la rate est composée de cellules endothéliales tandis que la pulpe blanche comporte des macrophages et des lymphocytes T. De par sa structure, la rate est donc considérée comme un organe filtreur permettant à l'organisme de se débarrasser des cellules endommagées, des pathogènes et des toxines. La bursa a une structure analogue aux glandes de Fabricius des oiseaux et est décrite comme un organe riche en cellules immunitaires enveloppées par des cellules épithéliales. Chez les oiseaux, les glandes de Fabricius sont le site principal de développement des lymphocytes B. Chez les poissons, les fonctions de la bursa sont encore mal connues (Buchmann and Secombes, 2022).

d. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

Chez les mammifères, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, aussi appelés MALT pour *Mucosal Associated Lymphoid Tissue* en anglais, représentent l'ensemble des structures non

encapsulées dans des organes et composées de cellules et de structures lymphoïdes. Ces structures sont dotées de fonctions immunitaires innées et adaptatives et répondent localement à des attaques pathogènes ou chimiques. On retrouve des sites inducteurs (sites de stimulation des lymphocytes naïfs par un antigène) tels que les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes ainsi que des sites effecteurs (sites où les cellules immunitaires réagissent) tels que les épithéliums et la *lamina propria*. Chez les poissons téléostéens, l'utilisation du terme « MALT » reste controversée puisque les tissus associés sont moins organisés que ceux des mammifères. Par exemple, les poissons ne possèdent ni plaques de Peyer qui représentent le centre germinal des lymphocytes B et T naïfs chez les mammifères, ni ganglions lymphatiques. Il est néanmoins suggéré que les structures appelées mélanomacrophages qui sont des agrégats pigmentés de macrophages présents principalement dans le rein, la rate et le foie, pourraient jouer un rôle similaire à celui des centres germinaux situés dans les ganglions lymphatiques des mammifères et des oiseaux (Agius and Roberts, 2003; Steinel and Bolnick, 2017).

Bien que l'immunité mucoale des poissons semble être plus primitive que celle des mammifères, les poissons possèdent néanmoins de nombreuses cellules immunitaires au niveau de leurs épithéliums muqueux, qui semblent impliquées à la fois les fonctions inductrices et effectrices de l'immunité mucoale. Ces populations cellulaires sont présentes de manière diffuse dans les épithéliums. Chez les poissons téléostéens, on retrouve plusieurs catégories de « MALT » diffus : le SALT « *Skin Associated Lymphoid Tissue* » situé sur la peau, le NALT « *Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue* » associé au nasopharynx ainsi que le GALT « *Gut-Associated Lymphoid Tissue* » retrouvé au niveau de la muqueuse intestinale. Le GIALT « *Gill-Associated Lymphoid Tissue* » situé à la surface des branchies fait exception chez les salmonidés car il est considéré comme un tissu lymphoïde organisé au même titre que chez les mammifères. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement au **GALT** des téléostéens.

A l'inverse des mammifères qui possèdent des structures lymphoïdes organisées au sein des épithéliums, le GALT des téléostéens est exclusivement constitué de réseaux diffus au niveau de la muqueuse intestinale et plus particulièrement dans la *lamina propria*. On y retrouve des populations cellulaires composées de lymphocytes B, de lymphocytes T, de cellules dendritiques, de macrophages et de granulocytes. Ces leucocytes sont impliqués dans les attaques pathogènes et interagissent avec le microbiote intestinal. Au même titre que les autres MALT, le GALT des poissons sécrète du mucus qui participe également à l'immunité mucoale de l'intestin. Il constitue d'une part une barrière physique permettant d'éliminer les pathogènes en les piégeant et d'autre part, une barrière chimique contre les pathogènes puisqu'il est riche en facteurs humoraux tels que des cytokines, des peptides antimicrobiens, du lysozyme, des protéases, des peptides antimicrobiens et des anticorps (Salinas, 2015; Stosik et al., 2023).

3. Les facteurs nutritionnels modulant l'immunité et la santé des poissons

a. Le jeûne

Dans leur milieu naturel, les poissons sont épisodiquement exposés à des périodes de privation alimentaire de plusieurs mois au cours de la migration, de la reproduction ou de la saison hivernale (Martin and Król, 2017a). Dans un contexte d'élevage, la mise à jeun des poissons est généralement plus courte et s'étend sur quelques jours à quelques semaines. Elle est recommandée en cas d'épizootie ou en prévision de manipulations exposant les animaux à un stress. En effet, une période de privation alimentaire permet de réduire l'utilisation énergétique dédiée à la digestion et au métabolisme nutritionnel, au profit des fonctions vitales de l'organisme comme le maintien de l'homéostasie cellulaire et les fonctions immunitaires. Elle est également pratiquée par les éleveurs pour induire une croissance compensatoire qui engendre une augmentation de gain de poids suite à la restriction alimentaire (Py et al., 2022).

Chez les poissons, le jeûne n'est pas sans conséquences sur le métabolisme (Black and Skinner, 1986; Chen and Luo, 2023), le microbiote intestinale (Xia et al., 2014), la physiologie digestive et hépatique (Bar, 2014; Krogdahl and Marie Bakke-McKellep, 2005; Martin et al., 2001) ou encore l'immunité (Martin and Król, 2017a). Concernant les impacts du jeûne sur l'immunité, les études conduites chez les poissons se sont plus particulièrement focalisées sur l'application de périodes de jeûne pour la prévention de maladies. En effet, la privation alimentaire avant une infection pathogène peut réduire la mortalité des animaux. C'est notamment ce qui a été observé chez la barbotte de rivière (Lim and Klesius, 2003), le tilapia du Nil (Wang et al., 2019) et le saumon Atlantique (Damsgard et al., 2004). Damsgard et al. ont évalué les conséquences du jeûne sur la mortalité du saumon Atlantique exposé à une infection par *Vibrio salmonicida*. Les résultats indiquent que le taux de survie au cours des 4 semaines qui suivent l'infection est considérablement plus élevé chez les poissons maintenus à jeun après l'infection (98,8 %) par rapport à ceux nourris (65,4 %). Selon les auteurs, l'hypothèse retenue serait que la privation de nourriture entraîne une indisponibilité de certains nutriments essentiels à la croissance de la bactérie, comme par exemple le fer, ce qui aurait pour conséquence de freiner l'infection (Damsgard et al., 2004). Une autre étude a évalué la réponse du transcriptome hépatique de saumons Atlantique mis à jeun ou nourris en amont d'une infection par *Aeromonas salmonicida* (Martin et al., 2010). Avant l'infection et comparés aux saumons nourris, les poissons à jeun présentaient une sous-expression de nombreux facteurs immunitaires incluant des peptides antimicrobiens, le facteur B du complément et une protéine de phase aigüe sérique, l'amyloïde A-5. L'infection de ces poissons a

entraîné une surexpression de gènes codant pour des protéines de phase aigüe, telles que l'albumine, les globines et les apolipoprotéines, ce qui suggère que l'énergie de l'organisme a été réorientée vers les fonctions immunitaires pour combattre l'infection.

Comme indiqué précédemment, les muqueuses sont impliquées dans les fonctions immunitaires chez les poissons et leurs réponses sont étroitement liées au statut nutritionnel des animaux et donc, au jeûne. Ainsi, une étude conduite sur le poisson-chat bleu (*Ictalurus furcatus*) (Li et al., 2014) démontre que le jeûne peut affecter l'expression du gène iNOS2b. Ce gène est associé à la production d'oxyde nitrique et représente un marqueur de l'induction de l'activité phagocytaire. Chez cette espèce, le jeûne a également influencé l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (chimiokines, molécules du complément, interférons et précurseurs de sélénoprotéines), dans la prolifération des cellules caliciformes et la synthèse de mucus (mucin-2, mucin-5AC, *anterior gradient protein 2 homolog precursor*) ainsi que dans la structure tissulaire (protéines associées au cytosquelette, myosine, tubuline). Une autre étude conduite sur la barbue de rivière (Liu et al., 2013) indique qu'une courte période de privation alimentaire diminue l'expression dans les branchies et la peau, de iNOS2b, des chimiokines CCL19, CCLC5a, CXCL10 et CXCL11, des interleukines IL-17 et IL-22, du lysozyme, des molécules du complément C1q et C4b, ainsi que du récepteur TLR PGRP6. Le jeûne semble également altérer les défenses de la truite arc-en-ciel. En effet, un jeûne de 4 semaines inhibe l'expression de la protéinase α -1 et de l'élastase leucocytaire. Ces deux protéines sont étroitement liées et jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire et la protection cellulaire. En effet, la fonction principale de la protéinase α -1 est d'inhiber certaines enzymes protéolytiques dont l'élastase leucocytaire. Dans cette étude, le jeûne a aussi réduit l'expression de la transferrine, ce qui peut favoriser le développement des bactéries pathogènes. En effet, la transferrine est impliquée dans le transport du fer. Une réduction de cette protéine augmente la disponibilité du fer au profit des bactéries pathogènes pour lesquelles le fer est indispensable à leur croissance et à leur survie. A l'inverse, la surexpression de la glycoprotéine P et de la cytokératine de type II en réponse au jeûne laisse sous-entendre que le jeûne pourrait diminuer la perméabilité cellulaire au niveau intestinal, car ces protéines sont respectivement impliquées dans le transport des xénobiotiques et le maintien de l'intégrité des cellules épithéliales (Baumgarner et al., 2013).

Le jeûne chez les poissons peut influencer certaines protéines impliquées dans l'adhésion des entérocytes et la perméabilité intestinale, comme par exemple les protéines de jonctions serrées et les claudines. Ceci peut entraîner une perte de contact entre les cellules et une voie d'entrée des pathogènes dans l'organisme (Jutfelt, 2011; Rios et al., 2004). Les cellules caliciformes participent également au maintien de l'homéostasie intestinale, en produisant du mucus. Le mucus facilite le passage des nutriments alimentaires dans le tube digestif et protège la muqueuse intestinale des

composants abrasifs ou de l'entrée de pathogènes. Chez le brochet (*Esox lucius*) et le silure (*Silurus meridionalis*), il a été montré que le nombre de cellules caliciformes dans la muqueuse intestinale diminuait sensiblement lors d'une période de jeûne (Bucke, 1971; Zeng et al., 2012).

Chez les poissons, le jeûne peut également affecter les fonctions immunitaires plasmatiques, suggérant que la privation de nutriments peut induire une défaillance des fonctions immunitaires humorales. En effet, chez certaines espèces de cyprinidés (*Barbonymus schwanenfeldii* et *Carassius auratus*), l'activité plasmatique du complément est sensiblement réduite suite à des jeûnes de courtes ou de longues durées (Eslamloo et al., 2017; Li et al., 2019). La peroxydase plasmatique peut également être induite après quelques jours de jeûne chez les alevins de binni (*Mesopotamichthys sharpeyi*) et chez la daurade royale (Najafi et al., 2014; Pascual et al., 2003). En revanche, certains auteurs suggèrent qu'une privation alimentaire dépassant plusieurs semaines peut fortement diminuer l'activité de cette enzyme en raison d'une fatigue du système antioxydant (Morales et al., 2004). Pour ce qui est du lysozyme, l'effet du jeûne sur son activité est très variable en fonction des espèces, du statut physiologique et de la durée du jeûne (Bowden, 2008). Ainsi, une augmentation de l'activité plasmatique du lysozyme a été observée après une semaine de jeûne chez le barbu de Schwanenfeld (*Barbonymus schwanenfeldii*) (Eslamloo et al., 2017) tandis qu'un jeûne de 43 jours provoque une diminution du lysozyme chez l'esturgeon chinois (*Acipenser sinensis*) (Feng et al., 2011). A l'opposé, un jeûne imposé au bar européen, à la daurade rose (*Pagellus bogaraveo*) et à l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) n'a aucun effet sur l'activité plasmatique du lysozyme (Caruso et al., 2011, 2010). On sait en revanche peu de choses sur l'impact du jeûne sur l'activité des antiprotéases si ce n'est qu'elle augmenterait de manière significative après 21 jours de jeûne chez tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Sakyi et al., 2020). Par ailleurs, les études évoquant l'activité des antiprotéases se concentrent principalement sur d'autres tissus que le sang (Eslamloo et al., 2017; Esteban et al., 2020; Irungbam et al., 2021).

D'autres mécanismes et voies peuvent également être modifiés par le jeûne chez les poissons. Ainsi, Rios et al. ont montré que la privation de nourriture altérait particulièrement les fonctions hématologiques du patagaye (*Hoplias malabaricus*). En effet, après 240 jours de jeûne, ces poissons étaient atteints de thrombocytopenie (baisse du nombre de thrombocytes dans le sang) et présentaient une senescence précoce des érythrocytes, suggérant une profonde altération des fonctions de coagulation (Rios et al., 2005). Chez la truite arc-en-ciel, l'ensemble des gènes hépatiques codant pour des protéines impliquées dans la coagulation sanguine (fibrinogène, plasminogène, récepteur à thrombine et antithrombine) sont sous-exprimés après 3 semaines de jeûne (Salem et al., 2007).

b. Le profil nutritionnel de l'aliment aquacole

Au-delà d'impacter les performances de croissance, un aliment déséquilibré peut entraîner des carences et vulnérabiliser la santé des organismes. Ainsi, la composition nutritionnelle des aliments aquacoles fait partie des facteurs susceptibles de moduler et d'affecter les fonctions immunitaires des poissons (Oliva-Teles, 2012).

Les carences en acides aminés essentiels

Chez les salmonidés, les acides aminés sont impliqués dans le maintien et la stimulation des fonctions immunitaires humorales et cellulaires. Le **glutamate** et la **glutamine** contribuent de façon importante au maintien des défenses de l'organisme. Ces acides aminés jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité du tube digestif en protégeant l'intestin des stress oxydants *via* la synthèse de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase (Andersen et al., 2015). Le glutamate participe à l'activation des lymphocytes T et à la régulation de l'inflammation (Hansen and Caspi, 2010), tandis que la glutamine joue un rôle clé dans le métabolisme des cellules immunitaires (Cruzat et al., 2018).

L'**arginine** est impliquée dans les défenses antioxydantes, la réponse au stress *via* la production d'insuline, ainsi que dans les fonctions immunitaires en tant qu'unique précurseur de l'oxyde nitrique produit par les macrophages (Hoseini et al., 2020). Chez les poissons, l'arginine bénéficie également de propriétés immunostimulantes car elle est impliquée dans la synthèse d'oxyde nitrique. En effet, une étude démontre qu'une supplémentation alimentaire en L-arginine améliore la survie de la barbue de rivière au cours d'une infection bactérienne par *Edwardsiella ictaluri*, suggérant qu'un régime enrichi en arginine permet d'améliorer la résistance de cette espèce *via* une synthèse plus importante d'oxyde nitrique par les macrophages (Buentello and Gatlin, 2001).

Plus qu'associés à des effets sur l'immunité, les carences en **tryptophane**, **histidine** et **méthionine** sont associées à des pathologies telles que des malformations de la colonne vertébrale (scoliose) (Cahu et al., 2003; Sidransky, 2001), un développement de cataractes (Bjerkås and Sveier, 2004; Waagbø et al., 2010) et un développement de stéatoses hépatiques (accumulation de triglycérides dans le foie) (Espe et al., 2010).

Déséquilibre en acides gras polyinsaturés à longue chaîne

Les acides gras polyinsaturés n-3 et n-6, en tant que précurseur de certains composés hormonaux, sont impliqués dans les fonctions immunitaires et les réponses inflammatoires. Les prostaglandines, les

thromboxanes et les leucotriènes sont des eicosanoïdes obtenus suite à l'oxydation d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne tels que l'acide arachidonique (ARA, n-6) et l'EPA (n-3). Ces hormones sont des médiateurs des réponses inflammatoires aux niveaux sanguin et vasculaire. Chez l'Homme, une consommation excessive de graisses animales issues de viande, de beurre ou de fromage est souvent associée à une consommation importante d'ARA. Ce déséquilibre est à l'origine d'une synthèse importante de leucotriènes et de prostaglandines ED (PEG2) qui ont des fonctions proinflammatoires provoquant fièvre et douleurs articulaires. D'autres prostaglandines dérivées de l'EPA comme par exemple PEG3, ont des fonctions anti-inflammatoires. Ainsi, une alimentation composée d'acides gras oméga 3 tel que l'EPA, très présent dans les poissons gras, est susceptible de rééquilibrer la réponse inflammatoire systémique (Yamaguchi et al., 2022). Chez les poissons, le remplacement des huiles de poisson par des huiles végétales déséquilibre le ratio en acides gras n-3/n6 en faveur des acides gras oméga 6. Un ratio faible est responsable de désordres cardiovasculaires et d'une mauvaise résistance aux infections chez les salmonidés (Bell et al., 1993; Thompson et al., 1996). Chez la daurade royale, le remplacement partiel (60 %) de l'huile de poisson par de l'huile végétale (huiles de soja, de colza ou de lin) provoque une immunosuppression comme en témoignent la réduction de l'activité du complément et de l'activité phagocytaire du rein antérieur (Montero et al., 2003, 1998).

La présence des glucides alimentaires

Bien que certaines fonctions cellulaires et humorales soient modulées lorsque des poissons sont nourris avec des régimes riches en glucides, les effets restent variables et inconstants en fonction des espèces (Lall, 2000). Néanmoins, quelques études s'accordent sur le caractère immunomodulateur des régimes riches en glucides chez les poissons (Wang et al., 2014; Zhou et al., 2014). On sait également que la tolérance des poissons carnivores à des régimes riches en glucides alimentaires est plus faible que celle des espèces herbivores ou omnivores. Chez les espèces carnivores, les effets négatifs des glucides sont associés à des pathologies hépatiques et intestinales, ainsi qu'à un déséquilibre des communautés bactériennes intestinales. Les glucides alimentaires étant mal utilisés par ces espèces, la présence de ces nutriments non digérés dans l'intestin représente un terrain favorable à la prolifération de bactéries parfois non commensales (Kumar et al., 2005; Villasante et al., 2022).

Carences en minéraux et en vitamines

Les minéraux sont impliqués dans le maintien de fonctions cellulaires, physiologiques et enzymatiques mais leurs implications dans l'immunité sont encore mal comprises et peu documentées chez les poissons. Concernant le **fer**, deux points de vue s'opposent. La première suggère qu'une

carence en fer pourrait prévenir les infections bactériennes puisqu'il serait moins disponible pour la prolifération des bactéries. A l'opposé, une carence pourrait prédisposer les poissons à une infection et une supplémentation en fer entraînerait une meilleure résistance aux maladies. Des aliments équilibrés ou carencés en fer provoquent des effets variables chez les espèces et ne valident pas systématiquement l'un de deux points de vue. Par exemple, chez la barbue de rivière, un aliment contenant des teneurs adéquates en fer peut entraîner une mortalité identique à celle induite par une carence en fer lors d'une infection bactérienne (Lim and Klesius, 1997). A l'inverse, une supplémentation en fer n'a pas non plus d'impact significatif sur la mortalité de cette même espèce après 14 jours d'exposition à un pathogène bactérien (Lim et al., 2000).

La supplémentation en **sélénium** des aliments aquacoles a gagné en intérêt car elle permettrait d'améliorer la santé des poissons en activant certaines enzymes et protéines comme les sélénoenzymes et les sélénoprotéines. Le sélénium est par exemple, un composant de la glutathion peroxydase. Il est donc essentiel à la protection des membranes cellulaires contre les stress oxydants. Chez les salmonidés, un déséquilibre alimentaire en sélénium entraîne une réduction de l'activité de la glutathion peroxydase et perturbe les fonctions antioxydantes (Khan et al., 2017).

Les informations concernant l'impact d'une carence en **vitamines** sur les défenses immunitaires sont limitées chez les poissons car les formulations des aliments aquacoles couvrent généralement les besoins des animaux à travers l'addition de mélanges vitaminiques. On sait néanmoins que les **vitamines C et E**, ajoutées en excès dans l'aliment, sont impliquées dans la résistance aux maladies et aux stress notamment hypoxiques, thermiques et osmotiques, renforcent les fonctions immunitaires non spécifiques (facteurs humoraux) et stimulent la cicatrisation des plaies (Oliva-Teles, 2012).

C. Les additifs fonctionnels

Les probiotiques et les prébiotiques

Par définition, les probiotiques sont des microorganismes vivants exerçant un effet bénéfique direct sur l'hôte tandis que les prébiotiques sont des substances non digestibles utilisées par les microorganismes intestinaux de l'hôte. De manière générale, ces additifs fonctionnels sont utilisés pour leurs bénéfices sur la santé des organismes et notamment pour leur caractère immunostimulant (Amenyogbe et al., 2020).

Les microorganismes **probiotiques** les plus étudiés en aquaculture sont les bactéries appartenant au phylum des Firmicutes telles que les bactéries lactiques (*Carnobacterium maltaromaticum*, *Leuconostoc*

mesenteroides). D'autres organismes vivants non bactériens comme les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, ...) et les microalgues (*Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Phaedactylum tricornutum*, ...) sont également utilisés en tant que probiotiques en aquaculture. Les organismes probiotiques peuvent être utilisés sous forme liquide dans les écloseries et les élevages d'organismes filtreurs alors que les poudres sont directement mélangées aux aliments ou incorporées à l'eau des bassins. Par ailleurs, l'utilisation d'un mélange de plusieurs souches de microorganismes est conseillée et reste plus efficace que l'utilisation d'un probiotique mono-souche. En aquaculture, les doses d'inclusion de probiotiques varient de 10^6 à 10^{10} UFC (« unité formant colonie ») par g d'aliment mais les doses sont adaptées en fonction de l'espèce hôte (Ks and Eg, 2021). Dans la plupart des cas, chez les poissons, les microorganismes probiotiques apportés par l'alimentation sont capables de coloniser le mucus intestinal et de se fixer aux épithéliums muqueux. Les mécanismes d'action des organismes probiotiques sont divers. Les effets se manifestent par une meilleure utilisation et digestion des nutriments, et des activités antagonistes qui ralentissent la prolifération des bactéries, des virus ou des champignons pathogéniques. Ces activités incluent la production de molécules inhibitrices, la compétition vis-à-vis des sites d'adhésion des pathogènes et/ou de l'utilisation des nutriments. Certains microorganismes possèdent également des activités bactériolytiques liées à la production de substances telles que des bactériocines. De plus, certains probiotiques stimulent les facteurs cellulaires immunitaires en promouvant la prolifération, les mouvements et l'activité des lymphocytes, des monocytes et des phagocytes. Ils stimulent aussi l'activité de facteurs immunitaires humoraux parmi lesquels figurent les antiprotéases, le lysozyme, la peroxydase, les activités bactéricides et l'activité du complément (Chauhan and Singh, 2019; El-Saadony et al., 2021; Hai, 2015; Martínez Cruz et al., 2012; Rahimi et al., 2022). Les études relatant l'intérêt de l'utilisation de probiotiques chez les poissons sont nombreuses. A titre d'exemple, l'enrichissement d'un aliment à l'aide de *Bacillus velezensis* et *Lactobacillus sakei* chez la truite arc-en-ciel, améliore les performances de croissance dès 30 jours d'alimentation et augmente la résistance des poissons face à un stress infectieux (*Aeromonas salmonicida*) (Dang et al., 2022). Les auteurs de cette étude ont également observé une stimulation des voies régulant l'expressions des TLRs et de MyD-88, qui est impliqué dans la transduction du signal initié par les TLR. Ceci suggère que l'utilisation de probiotiques peut stimuler l'activation de certaines voies impliquées dans la réponse aux infections pathogènes. Zhao et al. ont conduit une étude assez similaire chez la truite arc-en-ciel pour évaluer les bénéfices d'une supplémentation en *B. velezensis* ou *L. sakei* sur la structure de l'intestin et les réponses transcriptomiques et microbiennes du tube digestif chez la truite arc-en-ciel. Les résultats obtenus ont mis en évidence que les deux souches bactériennes régulaient des voies distinctes au niveau du transcriptome intestinal mais contribuaient toutes deux à l'amélioration de la structure de l'intestin

notamment en augmentant la taille des villosités intestinales et en épaississant la couche musculuse de l'intestin. Ces modifications se sont également accompagnées d'une augmentation de la richesse et de la diversité des communautés bactériennes intestinales (Zhao et al., 2023).

Les **prébiotiques** servent de nutriments pour les microorganismes commensaux du système digestif. Les prébiotiques utilisés en nutrition humaine et animales sont des sucres non digestibles majoritairement dérivés des plantes, des microorganismes et des champignons, et plus rarement de produits laitiers. En aquaculture, les prébiotiques majoritairement utilisés sont les β -glucanes, les mannan-oligosaccharides (MOS), les fructo-oligosaccharides (FOS) dérivés de l'inuline (Song et al., 2014) et les galacto-oligosaccharides (GOS). Leurs interactions avec le microbiote sont néanmoins microbe-spécifiques et leur inclusion dans les aliments est la plupart du temps inférieure à 10 %. Ils peuvent être bénéfiques pour la croissance, améliorer l'efficacité alimentaire, stimuler le système immunitaire et améliorer la résistance aux agents pathogènes (Mohan et al., 2019; Wee et al., 2022). Chez la truite arc-en-ciel, l'étude d'Amani Denj et al., démontre que l'ajout de 1 g de MOS par kilogramme d'aliment commercial à base de farine et d'huile de poissons améliore les performances de croissance et l'utilisation de l'aliment. Cette supplémentation en MOS stimule également la production de lymphocytes sanguins (Amani Denj et al., 2015). Chez cette même espèce, l'association de MOS et de β -glucanes à hauteur de 2 g/kg d'aliment peut également entraîner une surexpression du lysozyme et de la cytokine TNF- α dans le rein antérieur. Cette étude met aussi en avant une augmentation de plusieurs facteurs immuns humoraux dont le lysozyme, l'activité du complément et l'activité bactéricide. Enfin, l'étude démontre que le régime supplémenté en prébiotiques améliore la survie de la truite suite à l'exposition à la bactérie gram négatif *Aeromonas hydrophila* (Yar Ahmadi et al., 2014).

Les immunostimulants

A l'inverse des pré- et des probiotiques, les **immunostimulants** sont des composés qui agissent directement sur les fonctions immunitaires sans nécessairement interagir avec le microbiote intestinal. En aquaculture, les immunostimulants sont utilisés chez les poissons, les crustacés et les mollusques (Harikrishnan et al., 2011). Ces composés restent néanmoins onéreux à cause des procédés techniques nécessaires pour obtenir des produits ultra-purs. Par conséquent, leur inclusion en tant qu'additif fonctionnel dans les régimes aquacoles reste faible (gamme d'inclusion comprise entre <1 % et 10 % maximum) (Tacchi et al., 2011). Les immunostimulants peuvent provenir de différentes origines. On retrouve par exemple, les alginates extraits des algues marines (Vallejos-Vidal et al., 2016), les extraits de plantes tels que le thé (Van Hai, 2015), le gingembre (Elumalai et al., 2021), l'ail (Labh and Shakya, 2014) et le thym (Orso et al., 2022), ou encore les glucanes et les nucléotides dérivés des levures (Ringoe

et al., 2011). Les extraits végétaux sont riches en métabolites secondaires bioactifs comme notamment les saponines, les phénols, les tanins et les alcaloïdes. L'introduction de ces extraits en faible quantité dans les aliments aquacoles est connue pour moduler l'expression de gènes impliqués dans l'immunité, augmenter les fonctions immunitaires du mucus et du plasma, ainsi que la réponse à des stress (Tadese et al., 2022).

Au-delà de leur richesse en EPA et en DHA, les **algues marines** possèdent des propriétés immunostimulantes, et c'est pourquoi leur utilisation en tant qu'additif fonctionnel a gagné en intérêt en aquaculture. Les algues sont riches en nutriments qui sont essentiels au maintien des fonctions immunitaires mais contribuent également à stimuler l'immunité des poissons. C'est notamment ce qui a été observé chez la daurade royale nourrie pendant 4 semaines avec un aliment commercial enrichi avec un lyophilisat de microalgue benthique *Navicula sp* à hauteur de 100 g par kilogramme d'aliment. Chez cette espèce, l'inclusion de cette microalgue dans l'alimentation induit une surexpression de gènes intestinaux impliqués dans la régulation des mécanismes proinflammatoires (interleukine 8 et interleukine 1- β), dans le transport du fer (transferrine), dans la réduction de la toxicité intestinale (cyclooxygénase 2) ainsi que dans la perméabilité de la barrière intestinale. En effet, le régime enrichi en microalgue *Navicula sp* stimule l'expression de l'occludine, une protéine clé des jonctions serrées de les entérocytes (Reyes-Becerril et al., 2013). Chez le turbot (*Psetta maxima L.*), l'utilisation d'extraits de microalgues en tant qu'additif fonctionnel stimule l'activité phagocytaire et pourrait être bénéfique en cas d'exposition à un pathogène. Cet effet serait principalement lié à la présence de polysaccharides dans les microalgues (Castro et al., 2004).

L'utilisation d'**extrait de feuilles de thé** en aquaculture se réfère aux bénéfices observés en médecine humaine et animale. Ces bénéfices sont notamment liés à la richesse en composés bioactifs des extraits de feuilles de thé, notamment les polyphénols, les vitamines et les minéraux. L'inclusion de thé sous forme sèche ou d'extrait dans l'alimentation a été évaluée chez diverses espèces aquacoles et les études confirment les propriétés immunostimulantes de ces extraits. Par exemple, chez des tilapias du Nil juvéniles, l'ajout de 2 g d'extrait de feuilles de thé (*Camellia sinensis*) par kilogramme d'aliment conduit à une augmentation significative de la réponse immunitaire plasmatique. Cette augmentation se traduit par une hausse des activités du lysozyme, de la peroxydase et du complément alternatif. De plus, la réponse immunitaire du mucus et de la peau est également améliorée avec une augmentation de l'activité du lysozyme et de la peroxydase. Après 8 semaines d'alimentation, les tilapias de cette étude ont été injectés par voie intrapéritonéale avec une solution de streptocoques B (*Streptococcus agalactiae*). Les poissons nourris avec le régime contenant 0,2 % d'extrait de feuilles de thé présentaient un taux de survie plus élevé (83 %) que ceux nourris sans extrait de feuilles de thé (33 %) (Van Doan et al., 2019). Une étude réalisée chez le sébaste Coréen (*Sebastes schlegelii*) nourri avec un régime

supplémenté en extrait de thé vert pendant 8 semaines a également montré que l'utilisation d'extrait de thé en tant qu'additif fonctionnel pouvait améliorer la réponse immunitaire sérique ainsi que la récupération suite à des stress. En effet, les juvéniles alimentés avec un régime supplémenté avec 5 % d'extrait de thé présentaient une augmentation de l'activité plasmatique du lysozyme, une meilleure récupération après une anesthésie (2-phenoxyethanol), ainsi qu'une mortalité plus faible suite à l'exposition des poissons à l'air libre pendant 15 min (Hwang et al., 2013).

Les bénéfices d'**extraits de gingembre, d'ail et de thym** ont également été évalués dans l'alimentation des espèces aquacoles. Chez la truite arc-en-ciel, l'ajout de 2,5 ou 5 g d'extrait de gingembre (*Zingiber officinale*) par kilogramme d'aliment induit une augmentation de l'activité du lysozyme, de la phosphatase alcaline et de la protéase dans le mucus, suggérant une amélioration de l'activité immunitaire du mucus de la peau (Shaluei et al., 2017). Chez les mammifères, les propriétés antiparasitaires, antivirales et immunostimulantes de l'ail ne sont plus discutables. Ses composants organosulfurés comme l'allicine, ses polysaccharides et ses fructanes stimulent les fonctions immunitaires, la prolifération des lymphocytes et l'activité phagocytaire. Par ailleurs, son utilisation dans l'alimentation est particulièrement efficace pour lutter contre les nématodes en aquaculture (Lee and Gao, 2012; Valenzuela-Gutiérrez et al., 2021). Après 30 jours d'alimentation enrichie en extrait d'ail (*Allium sativum*), le barramundi (*Lates calcarifer*) présente une réduction significative de l'intensité d'une infection parasitaire par *Neobenedenia sp.* Cette réduction semble être attribuée en grande partie à la présence d'allicine connue pour ses propriétés antiparasitaires (Militz et al., 2013).

Les **huiles essentielles de thym** sont riches en thymol. Chez les poissons, elles sont connues pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antiparasites et antifongiques. De plus, elles présentent des bénéfices sur les fonctions hématobiochimiques telles que la stimulation des cellules immunitaires sanguines (Alagawany et al., 2021). Chez la truite arc-en-ciel, Hoseini et Yousefi ont montré que la supplémentation en extrait de thym (*Thymus vulgaris*) (5, 10 et 20 g/kg d'aliment) augmente significativement les fonctions antioxydantes intestinales ainsi que l'activité de certains paramètres plasmatiques impliqués dans l'immunité innée. Ainsi, après 2 semaines d'alimentation, les truites arc-en-ciel nourries avec les régimes supplémentés en extrait de thym affichent une augmentation de l'activité intestinale de la glutathion peroxydase, des activités plasmatiques du lysozyme et de la voie alternative du complément, ainsi qu'une augmentation de la quantité de lymphocytes sanguins (Hoseini and Yousefi, 2019). Un essai conduit sur la truite arc-en-ciel a également évalué les bénéfices de l'ajout d'huile essentielle de thym (0,5 mL par kilogramme d'aliment) sur la résistance à une infection de 10 jours avec une bactérie gram négatif (*Aeromonas hydrophila*). Après deux mois d'alimentation, les poissons ont donc été exposés à *Aeromonas hydrophila* pendant 10 jours. A la fin du challenge bactérien, les poissons préalablement nourris avec le régime supplémenté en huile

essentielle de thym présentait un taux de survie supérieur (30 %) à ceux nourris avec le régime non supplémenté (10 %) (Zargar et al., 2019). L'utilisation d'extrait de feuilles de thym (*Thymus linearis*) a également montré son efficacité dans la lutte contre les infections cutanées d'origine fongique telles que la saprolégniose. Dans cette étude, *Saprolegnia parasitica* a été isolée à partir d'une espèce de cyprinidés (*Tor putitora*) infectée. L'oomycète a été incubé avec des graines de chanvre stérilisées pendant 16 heures puis exposées à différentes concentrations d'extrait de feuilles de thym, allant de 0,02 à 10,24 mg/mL, pendant 24 heures. Le suivi de la croissance hyphale de l'oomycète a permis de mettre en évidence que l'ensemble des concentrations permettaient de réduire significativement le développement de *Saprolegnia parasitica* comparé au groupe non traité, avec les meilleurs résultats observés pour les concentrations les plus élevées (5,12 et 10,24 mg/mL) (Shah et al., 2021).

Les **β -glucanes** sont des polysaccharides reliant des molécules de glucose par des ponts β -glycosidiques. On les retrouve dans les parois cellulaires des plantes (blé, orge, échinacées, ...), des levures du genre *Saccharomyces*, des algues laminaires et des champignons comme le shiitake (*Lentinus edodes*) et le polypore en touffe (*Grifola frondosa*). Les effets immunomodulateurs des β -glucanes ont d'abord été montrés chez les mammifères (Di Luzio, 1985). Depuis, leur utilisation s'est étendue aux espèces aquacoles et de nombreuses études dépeignent leurs propriétés immunostimulantes. Les β -glucanes jouent un rôle dans l'activation des facteurs impliqués dans l'immunité innée et adaptative. Chez les mammifères et les poissons, ils se lient par exemple aux macrophages et à certaines populations de lymphocytes telles que les neutrophiles et les cellules NK, par le biais de récepteurs spécifiques (récepteurs toll et dectine-1). Ils stimulent les activités cellulaires notamment la phagocytose, la production de cytokines et le traitement des antigènes (Gantner et al., 2003; Herre et al., 2004; Meena et al., 2013). Aujourd'hui, les β -glucanes sont les principaux immunostimulants utilisés en aquaculture dans le cadre de la gestion des maladies. Ils peuvent être administrés par balnéation, par voie intrapéritonéale ou dans l'aliment. Bien que l'injection intrapéritonéale de β -glucanes soit décrite comme la méthode d'administration la plus efficace, elle reste inapplicable chez les larves, les alevins et les organismes filtreurs ainsi qu'en élevage. L'administration de β -glucanes par balnéation est néanmoins souvent inefficace comme cela a été montré chez la truite arc-en-ciel (Zhang et al., 2009). L'administration orale de β -glucanes *via* l'alimentation reste donc la voie la plus répandue pour des raisons pratiques. Une étude comparative des trois voies d'administration a été réalisée chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) afin d'évaluer le taux de survie et la réponse immunitaire des poissons, suite à un challenge pathogène avec *Aeromonas hydrophila* injecté par voie intrapéritonéale. Différentes concentrations de β -glucanes couplées à du LPS ont été administrés aux jours 1, 7 et 14 par balnéation, par voie intrapéritonéale ou par voie orale, et les poissons ont été challengés au jour 16 avec l'injection de la bactérie. Les résultats ont montré que les administrations du mélange β -glucanes/LPS par voies

orale et intrapéritonéale avaient significativement augmenté la survie des poissons comparées aux carpes traitées par balnéation. L'amélioration des taux de survie a été corrélée à une augmentation des neutrophiles et des monocytes sanguins, ainsi qu'à une augmentation de l'activité des macrophages *via* la production d'ion superoxyde. Néanmoins, l'administration par injection intrapéritonéale s'est avérée être la méthode la plus efficace (Selvaraj et al., 2006). Chez le mérou à tâches oranges (*Epinephelus coioides*) et la truite arc-en-ciel, l'inclusion de 0,2 % de β -glucanes d'origine fongique et levurienne dans l'aliment a permis d'améliorer la résistance des poissons à *Vibrio alginolyticus* et *Aeromonas salmonicida* (Chang et al., 2013; Ji et al., 2020). Chez le mérou à tâches oranges, l'amélioration du taux de survie (80 % contre 55 % pour le groupe contrôle) suite à l'exposition à la bactérie gram négatif a été attribuée à la stimulation de l'immunité innée humorale et cellulaire. Cette stimulation immunitaire s'explique par une augmentation des activités plasmatiques du lysozyme et du complément, ainsi qu'une induction de l'activité phagocytaire et de l'explosion oxydative. Chez la truite arc-en-ciel, l'étude transcriptomique de la rate, organe impliqué dans les réponses immunitaires, a permis de mettre en évidence les voies potentiellement stimulées par l'inclusion de β -glucanes dans l'aliment. Les gènes différentiellement exprimés étaient associés à la voie du complément, à la cascade de coagulation, aux récepteurs toll-like, à la voie NF κ B, au traitement et à la reconnaissance des antigènes, ainsi qu'à l'activation plaquettaire.

En aquaculture, l'utilisation de **nucléotides** en tant qu'additifs fonctionnels s'est développée à partir des années 2000. Les nucléotides sont composés d'une base azotée (purique ou pyrimidique), d'un sucre et d'un acide phosphorique, et sont les molécules constitutives du matériel génétique. Les nucléotides sont retrouvés dans les matières premières riches en protéines tels que les farines de poissons (74 mg/kg), le lactosérum (282 mg/kg), les farines de sang séché (55 mg/kg) et les farines d'insectes dégraissées (482 mg/kg). On les retrouve également dans les organismes unicellulaires tels que les levures et notamment *Saccharomyces pastorianus* chez qui les nucléotides représentent 71 à 88 % des acides nucléiques (Vieira et al., 2013). Chez les poissons, l'inclusion de nucléotides dans les aliments aquacoles s'est avérée bénéfique pour la santé intestinale, pour stimuler les défenses immunitaires innée et adaptative et pour améliorer la réponse aux stress (Hossain et al., 2020). Bien que les mécanismes d'action des nucléotides n'aient pas encore été élucidés, les nucléotides n'en restent pas moins des constituants importants au bon fonctionnement de nombreux mécanismes cellulaires et notamment ceux associés à l'immunité. Chez la souris, une restriction en nucléotides alimentaires réduit la capacité des animaux à répondre à des challenges infectieux. Ceci se traduit par une réduction des réponses leucocytaires, suggérant que les nucléotides sont essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire (Carver, 1994). Chez les poissons, on sait que l'inclusion exogène de nucléotides dans l'aliment du turbot (*Scophthalmus maximus*) stimule l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires spécifiques dans les branchies et la rate (immunoglobuline M

et activateur de recombinaison RAG-1), mais également innées dans le rein (IL-1 β) (Low et al., 2003). Des observations similaires chez le tilapia du Nil démontrent qu'une alimentation riche en nucléotides stimule l'expression intestinale de gènes codant pour des cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-10 β et TNF- α , ainsi que les réponses immunitaires cellulaires et humorales au niveau plasmatique. Comparés aux poissons nourris avec le régime contrôle non supplémenté, les tilapias nourris avec une alimentation supplémentée en nucléotides présentaient des différences plasmatiques notables. Leurs taux de lymphocytes et de granulocytes étaient plus élevés tout comme leurs activités bactéricides, du lysozyme, de l'antiprotéase et d'enzymes antioxydantes. Ces poissons affichaient également des teneurs en oxyde nitrique et en immunoglobuline M plus importantes. Les auteurs ont par ailleurs suggéré que le renforcement des facteurs immuns cellulaires et plasmatiques pourraient expliquer la réduction de la mortalité de ces poissons après une exposition à *Aeromonas sorbria* (Reda et al., 2018). Chez les poissons, la morphologie de l'intestin peut aussi être affectée par l'inclusion de nucléotides dans les régimes. C'est notamment ce qui a été montré par Burrells et al. chez le saumon Atlantique (Burrells et al., 2001b), par Cheng et al. chez les tambours rouges (*Sciaenops ocellatus*) (Cheng et al., 2011) et par Hossain et al. chez la daurade Japonaise (*Pagrus major*) (Hossain et al., 2016). Dans ces études, les poissons nourris avec les régimes supplémentés en nucléotides présentaient une augmentation de la taille des villosités intestinales. Les effets des nucléotides sur la morphologie de la muqueuse intestinale chez les poissons sont encore mal compris mais certaines études sur le rat (Savaiano and Clifford, 1978) et la souris (Burridge et al., 1976) suggèrent que leur hydrolyse lors de la digestion augmenterait l'assimilation de nucléosides, forme préférentiellement incorporées dans les tissus.

PARTIE 3

La levure : un candidat « multifonction » idéal pour améliorer l'efficacité des régimes sans farine de poissons ?

En alimentation animale, l'utilisation d'additifs fonctionnels est devenue très intéressante dans le cadre de l'amélioration de la santé et de la prévention des maladies. Leurs bénéfices ont été montrés chez la plupart des animaux d'élevage (Burdick Sanchez et al., 2021; Vohra et al., 2016) incluant les poissons (Agboola et al., 2021). La levure se place aujourd'hui en tant qu'additif fonctionnel de taille de par ses nombreuses propriétés. La levure possède un profil nutritionnel intéressant et est également riche en composés immunostimulants. C'est notamment pour cela qu'elle peut être utilisée en tant que macro-ingrédients sous sa forme entière, ou sous la forme de dérivés en tant qu'immunostimulant. En nutrition aquacole, l'utilisation de la levure s'intègre également dans le contexte de réduction de l'impact environnemental du secteur puisque sa production est plus durable comparée à d'autres ingrédients utilisés dans la formulation des aliments aquacoles (Jannathulla et al., 2019; Matassa et al., 2016).

Qu'elle que soit la forme utilisée, la levure semble donc être un candidat « multifonction » idéal pour améliorer l'efficacité des régimes à base de matières premières alternatives chez les poissons d'élevage. Cette partie sera introduite par quelques généralités historiques et biologiques sur la levure. Afin de mieux comprendre l'intérêt de leur utilisation en nutrition aquacole, les propriétés nutritionnelles des levures et de leurs dérivés seront ensuite détaillées. Enfin, les applications et les bénéfices de leur utilisation en aquaculture seront évoqués à travers des exemples concrets.

1. Généralités sur la levure

Les premières observations scientifiques de levures ont été réalisées à la fin du 17^{ème} siècle par le microbiologiste néerlandais Anton van Leeuwenhoek. La levure est un microorganisme eucaryote unicellulaire d'origine fongique. Les levures sont composées d'une paroi cellulaire riche en mannanes, en glucanes et en protéines, et qui entoure la membrane plasmique. La paroi cellulaire et la membrane plasmique enferment la fraction cytosolique où baignent le noyau et les organites c'est-à-dire les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les ribosomes et les vacuoles (**Figure 12, p. 84**). Les levures regroupent environ 60 genres et 500 espèces mais *Saccharomyces cerevisiae*, plus communément appelée « levure de bière », est l'espèce la plus connue (Shurson, 2018). Elle se multiplie de manière végétative par bourgeonnement à partir d'une cellule haploïde. Sur la **Figure 12**, l'annotation « bud » représente un bourgeon en formation. En fonction des espèces, une cellule de levure ou un bourgeon levurien peut produire de 10 à 33 cellules filles (Jacques et al., 2003).

En 1857, Louis Pasteur découvre le métabolisme de fermentation anaérobique chez la levure, aussi appelée fermentation alcoolique. Il s'agit d'un processus biochimique durant lequel du glucose est transformé en éthanol et en dioxyde de carbone en l'absence d'oxygène. Bien avant de connaître les processus précis de la fermentation, les Hommes utilisaient déjà les levures afin de confectionner des boissons alcoolisées (bière, vin, cidre, kéfir...) et du pain (panification) (Barnett and Barnett, 2011). Néanmoins, la levure commerciale n'est apparue qu'entre 1780 et 1790 en Angleterre, aux Pays-Bas et en Allemagne. A partir de 1920, l'essor de la boulangerie industrielle a conduit à la production à grande échelle de levures. La sélection de souches performantes et l'amélioration des processus de fermentation, de transformation et de séchage ont ensuite permis d'augmenter les capacités de production. Aujourd'hui, les industriels sont capables de proposer des processus de transformation permettant d'obtenir des produits de qualité et diversifiés.

La production anaérobique de levure est réalisée dans des bioréacteurs allant jusqu'à plusieurs centaines de m³ dans lesquels sont injectés de la mélasse et de l'ammonium en tant que substrat de fermentation. En fonction du produit recherché, la levure entière peut être isolée puis séchée, ou lysée pour récupérer des fractions spécifiques. Les techniques de lyse peuvent être mécaniques ou non mécaniques. Dans la lyse mécanique, on retrouve par exemple le broyage sur billes et la lyse par ultrasons. La lyse non-mécanique concerne par exemple la lyse thermique, l'utilisation de détergents, l'application d'un courant électrique et l'autolyse enzymatique (Puligundla et al., 2020). Les fractions pariétales et cytosoliques sont ensuite séparées par centrifugation et concentrées (**Figure 13, p. 84**) (George et al., 1998; Lahue et al., 2020; Roques, 2019).

Aujourd'hui, les levures sont toujours utilisées pour de multiples applications. Elles sont exploitées par la recherche fondamentale pour des études de génomiques et pour élucider des mécanismes moléculaires. Dans l'industrie pharmaceutique, elles servent à l'extraction de composés pharmaceutiques et à la production de probiotiques. L'industrie agroalimentaire les utilise pour la synthèse d'arômes et la dégradation de polluant. Enfin, les levures sont employées pour la production de biocarburants à base d'éthanol (Johnson and Echavarri-Erasun, 2011; Nielsen, 2015).

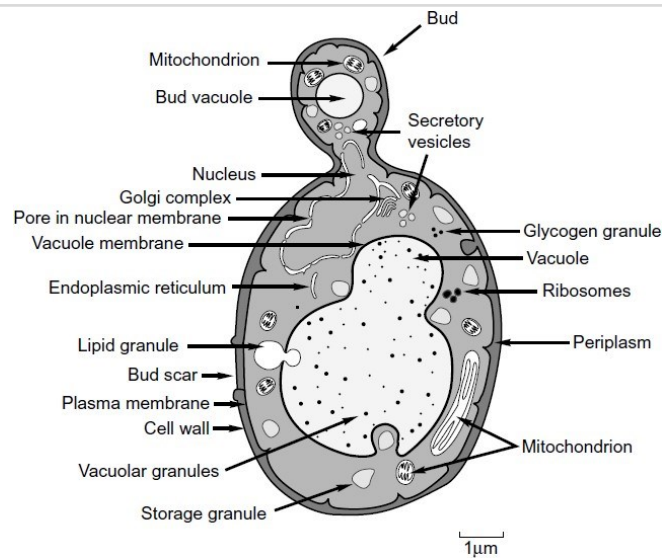


Figure 12 Schéma de l'organisation cellulaire d'une levure (schéma issu de Jacques et al., 2003).

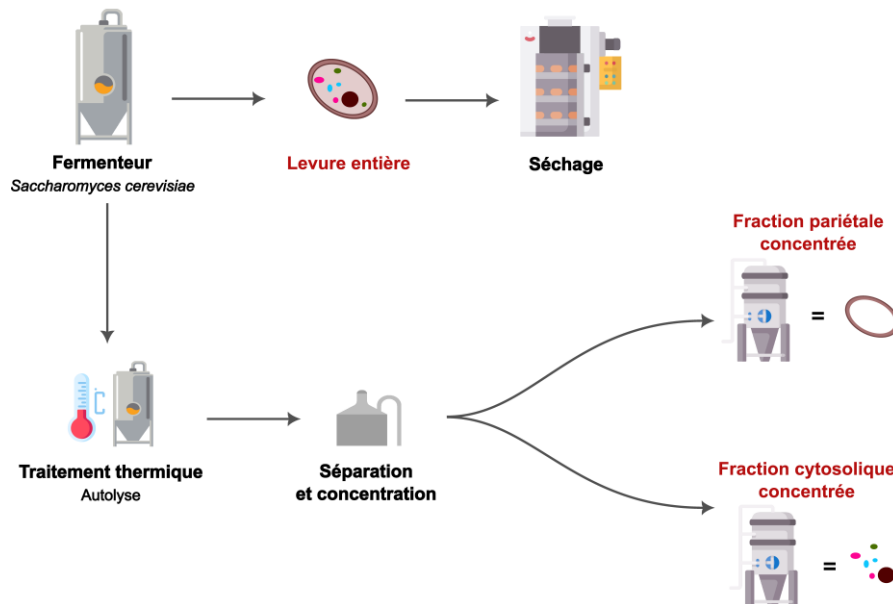


Figure 13 Etapes de la production industrielle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de ses dérivés (adapté de Roques, 2019).

2. Les propriétés nutritionnelles des levures et de leurs dérivés

a. Propriétés nutritionnelles des levures entières

La composition des levures entières peut varier en fonction de la souche, du substrat utilisé durant la fermentation ainsi que de la phase de croissance cellulaire (Martinez-Force and Benitez, 1995). Les profils nutritionnels moyens des trois principales souches de levures utilisées en aquaculture sont décrits dans le **Tableau 10 (p. 88)**.

Les compositions en cendres, protéines et énergie de *S. cerevisiae*, *C. utilis* et *K. marxianus* sont sensiblement similaires. Chez ces espèces, les teneurs moyennes en protéines s'élèvent à 50,1 % et sont proches de celles retrouvées dans les farines de soja (40 à 54 %). Les teneurs en lipides et en amidon sont faibles (inférieures à 5 % pour les lipides et inférieures à 4 % pour l'amidon), en particulier pour *K. marxianus* dont les teneurs en lipides et en amidon ne dépassent pas les 0,8 % (Agboola et al., 2021; Øverland and Skrede, 2017; Shurson, 2018). Les trois souches possèdent des teneurs moyennes en cendre et en énergie brute qui s'élèvent respectivement à 7,8 %, et 1,9 %. Par ailleurs, les levures représentent une source intéressante de minéraux tels que le phosphore, le calcium et le sélénium ainsi que de vitamines B telles que les riboflavines, les pyridoxines, les niacines et les acides pantothéniques (Bekatorou et al., 2006; Øverland and Skrede, 2017).

Comparés aux ingrédients d'origines végétales et animales, les acides nucléiques (acides ribonucléiques, oligonucléotides et nucléotides) sont retrouvés abondamment chez les levures. Cette caractéristique est propre aux microorganismes à croissance rapide. Comparées à celles des bactéries (8 à 15 %), les teneurs en acides nucléiques des levures restent néanmoins plus faibles (5 à 10 %) (Jach et al., 2022; Jannathulla et al., 2021). Chez les Humains, une consommation élevée d'acides ribonucléiques est toxique puisque l'adénine et la guanine sont métabolisées en acide urique, provoquant des pathologies telles que la goutte et des calculs rénaux. Ainsi, les produits levuriens utilisés en nutrition humaine sont généralement traités enzymatiquement pour réduire le taux d'acides nucléiques (Takaloo et al., 2022). Lorsque la levure est utilisée pour la nutrition humaine, les teneurs en acides nucléiques ne doivent pas dépasser 3 %. Chez la plupart des animaux, les acides nucléiques ne semblent pas être toxiques mais plutôt bénéfiques (Bratosin et al., 2021).

La **Figure 14 (p. 89)** compare les profils moyens en acides aminés des farines de poisson, de la farine de soja, de coproduits animaux et de la levure. De manière générale, les teneurs en acides aminés des levures sont inférieures à celles retrouvées dans la farine de poisson, dans la farine de soja et dans les coproduits animaux. Si l'on compare les profils en acides aminés des levures à celui de la farine de

poissons, on constate que les teneurs en cystéine, tyrosine, thréonine et tryptophane sont proches, mais celles de l'arginine, de l'histidine, de l'isoleucine, de la leucine, de la lysine, de la méthionine, de la phénylalanine et de la valine sont plus faibles. Les souche *S. cerevisiae* et *K. marxianus* présentent des teneurs en méthionine supérieures à *C. utilis*, mais *S. cerevisiae* reste déficiente en lysine comparée aux deux autres souches (**Tableau 10, p. 88**). Néanmoins, l'inclusion de levures dans un aliment aquacole peut couvrir les besoins en acides aminés essentiels de la plupart des espèces aquacoles carnivores, incluant la truite arc-en-ciel (**Tableau 2, p. 23**).

b. Propriétés nutritionnelles et bioactives des fractions pariétales et cytosoliques des levures

Les fractions pariétales et cytosoliques de la levure sont obtenues lors du processus industriel de lyse de la cellule entière (**Figure 13, p. 84**). La fraction pariétale comprend les parois des levures riches en polysaccharides, tandis que la fraction cytosolique comprend les contenus intracellulaires.

De manière générale, la fraction pariétale des levures représente 15 à 32 % du poids sec de la levure entière. Cette paroi est composée de 85 à 90 % de polysaccharides et de 10 à 15 % de protéines. Les β -glucanes et les mannanes sont les polysaccharides les plus abondants dans la paroi des levures. Ils représentent respectivement 55 % et 30 % des polysaccharides pariétaux. La paroi est organisée en deux couches (**Figure 15, p. 89**). La couche interne (proche de la membrane plasmique) est principalement composée de β -glucanes dont le squelette comprend des résidus de glucose reliés entre eux par des liaisons β -1,3 et ramifiés par des liaisons β -1,6 auquel sont reliés des mannoprotéines et de la chitine par des liaisons β -1,4. La chitine est retrouvée en faible quantité (< 2 %). La couche externe est quant à elle majoritairement composée de mannanes, constitués d'unités de mannoses, reliés à des mannoprotéines (Aguilar-Uscanga and François, 2003; Nguyen et al., 1998; Ribeiro et al., 2022; Shurson, 2018). Les propriétés immunostimulantes des β -glucanes et des mannanes sont décrites dans la section « **Les immunostimulants** » (p. 76).

La fraction cytosolique, également appelée « extrait de levure », comporte également des glucides tels que le glycogène et le tréhalose, qui constituent des réserves d'énergie de la levure. Chez *S. cerevisiae*, le glycogène représente 16 à 20 % et le tréhalose 6 à 10 %. Les extraits de levure sont pauvres en lipides (< 1 %). A l'inverse de la fraction pariétale, la partie cytosolique des levures est intéressante pour sa richesse en protéines qui en moyenne, est supérieure à 70 % (Shurson, 2018). Comme l'indique la **Figure 16 (p. 90)** et l'étude de Vieira et al. (2019), l'isolement de la fraction

cytosolique permet également d'obtenir un produit enrichi en certains acides aminés essentiels, comparé à la levure entière. En effet, les teneurs en arginine, en histidine, en méthionine et en cystéine sont supérieures, et les teneurs en isoleucine restent similaires à celles retrouvées dans la levure entière. On observe néanmoins une légère déficience en leucine, lysine, tyrosine, thréonine et valine (Vieira et al., 2019). Au-delà de leurs teneurs élevées en protéines et en acides aminés, les extraits de levure sont également riches en composants bioactifs. Comme évoqué précédemment, les levures sont riches en acides nucléiques et par extension en nucléotides (**Tableau 10, p. 88**). Par exemple, les levures contiennent entre 5 et 10 % d'acides nucléiques, représentant 23 mg de nucléotides/g d'extrait de levure, contre 2 % dans la viande et 0,4 % dans les farines de poissons (Dancey et al., 2006; Gamboa-Delgado and Márquez-Reyes, 2018). Certains nucléotides retrouvés dans la levure, tels que la guanosine monophosphate et la guanine monophosphate, stimulent le système olfactif et gustatif. En effet, les extraits levuriens étant riches en nucléotides et en acide glutamique (12,4 g/100g de protéines) (Øverland and Skrede, 2017), leur utilisation en nutrition confère un caractère appétant aux produits. C'est notamment pour cela que les extraits de levures ont initialement été utilisés par l'industrie agro-alimentaire en tant qu'exhausteur de goût (Alim et al., 2020). Les nucléotides sont également associés à des propriétés immunostimulantes, notamment démontrées chez les poissons (voir la section « **Les immunostimulants** », p. 76). Les extraits de levure sont également très riches en petits peptides dont la taille est inférieure à 3 kDa. Leurs propriétés sont diverses. En santé humaine, animale et végétale, les peptides levuriens sont associés à des activités antiprolifératives (inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses), antihypertensives (inhibition de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, réduction de la pression sanguine), antidiabétiques (inhibition de l'activité de l' α -amylase salivaire et de l' α -glucosidase intestinale), anti-âge (augmentation de l'élasticité de la peau, stimulation de la cicatrisation), antioxydantes (stimulation de l'activité d'enzymes liés au stress oxydant, inhibition de l'oxydation des lipides) et antimicrobiennes (liaison aux membranes anioniques des pathogènes *via* une interaction électrostatique) (Mirzaei et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Puligundla et al., 2020; Vieira et al., 2019)

Tableau 10 Composition nutritionnelle moyenne des principales espèces de levure utilisées en aquaculture (Agboola et al., 2021; Øverland and Skrede, 2017; Shurson, 2018).

Composition (%) ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Matière sèche	93,1	94,3	94,3
Cendres	7,2	8,4	7,9
Protéine brute	47,8	48,7	53,8
Lipides brutes	4,3	2,2	0,8
Energie brute	1,8	1,9	2,1
Amidon	2,8	3,7	0,8
Acides nucléiques totaux	5,4	10,4	10,6
Acides aminés essentiels			
<i>Arginine</i>	3,2	5,1	4,1
<i>Histidine</i>	1,5	1,8	1,7
<i>Cystéine</i>	0,8	0,8	0,6
<i>Isoleucine</i>	3,1	4,1	4,0
<i>Leucine</i>	3,1	6,2	6,4
<i>Lysine</i>	4,6	6,9	6,8
<i>Méthionine</i>	1,3	1,1	1,3
<i>Phénylalanine</i>	2,8	3,6	3,9
<i>Thréonine</i>	3,2	4,6	5,0
<i>Tryptophane</i>	0,8	1,4	1,0
<i>Tyrosine</i>	3,7	3,1	3,2
<i>Valine</i>	3,7	5	4,6
Minéraux			
<i>Calcium (g/kg)</i>	0,7	2,7	0,5
<i>Phosphore (g/kg)</i>	11	15	15
<i>Sélénium (mg/kg)</i>	0,12	<0,04	<0,04

¹ Compositions des levures entières

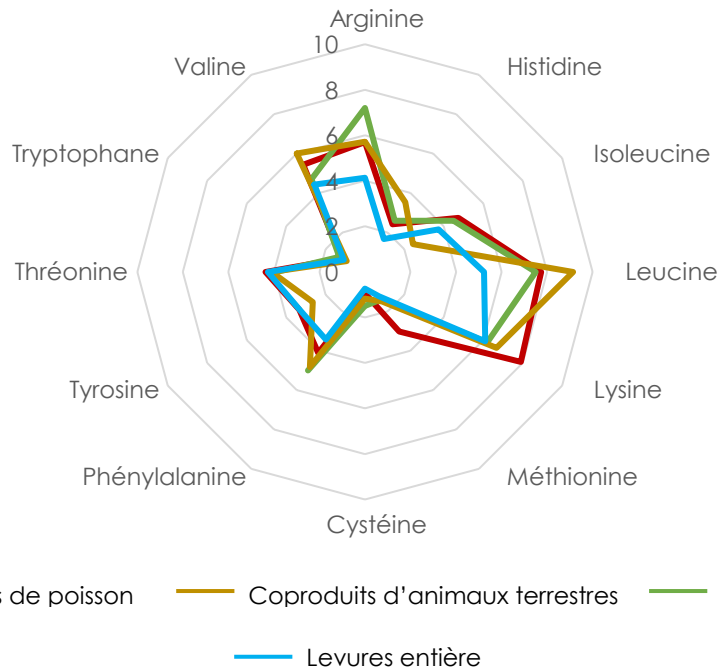


Figure 14 Profils moyens des principaux acides aminés (en g/100g de protéines) de la farine de poisson, de plusieurs coproduits d'animaux terrestres (farines de viande, de sous-produits de volaille et de sang), de la farine de soja et de trois levures entières (*S. cerevisiae*, *C. utilis*, *K. marxianus*) (Agboola et al., 2021; Cho and Kim, 2011; Øverland and Skrede, 2017; Shurson, 2018).

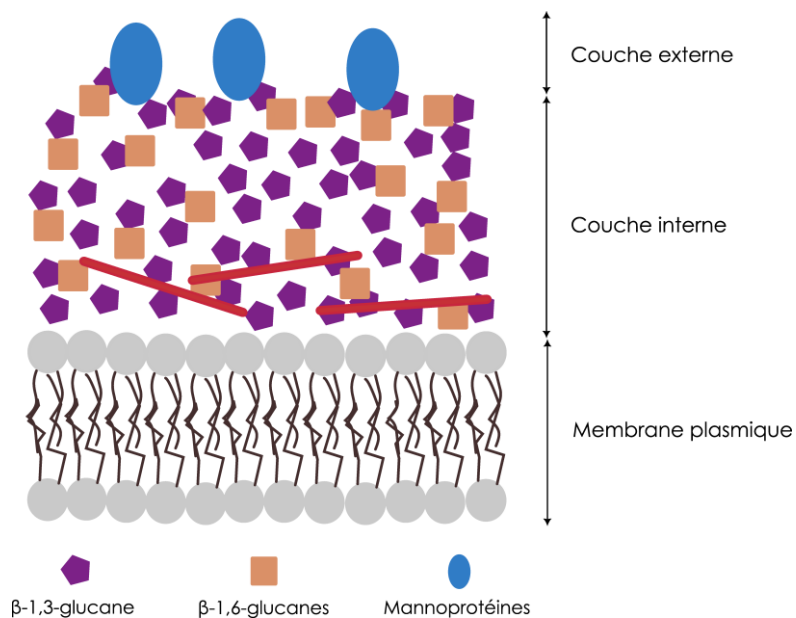


Figure 15 Représentation schématique de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* (adapté de Ribeiro et al., 2022).

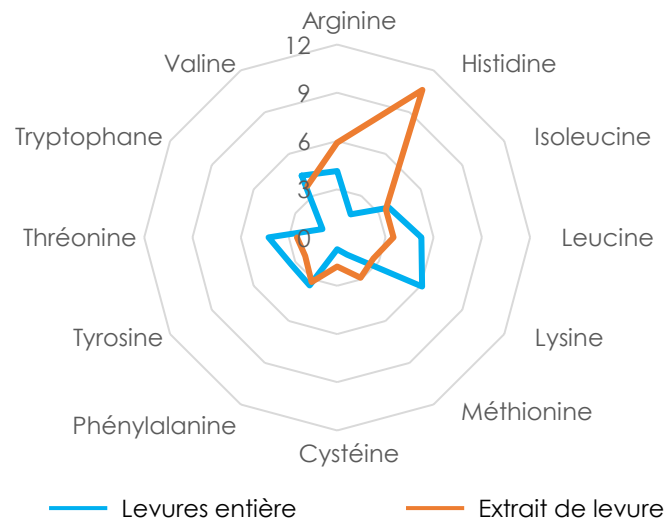


Figure 16 Profils moyens des principaux acides aminés (en g/100g de protéines) de levures entières et d'extraits de levure (Vieira et al., 2019).

3. Les applications de la levure en nutrition aquacole

a. La levure entière en tant que substitut protéique à la farine de poisson

La recherche sur l'utilisation de microorganismes unicellulaires (levures, bactéries, champignons, algues) en tant que substituts protéiques aux farines de poissons dans les aliments aquacoles a été initiée au début des années 1980 avec l'étude de Dabrowski et al. (Dabrowski et al., 1980). Les levures entières sont ensuite apparues idéales pour remplacer les farines de poissons dans les formulations aquacoles. En effet, les levures possèdent des teneurs comparables aux farines et tourteaux de soja, ont des rendements de production élevés, mais sont aussi considérées comme des ingrédients durables et peu coûteux. Il a été constaté que l'utilisation de levures entières en tant que macro-ingrédients était possible chez de nombreuses espèces de poissons, en respectant certains seuils de substitution. Les salmonidés, tels que le saumon Atlantique et la truite arc-en-ciel, tolèrent par exemple des niveaux d'inclusion élevés. Øverland et al. ont montré que la substitution de 40 % des protéines contenues dans un régime à base de farine de poissons par la souche *Candida utilis* n'affectait pas les performances de croissance des saumons Atlantique. En effet, les saumons nourris avec ce régime à base de levures présentaient des poids finaux et des taux spécifiques de croissance identiques à ceux nourris avec le régime contrôle non substitué (Øverland et al., 2013). Chez la truite arc-en-ciel, les performances de croissance, la digestibilité, l'assimilation des acides aminés, la rétention protéique et la santé intestinale

ne sont pas affectées jusqu'à 60 % de substitution avec *Saccharomyces cerevisiae* et 40 % avec *Pichia anomala* (Huyben et al., 2018, 2017; Vidakovic et al., 2020). Chez le tilapia du Nil, l'inclusion de 15 % de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* n'affecte pas la composition corporelle des animaux et l'inclusion de 50 % de cette même levure dans l'alimentation du Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) améliore significativement le gain en azote réduisant ainsi les pertes azotés dans le milieu (Ozório et al., 2010, 2012). La plupart des études conduites sur des espèces aquacoles montrent donc que les levures peuvent être utilisées en tant que macro-ingrédients dans la formulation des aliments. Cependant, une substitution élevée ou totale entraîne des effets indésirables sur la digestibilité du produit, en raison de la rigidité et de l'épaisseur des parois des levures entières. Selon Øverland and Skrede (2017), des processus de transformation comme la rupture des cellules entières, sont nécessaires pour améliorer la qualité nutritionnelle et la digestibilité de la levure par les poissons. Ainsi, une hausse de la disponibilité, de la digestibilité et de l'assimilation des nutriments a été confirmée chez la truite arc-en-ciel (Rumsey et al., 1991) et le saumon Atlantique (Hansen et al., 2021) nourris avec des aliments contenant des levures lysées. Les processus de transformations industrielles engendrent cependant des produits plus onéreux et réduisent parfois les propriétés bioactives des composants de la levure (Agboola et al., 2021). Par conséquent, les fractions obtenues sont principalement utilisées en tant qu'ingrédients fonctionnelles et donc incorporées dans les aliments en faible pourcentage, plutôt qu'en tant que macro-ingrédients.

b. Les fractions levuriennes pariétales et cytosoliques en tant qu'additifs fonctionnels

Effets de l'utilisation de la fraction pariétale de la levure en nutrition aquacole

L'ajout de paroi de levure dans les aliments aquacoles favorise la croissance de nombreuses espèces aquacoles dont la truite arc-en-ciel (Staykov et al., 2007; Yilmaz et al., 2007), le tilapia du Nil (Samrongpan et al., 2008), la carpe indienne labéo roho (*Labeo rohita*) (Andrews et al., 2009), la daurade royale (Gültepe et al., 2011) et le bar Européen (Torrecillas et al., 2013, 2007). Cependant, c'est pour ses propriétés immunostimulantes et plus particulièrement sa richesse en β -glucanes et en mannanes que la fraction pariétale de la levure est utilisée en alimentation des poissons d'élevage. En effet, les β -glucanes et mannanes d'origine levurienne sont les principaux immunostimulants utilisés en aquaculture dans le cadre de la gestion des maladies (voir section « **Les immunostimulants** », p. 76). La plupart des études sur l'intérêt des parois de levure en nutrition se focalisent sur l'utilisation des β -glucanes et des MOS (« *mannan-oligosaccharides* ») extraits et isolés de la paroi entière (Torrecillas et

al., 2014) mais l'inclusion de la fraction pariétale entière dans les aliments aquacoles s'avère également efficace pour stimuler l'immunité des poissons et leur résistance aux pathogènes.

Pal et al. ont évalué les propriétés immunostimulantes de parois de levure et la persistance des effets sur certains paramètres immunitaires chez la carpe indienne labéo roho. Pour cela, les poissons ont été nourris avec un aliment supplémenté avec 0,5 % de paroi de levure pendant 15 jours puis nourris avec un aliment non supplémenté pendant 20 jours afin d'évaluer la persistance des effets observés. La production de ROS par les leucocytes, l'activité phagocytaire et la production de dioxyde d'azote par les leucocytes, ainsi que la prolifération des leucocytes dans la partie antérieure du rein présentaient un pic après 10 jours de réalimentation avec un aliment non supplémenté. Malgré une légère baisse au 20^{ème} jour de réalimentation, les effets immunostimulants de la levure étaient toujours supérieurs au groupe contrôle ayant été nourris en continu avec un régime non supplémenté. Chez la carpe indienne, les bénéfices d'une supplémentation en paroi de levure dans l'alimentation peuvent donc persister dans le temps et une supplémentation ponctuelle peut être suffisante pour maintenir les effets immunostimulants (Pal et al., 2007).

Les parois de levure peuvent également être utilisées pour améliorer la résistance à des pathogènes. Abu-Elala et al. ont observé une augmentation du nombre de leucocytes et de la globuline plasmatiques chez le tilapia du Nil nourri avec des aliments supplémentés avec 0,1 % ou 0,2% de paroi de levure. Les activités plasmatiques de la catalase, de la glutathion peroxydase, du lysozyme et des monocytes étaient plus élevées chez les tilapias nourris avec le régime supplémenté à 0,2 %. De plus, ces poissons présentaient une surexpression des cytokines proinflammatoires TNF- α et IL1- β dans le rein et la rate. Malgré cela, l'ajout de paroi de levure a amélioré la survie des poissons exposés à *L. graviae* et *A. hydrophila*, quel que soit le niveau de supplémentation (Abu-Elala et al., 2018). Les saumons Atlantique élevés en mer sont souvent exposés à des infections cutanées par des poux de mer (*Lepeophtheirus salmonis*). Micallef et al. ont montré qu'une alimentation enrichie avec 0,4 % de paroi de levure et 0,1 % de FOS permettait d'augmenter l'abondance de la protéine calréticuline-like dans le mucus et la peau des saumons. Cette protéine est impliquée dans la synthèse de mucus et dans l'activation de la voie des lectines du complément (**Figure 11, p. 63**). Ainsi, la stimulation de la production de mucus et l'activation de la voie du complément par le biais de l'ajout de paroi de levure dans l'aliment pourrait conférer une meilleure résistance aux poissons dans le cadre d'infections parasitaires (Micallef et al., 2017). A l'inverse, l'ajout de 1 % de fraction pariétale de levure dans le régime de l'esturgeon *Acipenser persicus* n'a pas conféré une meilleure résistance à *Aeromonas hydrophila* aux poissons bien que l'activité de certains marqueurs immunitaires ait été stimulée dans le mucus et le plasma (Yousefi et al., 2020). Ces deux études contradictoires montrent toutefois que les effets immunostimulants des

parois de levure peuvent être différents en fonction des espèces de poissons, de la fenêtre d'administration avant l'infection et du type de pathogène.

Effets de l'utilisation de la fraction cytosolique de la levure en nutrition aquacole

A l'inverse de la fraction pariétale, les extraits de levure que nous appellerons aussi « fractions cytosoliques », sont moins utilisés en aquaculture et les études considérant exclusivement la fraction cytosolique sont moins courantes. Néanmoins, des études réalisées sur plusieurs espèces de crustacés et de poissons ont montré que l'utilisation d'extraits de levure en tant qu'additif fonctionnel dans l'aliment permettait d'améliorer les performances de croissance et de reproduction, la digestibilité des nutriments, ainsi que de stimuler les fonctions immunitaires (Glencross et al., 2020b).

De manière générale, les études évaluant les bénéfices d'une supplémentation en extrait de levure chez les crustacés s'accordent sur l'intérêt de leur utilisation pour augmenter les performances zootechniques et reproductrices, stimuler les réponses immunitaires et améliorer la résistance des organismes contre des pathogènes. Chez la crevette à pattes blanches (*Litopenaeus vannamei*), une supplémentation de 2 % d'un extrait de levure permet d'augmenter le gain de poids (Zheng et al., 2021). Cette supplémentation stimule également les défenses antioxydantes en augmentant les activités de la catalase et de la glutathion peroxydase et conduit à un enrichissement de la diversité du microbiote intestinal. Deux études menées par Shehata et al. ont démontré que l'ajout de 1 % d'extrait de levure combiné à des vitamines, de l'acide arachidonique, des microalgues et des nucléotides dans l'alimentation de l'écrevisse bleue (*Cherax quadricarinatus*) conduisait à de meilleures performances de croissance et de reproduction (développement ovarien plus élevé) mais aussi à une augmentation des fonctions antioxydantes (Shehata et al., 2022, 2020). Chez la crevette japonaise tigrée (*Penaeus japonicus*), l'utilisation d'un aliment comprenant 5 % d'un extrait de levure riche en nucléotides (36,7 %) améliore le taux de survie de cette espèce lors d'une infection par le pathogène *Vibrio nigripulchritudo*, par rapport à des crevettes dont le régime n'a pas été supplémenté en extrait de levure. Cette amélioration de la survie s'accompagne d'une surexpression de gènes associées à des protéines et des peptides antimicrobiens ainsi que d'une augmentation du lysozyme dans les tissus lymphoïdes. Ces résultats confirment donc qu'un extrait de levure riche en nucléotides possède des propriétés immunostimulantes qui permettent aux organismes de faire face à une attaque pathogène (Biswas et al., 2012).

Les effets bénéfiques de l'utilisation d'extraits de levure dans les aliments pour poissons sont néanmoins variables en fonction des espèces et des niveaux d'inclusion. Chez le tilapia du Nil, l'inclusion d'un extrait de levure riche en nucléotides à différents pourcentages (1, 2, 4, 6 et 8 %) est positivement

corrélée à la prise alimentaire, au gain de poids et aux quantités plasmatiques de thrombocytes, de leucocytes et de monocytes. Ces résultats confirment le caractère appétant et les propriétés immunostimulantes des extraits de levure (Berto et al., 2016). Cependant, il n'a pas été observé d'effet bénéfique de l'inclusion d'1% d'extrait de levure dans l'aliment sur la production des principales populations de leucocytes immunitaires (leucocytes totaux, neutrophiles, lymphocytes, monocytes) chez la truite arc-en-ciel. Dans cette étude, les poissons nourris avec l'aliment contenant 1 % d'extrait de levure présentaient néanmoins une augmentation des activités plasmatiques du lysozyme et du complément, ainsi que des niveaux d'anticorps plasmatiques plus élevés. Cette étude réalisée sur 60 jours suggère qu'une longue période d'alimentation avec un additif immunostimulant n'implique pas forcément d'immunosuppression chez la truite (Tukmechi, 2013). Comme la plupart des immunostimulants, ces extraits cytosoliques de levures sont inclus en très petites quantités dans les aliments aquacoles en raison de leurs prix élevés mais également parce que des niveaux d'inclusion trop importants réduisent les performances des poissons. Ces effets négatifs sur la croissance sont généralement attribués à la forte présence d'azote non protéique sous forme d'acides nucléiques, à la carence en certains acides aminés (**Figure 16, p. 90**) ou encore à une immunosuppression. C'est notamment ce qui a été observé par Andrews et al. (2009). Leur étude démontre que l'ajout de 1 % d'un extrait de levure dans l'alimentation de la carpe indienne labéo roho améliore les performances de croissance et augmente la quantité de leucocytes, de globuline ainsi que l'activité de l'explosion oxydative dans le plasma. En revanche, avec une concentration en extrait de levure plus élevée (4 %), les auteurs observent une réduction des performances de croissance ainsi qu'une baisse des principaux paramètres plasmatiques considérés. Cette immunosuppression associée au niveau d'inclusion de 4 %, s'est également traduite par une mortalité plus importante lors d'une exposition à la bactérie *Aeromonas hydrophila*. A l'inverse, chez le sandre doré Européen (*Sander lucioperca*), une supplémentation en extrait de levure de 4 % a réduit la mortalité de 15 % suite à une exposition au pathogène *Aeromonas salmonicida*. L'amélioration de la résistance au pathogène était associée à la stimulation de facteurs impliqués dans l'immunité plasmatique et cellulaire, se traduisant par une augmentation du lysozyme et des immunoglobulines, une augmentation de l'activité des phagocytes et des macrophages ainsi qu'une hausse de la prolifération des lymphocytes B et T. Ces résultats sont attribués aux nucléotides provenant de l'extrait de levure utilisé en supplémentation (Jarmołowicz et al., 2013). Dans l'ensemble, les bénéfices observés sont souvent associés à la présence de nucléotides mais les extraits de levure sont également riches en petits peptides dont les bénéfiques ont été démontrés en nutrition humaines et animales (Hou et al., 2017) (voir la section « **Propriétés nutritionnelles et bioactives des fractions pariétales et cytosoliques des levures** », p. 86). Au même titre que les parois de levure, il est important de garder à l'esprit que les propriétés immunostimulantes des

extraits de levure peuvent varier en fonction des espèces de poissons, des niveaux d'inclusion, de la fenêtre d'administration avant l'infection et du type de pathogène.

CHAPITRE 2

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le développement de l'aquaculture est aujourd'hui freiné par des contraintes environnementales qui forcent le secteur à se tourner vers la formulation d'aliments alternatifs sans farines et huiles de poissons. La substitution des ingrédients marins par des matières premières végétales a été rendue possible au-delà de certains seuils sans affecter les performances de croissance et sans augmenter le coût de l'aliment. Chez les espèces carnivores telle que la truite arc-en-ciel, les limites à l'utilisation de régimes strictement végétaux résident principalement dans leurs propriétés nutritionnelles (présence de facteurs antinutritionnels, fortes teneurs en glucides et déséquilibre prononcé en acides aminés essentiels). Depuis la réautorisation de l'utilisation des coproduits animaux de type 3 dans les aliments aquacoles en 2013, les protéines animales transformées issues d'animaux non ruminants et principalement de volaille, constituent des candidats intéressants pour remplacer les farines de poissons. Dans un contexte de réduction de l'impact environnemental de l'aquaculture, l'utilisation de coproduits industriels dans la formulation des aliments aquacoles paraît par ailleurs pertinente. Néanmoins, leur utilisation en nutrition animale reste aujourd'hui encore vivement critiquée au niveau sociétal.

Ce projet de thèse s'intègre dans une volonté d'améliorer l'efficacité de régimes végétaux intégrant des protéines animales transformées mais totalement dépourvus de farines de poissons. La voie d'amélioration proposée dans le cadre de ce projet est l'utilisation d'un extrait de levure riche en protéines, en nucléotides, en petits peptides et en acides aminés libres, apporté dans l'aliment en faible pourcentage, en tant qu'additif fonctionnel. Dans le but d'évaluer les effets de la supplémentation en extrait de levure chez la truite arc-en-ciel, le travail de thèse s'est articulé autour de deux grands axes dont les objectifs étaient :

Axe 1 : Evaluer la valeur nutritionnelle et les effets à long-terme d'une supplémentation en extrait de levure sur les performances zootechniques et décrypter les mécanismes à l'origine des phénotypes observés.

Afin d'évaluer la valeur nutritionnelle des régimes et les performances zootechniques associées à ces régimes, une étude préliminaire en culture cellulaire et deux expérimentations *in vivo* ont été conduites :

1. Evaluation en culture cellulaire de la tolérance des entérocytes de truite arc-en-ciel vis-à-vis de l'extrait de levure à travers un essai de prolifération cellulaire ;

2. Mesure de la valeur nutritionnelle des régimes expérimentaux à travers un essai de digestibilité des aliments ;
3. Mesure des performances zootechniques au cours d'un essai de croissance de 12 semaines durant lequel les truites ont été nourries avec les aliments expérimentaux.

Des échantillons biologiques ont été prélevés au terme de l'expérimentation de croissance et diverses analyses ont été effectuées afin d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans les phénotypes observés. Ces analyses ont concerné l'évaluation de l'intégrité intestinale et des réponses inflammatoires systémiques et locales au niveau de l'intestin. Afin d'évaluer les mécanismes régulés par ces régimes, une recherche sans a priori a également été réalisée par le biais d'un séquençage à haut débit des ARNs et microARNs du foie et de l'intestin distal, constituant deux tissus clés impliqués dans le métabolisme, la physiologie digestive et l'immunité.

Axe 2 : Déterminer si les effets observés à long-terme résultent d'une réponse précoce des truites aux aliments expérimentaux.

Suite aux résultats obtenus dans les essais de l'Axe 1, l'hypothèse qu'une réponse précoce des truites aux aliments expérimentaux pouvait être à l'origine des effets observés à long-terme a été proposée. Afin d'évaluer les effets précoces des aliments expérimentaux utilisés dans l'essai de croissance, des poissons naïfs vis-à-vis des aliments expérimentaux ont été mis à jeun pendant 4 jours puis réalimentés pendant 8 jours. Des échantillons biologiques ont été prélevés après 2 jours, 5 jours et 8 jours d'alimentation. Les analyses conduites ont concerné l'évaluation de la réponse inflammatoire systémique et intestinale. Afin d'évaluer si les régulations transcriptionnelles observées à long terme résultaient d'une régulation précoce, l'expression des gènes mis en évidence lors de l'analyse transcriptomique du foie et de l'intestin ont été analysés en qPCR.

CHAPITRE 3

PLANS EXPÉRIMENTAUX ET METHODOLOGIE

1. Travaux préliminaires : culture cellulaire d'une ligne intestinale de truite arc-en-ciel et essai de prolifération en présence d'extrait de levure

La lignée cellulaire RTGUT-GC, dérivée de l'intestin distal de truite arc-en-ciel, a été utilisée dans le cadre d'essais préliminaires. Ces essais visaient à évaluer si l'extrait de levure (Prosaf®, Phileo by Lesaffre), utilisé dans le cadre de cette thèse, était toléré par les cellules intestinales et pouvait favoriser la prolifération cellulaire. Les cellules adhérentes RTGUT-GC ont été cultivées à 18 °C, en présence de milieu de culture Leibovitz (L-15) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FBS), 1 % d'antibiotique (100 unités de pénicilline/mL et 100 g de streptomycine/mL) et de 25 mM de tampon HEPES. Ce milieu de culture a été remplacé tous les deux jours et les cellules ont été repiquées dans un milieu de culture neuf à 80% de confluence.

Mesure de prolifération cellulaire

Les mesures de prolifération cellulaire nécessitent que les cellules aient atteint un niveau de confluence estimé visuellement à 80 %. A ce stade, les cellules adhérentes sont détachées de la paroi de la flasque à l'aide de trypsine (0,25 %), comptées à l'aide d'un cellomètre K2 (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, Etats-Unis) puis ensemencées dans des plaques 12 puits à hauteur de 100 000 cellules par puits. Les cellules sont incubées à 18°C pendant 48 heures durant lesquelles le milieu de culture (milieu L-15) est renouvelé une fois. Les cellules ont ensuite été rincées à deux reprises avec du PBS (tampon phosphate salin) avant d'être exposées à différents traitements.

Les traitements utilisés dans le cadre de l'essai de prolifération étaient constitués (1) d'un milieu complet L-15 (contrôle positif), (2) d'un milieu carencé en acides aminés HBSSc (solution saline équilibrée de Hanks, 25 mM de glucose, 1 mM d'HEPES, sodium pyruvate, 4 nM d'insuline, 10 % de FBS dialysé et 1 % d'antibiotique), (3) d'un milieu salin totalement carencé HBSS (solution saline équilibrée de Hanks) et (4) et (5) de deux milieux carencés en acides aminés mais supplémentés en extrait de levure (YE) à deux concentrations différentes, 1X et 0,3X (HBSS_{CYE-1X}, HBSS_{CYE-0,3X}). La concentration 1X à 1,7 mg/mL a été déterminée en se basant sur le profil moyen en acides aminés d'un milieu essentiel minimum (MEM) utilisé pour la culture d'hépatocytes et le profil en acides aminés d'une solution à 10 mg d'extrait de levure/mL (concentration choisie de manière arbitraire) (**Tableau 11, p. 101**). Les calculs ont été basés sur le profil en acides aminés du milieu de culture destiné aux hépatocytes car les essais ont été initiés sur cette lignée cellulaire mais n'ont pas abouti. La concentration à 0,3X a été utilisée afin d'évaluer l'effet dose-réponse. Les entérocytes ont été exposés à ces différents traitements pendant 7 jours et des comptages de cellules ont été réalisés aux jours 1, 5 et 7 pour les traitements L-15, HBSS_{CYL}.

1X, HBSS_{CEL-0,3X} et HBSSc, avec un cellomètre K2 (Nexcelom Bioscience LLC, Etats-Unis). Les cellules traitées avec le milieu HBSS ont été comptées uniquement aux jours 1 et 7. Chaque plaque contenait des triplicats techniques (3 puits par condition) et l'expérience a été répétée quatre fois afin de constituer des répliques expérimentaux (**Figure 17, p. 102**). La prolifération cellulaire aux jours 5 et 7 a été normalisée par rapport au jour 1.

Tableau 11 Teneurs en acides aminés dans la solution contenant l'extrait de levure (YE) utilisée dans l'essai de prolifération d'entérocytes et dans le milieu de culture MEM.

Acides aminés	Teneurs dans YE (%)	Masse molaire (g/mol)	Teneurs dans une solution à 10 mg/mL ¹ (mM)	Teneurs dans le MEM (mM)	Ratio
Arginine	2,9	211	1,37	0,6	2,3
Glutamate + glutamine	10,9	146	7,47	2	3,7
Histidine	1,2	210	0,57	0,2	2,9
Isoleucine	2,7	131	2,06	0,4	5,2
Leucine	3,8	131	2,90	0,4	7,3
Lysine	4,3	183	2,35	0,4	5,9
Méthionine	0,8	149	0,54	0,1	5,4
Phénylalanine	2,3	165	1,39	0,1	13,9
Thréonine	2,6	119	2,18	0,4	5,5
Tryptophane	0,7	204	0,34	0,049	7,0
Tyrosine	1,7	225	0,76	0,23	3,3
Valine	3,2	117	2,74	0,39	7,0
				Ratio moyen²	5,8

¹ 10 mg YE/mL : concentration arbitraire.

² Le ratio moyen a été utilisé afin de calculer la concentration en YE permettant de se rapprocher des valeurs en acides aminés d'un milieu complet MEM.

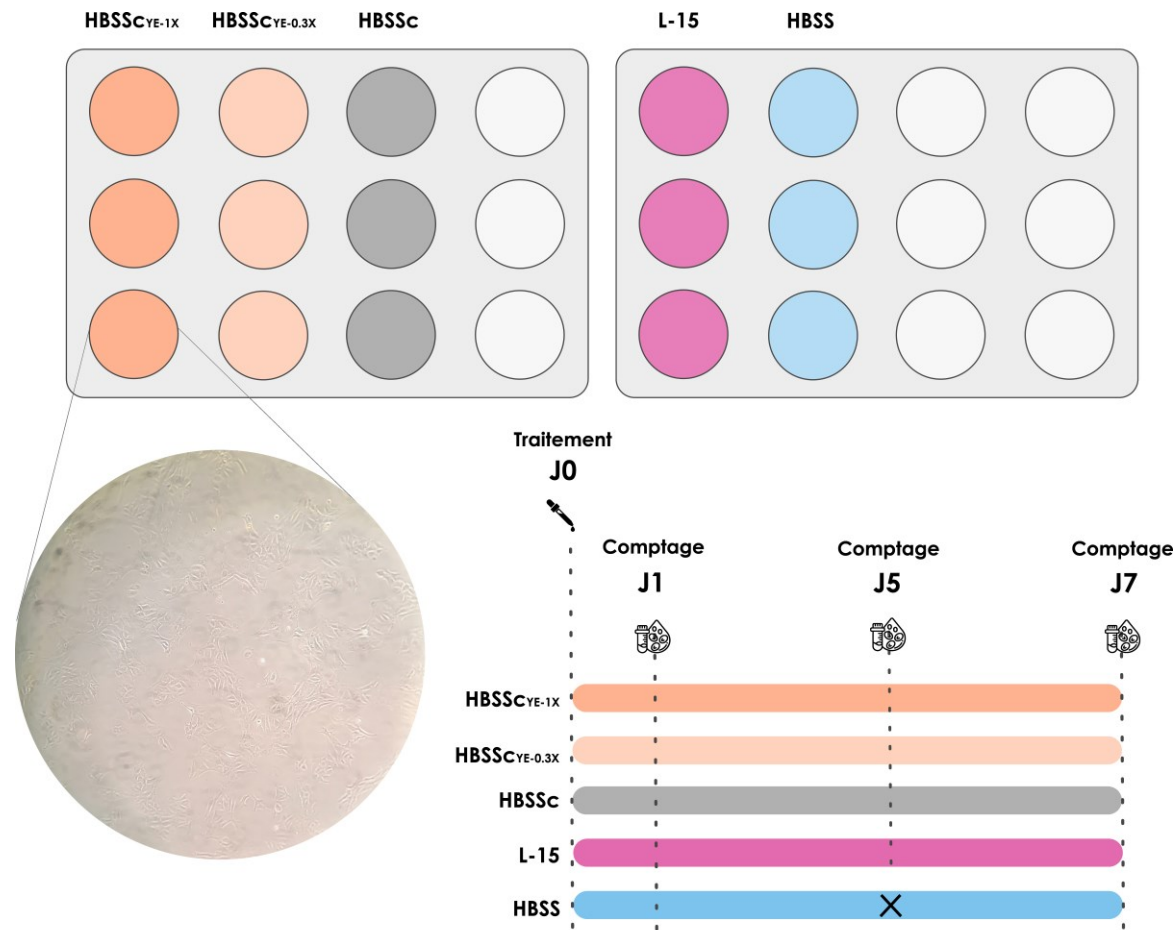


Figure 17 Schématisation de l'essai de prolifération cellulaire en présence d'extrait de levure (YE) dans un milieu carencé en acides aminés.

2. Formulation et production des aliments expérimentaux

Afin d'évaluer les avantages d'une supplémentation de l'extrait de levure (Prosaf®, Phileo by Lesaffre) dans un régime sans farine de poisson, trois aliments ont été formulés à l'aide du logiciel Alix. La composition du produit levurien utilisé est détaillée dans le **Tableau 12 (p. 104)** et de la **Figure 18 (p. 106)**. Les aliments ont été conçus afin d'être iso-protéiques, iso-lipides et iso-énergétiques (**Tableau 13, p. 105**). Les granulés ont été fabriqués dans les installations expérimentales INRAE à Donzacq (Landes, France) en trois étapes : (1) extrusion et granulation du mélange des différents ingrédients sans les huiles, (2) séchage des granulés extrudés et (3) ajout du mélange d'huiles par enrobage sous vide (**Figure 19, p. 106**).

Les régimes se différençaient principalement par l'origine des sources protéiques. Le régime contrôle (CTL), composé de 19,0 % de farine de poissons et de 7,0 % d'huile de poissons a été formulé pour se rapprocher d'un aliment commercial classique. L'aliment à base de protéines animales transformées (PAP) était composé de 10 % de protéines de volaille déshydratées, 6 % de farine de plumes hydrolysées et 1 % de farine de sang de volaille et de porc ainsi que de 71,1 % d'ingrédients végétaux (gluten de maïs, concentré protéique de soja, farine de soja, farine de féverole, farine de blé entier et huile de colza). Comparé au régime CTL, le régime PAP contenait plus de gluten de maïs mais moins de soja, de féverole et de blé entier. L'aliment PAP+YE comportait également 17 % de protéines animales transformées et 67,8 % d'ingrédients végétaux, mais était supplémenté avec un extrait de levure (YE) à hauteur de 3 % (**Tableau 12, p. 104** et **Figure 18, p. 106**). L'extrait de levure étant riche en protéines (71,6 %), la formulation a été ajustée en diminuant les apports en gluten de maïs et farines de soja et de féverole et en augmentant ceux du concentré protéique de soja et du blé entier. Les apports en lipides étaient assurés par de l'huile de colza et de l'huile de poisson dans les trois régimes et s'élevaient à 19,7 % pour le régime CTL et 18,4 % pour les régimes PAP et PAP+YE. Les teneurs en huile de colza étant plus faibles dans les régimes à base de protéines animales transformées (10,5 %) que dans le régime CTL (12,2 %), les teneurs en huiles ont été rehaussées avec l'ajout de 7,9 % d'huile de poissons dans les aliments PAP et PAP+YE (7,0 % d'huile de poissons dans le régime CTL) afin de ne pas déséquilibrer les profils en acides gras essentiels. Chaque aliment comportait également des vitamines et des minéraux apportés sous forme de prémix à hauteur de 1,0 % chacun. Les profils en acides aminés ont été équilibrés afin de couvrir les besoins des poissons en rajoutant des acides aminés essentiels sous forme libre (L-lysine et L-méthionine) dans les régimes PAP et PAP+YE. En tenant compte des prix des matières premières de 2020, année durant laquelle les aliments ont été fabriqués, les coûts respectifs des aliments expérimentaux avaient été évalués à 0,85 €/kg pour les régime CTL et PAP+YE, et à 0,73 €/kg pour le régime PAP.

Tableau 12 Composition de l'extrait de levure (YE) (Prosaf®, Phileo by Lesaffre, Marcq-en-Barœul, France).

Nutriment	YE
Matières sèche (MS, en %)	95,7
Protéine brute (en % MS)	71,6
Lipides brutes (en % MS)	< 0,5
Cendres (en % MS)	8,9
Energie (en kJ/g MS)	20,1
Nucléotides totaux (en % MS)	8,7
Phosphore (en g/kg MS)	13,8
Acides aminés (en % MS)	
<i>Arginine</i>	3,1
<i>Histidine</i>	1,3
<i>Isoleucine</i>	2,8
<i>Leucine</i>	4,0
<i>Lysine</i>	4,6
<i>Thréonine</i>	2,7
<i>Valine</i>	3,6
<i>Méthionine</i>	0,9
<i>Cystéine</i>	0,8
<i>Phénylalanine</i>	2,3
<i>Tyrosine</i>	2,0
<i>Tryptophane</i>	0,8
<i>Alanine</i>	4,5
<i>Acide aspartique</i>	6,4
<i>Acide glutamique</i>	12,0
<i>Glycine</i>	2,8
<i>Proline</i>	2,9
<i>Sérine</i>	2,7

Tableau 13 Formulation et composition proximale des aliments expérimentaux.

	CTL	PAP	PAP+YE
<i>Ingrédient (en %)</i>			
Gluten de maïs	15,0	17,9	16,0
Concentré protéique de soja	14,0	11,0	12,0
Farine de soja	12,0	10,5	8,3
Farine de féverole	8,0	12,0	8,0
Blé entier	10,8	9,2	13,0
Farine de poissons	19,0	-	-
Protéines de volaille déshydratées	-	10,0	10,0
Farine de plumes hydrolysées	-	6,0	6,0
Farine de sang de porc et de volaille	-	1,0	1,0
Huile de colza	12,2	10,5	10,5
Huile de poisson	7,0	7,9	7,9
Extrait de levure (YE) ¹	-	-	3,0
L-lysine	-	0,3	0,5
L-méthionine	-	0,3	0,3
Lécithine de soja	-	0,5	0,4
Mix vitaminique ²	1,0	1,0	1,0
H ₃ PO ₄	-	1,0	1,0
Mix de minéraux ³	1,0	1,0	1,0
Yttrium ⁴	0,1	0,1	0,1
<i>Composition proximale⁵</i>			
Matière sèche (MS, en %)	97,1	97,4	97,2
Protéine (en %MS)	46,9	46,5	46,3
Lipides (en %MS)	22,1	21,6	20,8
Energie (en %MS)	25,0	25,1	24,9
Cendres (en %MS)	6,76	5,53	5,59
Amidon (en %MS)	12,1	13,5	14,2

¹Prosaf®, Phileo by Lesaffre.

²Pour 100 g de mix: 500 000 UI de vitamine A, 250 000 UI de vitamine D3, 500 mg de vitamine E, 1 429 mg de vitamine C, 10 mg de vitamine B1, 50 mg de vitamine B2, 100 mg de vitamine B3, 200 mg de vitamine B5, 30 mg de vitamine B6, 3 000 mg de vitamine B7, 100 mg de vitamine B8, 10 mg de vitamine B9, 100 mg de vitamine B12, 200 mg de vitamine K3, 10 mg d'acide folique, 100 mg de biotine, 16 700 mg de chlorure de choline et 76 921 mg de cellulose.

³Pour 100 mg de mix : 49 478 mg d'hydrogénophosphate de calcium, 21 500 mg de carbonate de calcium, 4 000 mg de chlorure de sodium, 9 000 mg de chlorure de potassium, 12 400 mg d'oxyde de magnésium, 2 000 mg de sulfate de fer, 900 mg de sulfate de zinc, 300 mg de sulfate de manganèse, 300 mg de sulfate de cuivre, 2 mg de chlorure de cobalt, 15 mg d'iodure de potassium, 5 mg de sélénite de sodium et 100 mg de fluorure de sodium.

⁴L'yttrium a été ajouté uniquement dans les aliments destinés à l'essai de digestibilité en tant que marqueur inerte.

⁵Valeurs analysées.

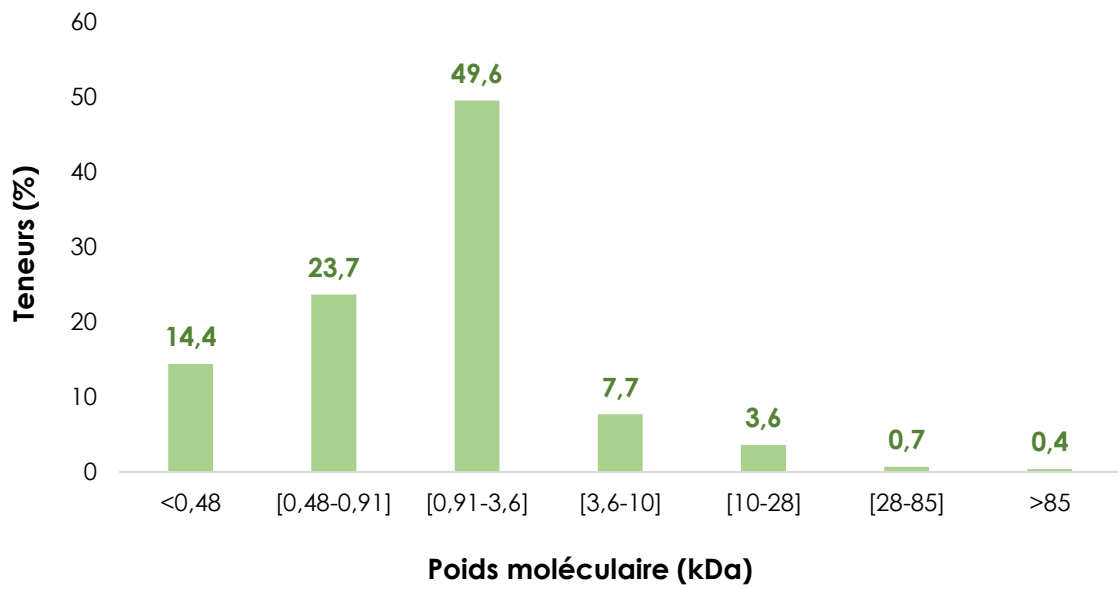


Figure 18 Distribution du poids moléculaire des peptides retrouvés dans l'extrait de levure Prosaf®.



1. Mélange des différents ingrédients sans les huiles



2. Extrusion et granulation du mélange



3. Séchage



4. Ajout du mélange d'huiles sous vide

Figure 19 Etapes de la fabrication des aliments expérimentaux.

3. Protocoles expérimentaux

a. Essai de digestibilité des aliments expérimentaux

La digestibilité des aliments expérimentaux a été évaluée selon la méthode développée par Choubert et al. et conduite au sein du plateau technique de l'INRAE de Saint Pée-sur-Nivelle (Nouvelle Aquitaine, France) (Choubert et al., 1982). Le système de collecte des fèces est composé de bacs cylindro-coniques d'un volume utile de 100 litres, alimentés en continu par une eau à température constante (4 L/min, 9 ppm d'oxygène dissout, $17 \pm 0,5$ °C) sous une photopériode de 12 heures. Chaque bac possède un système de filtration automatique à grilles rotatives permettant de retenir les fèces contenues dans l'eau de sortie des bassins (**Figure 20, p. 108**). La rotation des grilles permet ensuite de faire tomber les fèces dans un récipient collecteur. Le temps de séjour des fèces dans l'eau est très court (10 secondes maximum) grâce au débit d'eau continu qui entraîne rapidement les fèces vers le collecteur, évitant ainsi leur lessivage.

Neuf lots de 15 truites arc-en-ciel (100 ± 5 g) ont été répartis dans les bassins cylindro-coniques. Avant de collecter les fèces, les poissons ont été acclimatés à leurs régimes expérimentaux respectifs pendant une période de 15 jours (nourrissage deux fois par jour jusqu'à satiété visuelle). Les aliments expérimentaux ont été assignés aléatoirement aux bassins afin de constituer des triplicats expérimentaux. La formulation des aliments expérimentaux utilisés dans le cadre de l'évaluation de la digestibilité est détaillée dans le **Tableau 13 (p. 105)**. Chaque régime expérimental contenait 0,1 % d'yttrium qui est un marqueur inerte indigestible n'interférant pas avec les processus de digestion. Ce marqueur permet également d'estimer la prise alimentaire. Suite à la seconde période d'acclimatation, les truites ont continué à être nourries avec les régimes expérimentaux sur une période de quatre semaines durant laquelle les fèces ont été collectées quotidiennement avant le premier repas de la journée. Les fèces ont ensuite été regroupées par bassin puis stockées à -20°C jusqu'à leur analyse.

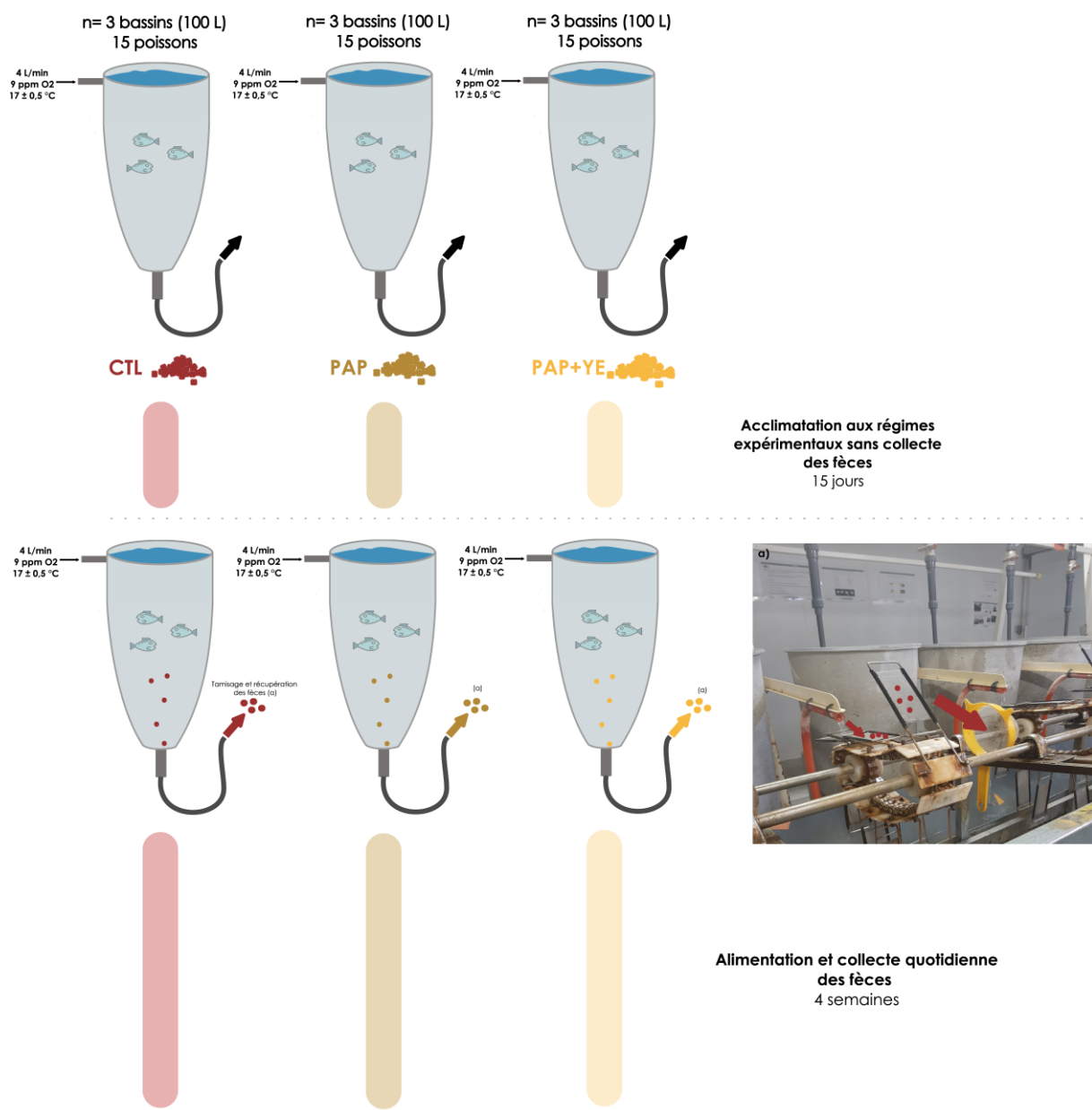


Figure 20 Expérience de digestibilité des aliments expérimentaux selon la méthode de tamisage automatique continue développée par Choubert et al. (Choubert et al., 1982).

CTL, aliment contrôle à base d'huile et de farines de poissons ; PAP, aliment dépourvu de farine de poisson composé de protéines animales transformées ; PAP+YE, aliment PAP supplémenté avec 3% d'un extrait de levure.

b. Evaluation des performances zootechniques à travers un essai de croissance de 12 semaines

Les performances zootechniques ont été évaluées au travers d'un essai de croissance conduit dans les installations expérimentales INRAE de Donzacq (Landes, France).

Au total, 189 juvéniles de truite arc-en-ciel (37 ± 2 g) ont été répartis en groupes de 21 poissons dans 9 bassins de 100 L chacun, alimentés par de l'eau douce naturelle à 17°C. Avant le début de l'essai de croissance, les animaux ont été acclimatés à leur environnement pendant 15 jours et nourris une fois par jour avec un aliment commercial. La période d'acclimatation permet de surveiller le potentiel développement de pathologies. A la fin de cette période, les régimes expérimentaux, de compositions identiques à ceux utilisés dans l'essai de digestibilité mais dépourvu d'yttrium (**Tableau 13, p. 105**), ont été répartis aléatoirement dans les bassins à raison de trois bassins par régime (**Figure 21, p. 111**). Avant la première alimentation avec les régimes expérimentaux, 1 poisson par bassin (soient 9 poissons au total) ont été prélevés afin d'analyser la composition corporelle initiale des poissons (matière sèche, cendres, protéines et lipides) selon les méthodes utilisées pour l'essai de digestibilité. Pendant 12 semaines, les poissons ont ensuite été élevés sous photopériode naturelle et nourris deux fois par jour jusqu'à satiété visuelle avec leurs aliments expérimentaux respectifs. Toutes les trois semaines, la quantité d'aliment distribuée ainsi que la biomasse totale par bassin ont été mesurées afin d'assurer le suivi de la croissance, de l'efficacité alimentaire et de la prise alimentaire journalière sur toute la période d'alimentation.

A la fin des 12 semaines d'alimentation, une partie des poissons a été anesthésiée (30 mg de benzocaïne/mL d'eau) puis euthanasiée (60 mg de benzocaïne/mL d'eau) 24 heures après le dernier repas. Trois poissons par bassin (soient 9 poissons par condition) ont été prélevés, mesurés, pesés et directement congelés (-20°C) afin de réaliser des analyses de composition corporelle. Quatre poissons additionnels par bassin (soit 12 poissons par condition) ont été utilisés afin de prélever le foie et l'intestin distal. Les poissons, le foie et les viscères ont été pesés afin de calculer les indices hépato-somatique et viscéro-somatique ainsi que le facteur de condition K. Les tissus ont ensuite été immergés dans une solution de RNA later afin d'éviter la dégradation de l'ARN puis directement immergés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses moléculaires. Une autre série de prélèvements a été réalisée 48 heures après le dernier repas afin de vider le contenu du tube digestif. Quatre poissons par bassin (soient 12 poissons par condition) ont été pêchés, anesthésiés puis euthanasiés afin de prélever le sang au niveau de la veine caudale à l'aide de seringues préalablement traitées à l'EDTA. Les échantillons de sang ont été centrifugés (3 000 g pendant 10 min) et les plasmas

sanguins ont été conservés à -20°C avant l'analyse des marqueurs immunitaires sériques. Sur ces mêmes poissons, la partie proximale et la partie distale de l'intestin ont été prélevées, fixées et conservées dans une solution de formaldéhyde à 10 % en prévision des analyses histologiques.

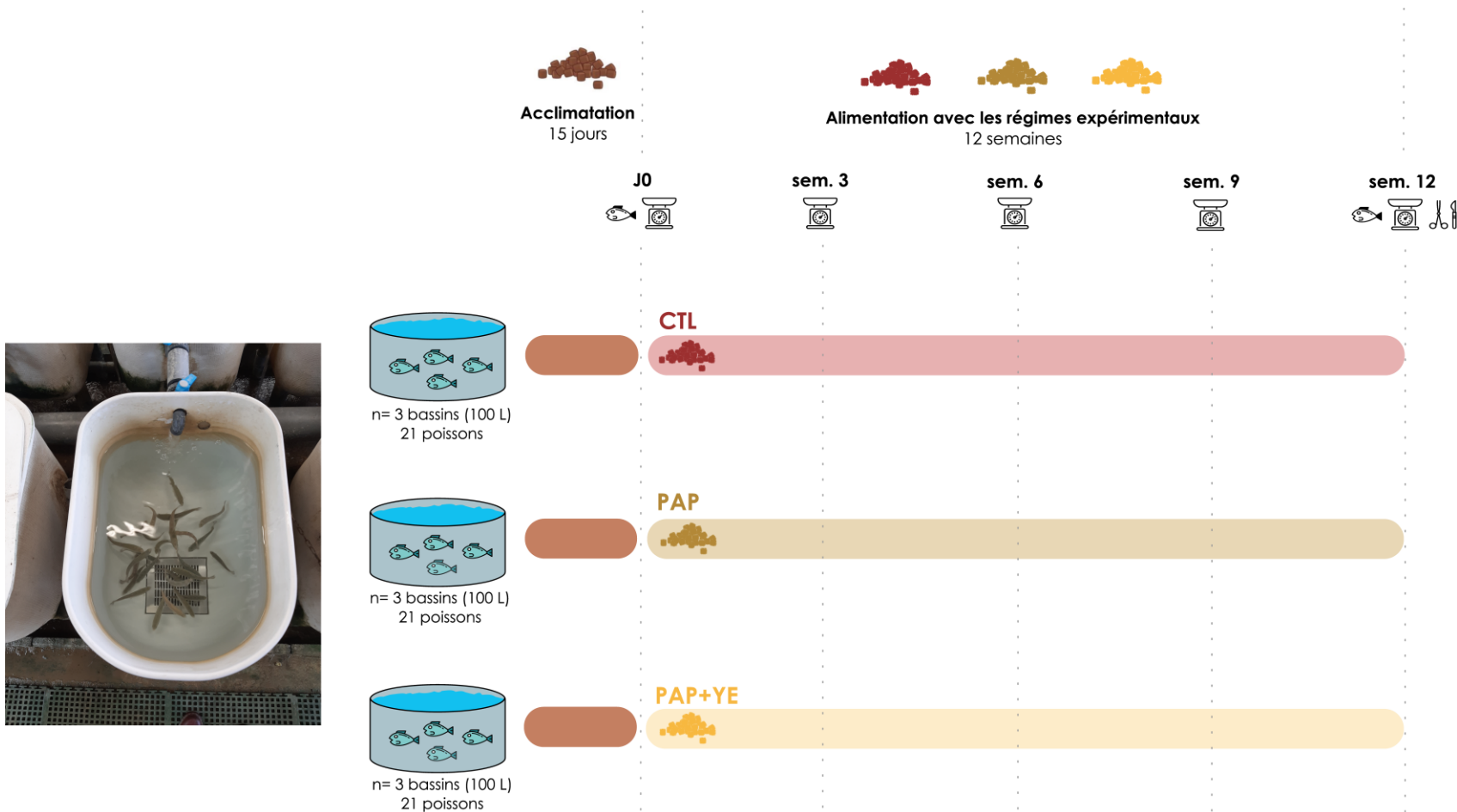


Figure 21 Schématisation de l'expérience de croissance de 12 semaines.

CTL, aliment contrôle à base d'huile et de farines de poissons ; PAP, aliment dépourvu de farine de poisson composé de protéines animales transformées ; PAP+YE, aliment PAP supplémenté avec 3% d'un extrait de levure

c. Cinétique de court terme

L'expérience de court terme a été réalisée dans les installations expérimentales INRAE de Donzacq (Landes, France). Les aliments testés dans le cadre de la cinétique étaient de composition identique à ceux utilisés pour l'essai de croissance (**Tableau 13, p. 105**).

Des truites arc-en-ciel (232 ± 39 g) ont été réparties en groupe de 30 poissons dans 4 bassins de 80 litres alimentés en continu avec de l'eau bien oxygénée et à température constante (17°C) (**Figure 22, p. 113**). Après la mise en lot, l'ensemble des poissons a été acclimaté à leur environnement et nourri avec un aliment commercial (T3P Omega, Skretting, Fontaine-les-Vervins, France) pendant 3 jours (distribution quotidienne à satiété visuelle). Ensuite, les poissons ont été mis à jeun pendant 4 jours afin de vider le tube digestif de son contenu et trois bassins ont été assignés aléatoirement à un régime expérimental (CTL, PAP ou PAP+YE). Les poissons ont alors été nourris pendant 8 jours jusqu'à satiété visuelle (2 fois par jour) avec leur régime respectif. Les poissons du quatrième bassin n'ont pas été nourris après la période de jeûne. Ces poissons ont été utilisés pour déterminer le jour 0 de la cinétique et servir de contrôle « jeûne ». Six individus ont été échantillonnés après anesthésie et euthanasie dans des bains successifs de tricaine (50 mg/L et 150 mg/L, respectivement). Après 2, 5 et 8 jours d'alimentation, les truites ont été anesthésiées et euthanasiées dans des bains successifs de tricaine à 50 mg/L puis 150 mg/L, six heures après le dernier repas. Au total, six poissons par bassin ont été échantillonnés pour chaque point de cinétique (soient 6 poissons par régime et par jour de prélèvement). Pour chaque point de prélèvement, des échantillons de foie et d'intestin distal ont été prélevés, trempés dans du RNA later puis immédiatement immergés dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C avant d'effectuer des analyses moléculaires. Des échantillons supplémentaires d'intestin proximal et distal ont été fixés dans une solution de formaldéhyde (10 %) pour la réalisation des analyses histologiques. Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine caudale à l'aide de seringues préalablement traitées à l'EDTA, centrifugés à 3000 x g pendant 10 minutes. Les plasmas ont ensuite été conservés à -20°C avant quantification des marqueurs immunitaires plasmatiques.

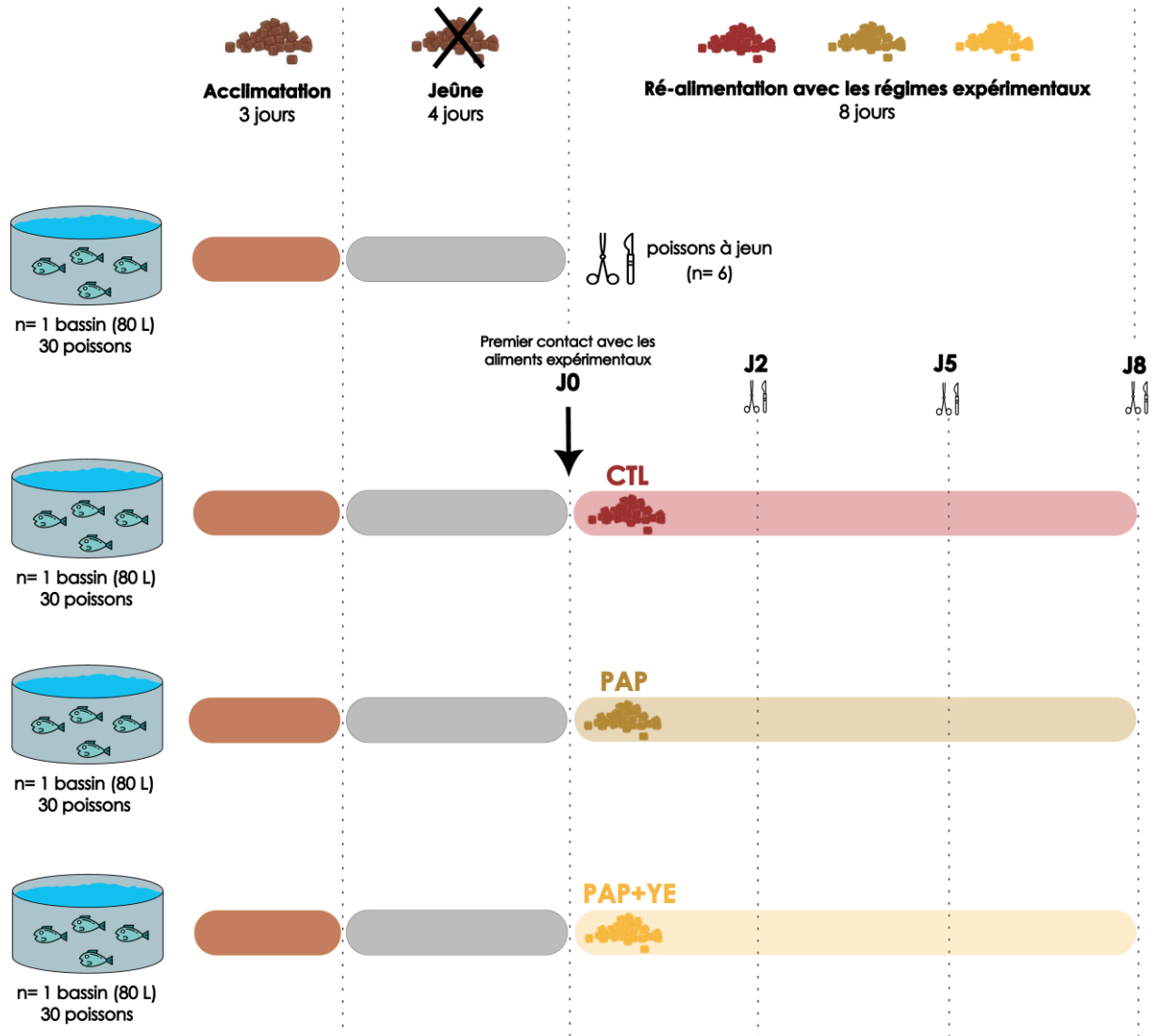


Figure 22 Schématisation du plan expérimental de la cinétique de court-terme.

CTL, aliment contrôle à base d'huile et de farines de poissons ; PAP, aliment dépourvu de farine de poisson composé de protéines animales transformées ; PAP+YE, aliment PAP supplémenté avec 3% d'un extrait de levure.

4. Protocoles analytiques

L'ensemble des protocoles analytiques utilisé dans l'essai de digestibilité, l'essai de croissance et la cinétique de court terme sont décrits de manière plus détaillée dans les sections « Matériel et méthodes » des deux articles de la thèse (**Article 1, p. 128 ; Article 2, p. 169**).

a. Mesure de la digestibilité des aliments expérimentaux

A la fin de l'essai de digestibilité, les fèces ont été regroupées par régime (n = 3 bassins par régime) et congelées à -20 °C. Les fèces ont ensuite été lyophilisées durant 34 heures en suivant des cycles successifs de congélation, de sublimation et de désorption (lyophilisateur SERAIL CS5-0,4). Les lyophilisats de fèces et les aliments expérimentaux ont été broyés afin d'en assurer l'homogénéité. Les teneurs en matières sèches ont été déterminées par dessiccation en étuve thermostatée (104 °C) pendant 24 heures. Les teneurs en cendres ont été déterminées par pesée après incinération d'échantillons de lyophilisats dans un four à cendres Lenton Furnaces (570 °C) pendant 7 heures. Les teneurs en yttrium ont été mesurées sur les cendres après digestion à l'acide HNO₃ en utilisant un spectromètre d'émission atomique à plasma micro-onde Agilent 4200 MP-AES. L'énergie brute a été mesurée par combustion adiabatique dans un calorimètre IKA C5003 à partir de la quantité de chaleur dégagée pendant la combustion complète des échantillons lyophilisés. Les teneurs en protéines brutes ont été quantifiées à partir du dosage de l'azote total effectué selon la méthode de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) à l'aide d'un appareil Kjeltex Tecator Auto 1030 Analyzer. Le dosage des lipides a été réalisé par séparation de phases et évaporation selon la méthode décrite par Folch et al. (Folch et al., 1957). Les teneurs en amidon ont été mesurées avec le kit Megazyme K-TSTA-100A en suivant les instructions du fournisseur. Enfin, les coefficients de digestibilité apparente (ADC) ont été calculés à l'aide de la méthode indirecte basée sur l'analyse de la teneur en yttrium (NRC, 2011) dans les fèces et les aliments, pour la matière sèche, les minéraux, l'énergie, les protéines, les lipides et l'amidon selon la formule de Maynard (Maynard, 1979).

b. Calculs de l'utilisation des nutriments contenus dans les aliments expérimentaux

Les compositions corporelles initiales et finales des truites (n = 9 poissons par régime) et la composition des aliments expérimentaux de l'essai de croissance ont été évaluées en suivant les

protocoles décrits pour l'essai de digestibilité. Les données relatives aux compositions proximales des aliments et corporelles des poissons, ainsi que les paramètres zootechniques relevés au cours de l'essai (quantité quotidienne d'aliment ingéré et biomasses initiales et finales) ont été utilisés afin de calculer l'utilisation des protéines, des lipides et de l'énergie contenus dans les aliments expérimentaux (équations 1 à 3).

$$X \text{ ingéré} = DFI \times \% X \text{ dans l'aliment} \quad (\text{Equation 1})$$

$$X \text{ gagné} = \frac{(X_{fin,poisson} \times biomasse \text{ finale} - X_{ini,poisson} \times biomasse \text{ initiale})}{\frac{(biomasse \text{ finale} + biomasse \text{ initiale})}{2} \times \Delta t \times 1000} \quad (\text{Equation 2})$$

$$X \text{ retenu} = \frac{X \text{ gagné}}{X \text{ ingéré}} \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

Avec DFI (Daily Feed Intake) la quantité d'aliment ingéré quotidiennement ; X le nutriment considéré ou l'énergie ; $X_{fin,poisson}$ et $X_{ini,poisson}$ les teneurs finales et initiales en nutriments ou énergie, respectivement.

c. Analyses histologiques de l'intestin

Des analyses histologiques ont été réalisées sur les parties proximales et distales des intestins prélevés 48 heures après le dernier repas pour l'essai de croissance (n = 12 poissons par régime) et 6 heures après le dernier repas pour la cinétique de court terme (n = 6 poissons par point de cinétique et par régime). Pour l'essai de croissance, les paramètres ayant été mesurés sont la hauteur, la largeur et l'aire des villosités intestinales ainsi que la densité des cellules à mucus. Les mesures structurelles de la muqueuse intestinale ont été réalisées avec le logiciel Toupview et les cellules à mucus ont été comptées manuellement. Pour la cinétique de court-terme, la hauteur et l'aire des villosités ainsi que la densité des cellules à mucus ont été évaluées automatiquement avec deux macros développées sur le logiciel FIJI 1,53t.

d. Dosage des marqueurs inflammatoires plasmatiques

La réponse immunitaire systémique a été évaluée à travers la quantification de quelques marqueurs de l'immunité sur les plasmas prélevés 48 heures après le dernier repas pour l'essai de croissance de 12 semaines (n = 12 poissons par régime) et 6 heures après le dernier repas pour la

cinétique de court-terme (n = 6 poissons par point de cinétique et par régime). Pour l'essai de croissance, les marqueurs immunitaires plasmatiques quantifiés étaient l'activité du lysozyme, l'activité de la peroxydase, l'activité de la voie alternative du complément ainsi que les niveaux totaux d'immunoglobuline M. Pour la cinétique de court terme, les marqueurs immunitaires quantifiés étaient l'activité du lysozyme, l'activité de l'antiprotéase, l'activité de la peroxydase et l'activité de la voie alternative du complément.

e. Analyses moléculaires

Analyse des transcriptomes hépatiques et intestinaux

Les analyses transcriptomiques (ARN et microARN) ont été réalisées sur le foie et l'intestin distal de 6 poissons par régime. Les protocoles détaillés sont décrits dans l'Article 1 de la thèse (p. 128) et les différentes étapes de l'analyse transcriptomique sont résumées dans la **Figure 23** (p. 118).

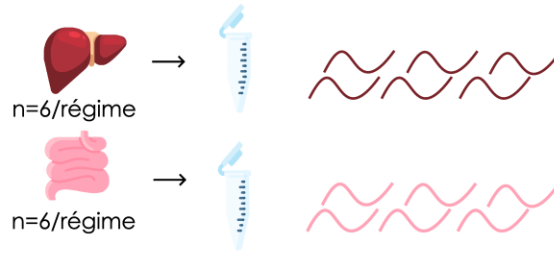
Brièvement, les ARNs totaux (ARNs et microARNs) ont été extraits sur les deux tissus à l'aide du kit miRNeasy Tissue/Cells Advanced (Qiagen, Hilden, Germany) et traités à la DNase avec le kit Turbo DNA-free (Invitrogen, USA). Les concentrations et la qualité des ARNs totaux ont été respectivement déterminées (Nanodrop® ND1000 spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) et préalablement vérifiées (Bioanalyzer, Agilent, USA et gel d'agarose 1 %) au sein du laboratoire de biologie moléculaire de l'INRAE de Saint Pée-sur-Nivelle (Nouvelle Aquitaine, France) (**Figure 23, Etape 1**).

La préparation et le séquençage des bibliothèques d'ADN complémentaire (ADNc) ont été réalisés par la plateforme MGX (Genomix, Montpellier, France). Les ARNs totaux ont été fragmentés afin d'obtenir des fragments de tailles comprises entre 200 et 300 paires de base (pdb) (**Figure 23, Etape 2**). Ces fragments ont ensuite été soumis à rétrotranscription et les ADNc ont été liés à des adaptateurs (**Figure 23, Etape 3**), puis amplifiés au cours de 13 cycles PCR pour les ARNs et 23 cycles pour les microARNs, pour former des bibliothèques (**Figure 23, Etape 4**). La qualité des amplicons a été vérifiée et les bibliothèques ont été séquencées par synthèse avec le système NovaSeq 6000 (Illumina) sur des SP Flow Cell de 2x150 pdb (**Figure 23, Etape 5**).

Les étapes suivantes d'analyse des données issues du séquençage ont été réalisées avec l'aide de la plateforme Sigenae (GenPhySE, INRAE, Castanet Tolosan, France). Le contrôle de la qualité et la quantification des transcrits ont été respectivement réalisés à l'aide du programme FastQ Screen (version 0.14, Babraham Bioinformatics, Royaume-Uni) et du pipeline Nextflow (version 20.11.0-edge) nf-core/rnaseq (revision 3.0). La cartographie des lectures et l'alignement des séquences sur le génome

de référence de la truite arc-en-ciel (Omyk_1.0.104) ont été réalisés avec le programme STAR (version 2.6.1d) du pipeline Nextflow nf-core/rnaseq (**Figure 23, Etape 6**). Les tables de comptages ont été générées à l'aide du logiciel RSEM (version 1.3.1). Les analyses d'expression différentielle des gènes et des microARNs ont été réalisées avec le programme DESeq 2 (version 1.32). Les gènes ou les séquences matures avec un taux de fausses découvertes (FDR) inférieur à 0,05 ont été conservés pour une analyse plus approfondie. L'analyse d'ontologie a été réalisée sur les gènes différentiellement exprimés en utilisant le logiciel R et le package topGO (**Figure 23, Etape 7**).

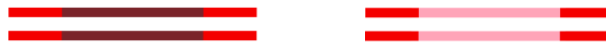
Etape 1 Extraction, quantification et vérification de la qualité des ARNs totaux



Etape 2 Fragmentation des ARNs totaux (200-300 pdb)



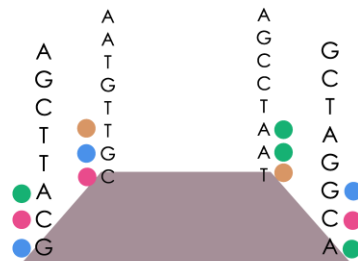
Etape 3 Retrotranscription de l'ARN en ADNc et ligation des extrémités à des adaptateurs



Etape 4 Amplification des séquences d'ADNc (PCR)



Etape 5 Séquençage des librairies (SNP flow cell, NovaSeq 6000, Illumina)



Etape 6 Contrôle de la qualité des séquences et quantification, alignement des séquences sur le génome de référence de la truite arc-en-ciel



Etape 7 Génération des tables de comptages et analyses des expressions différentielles des gènes et des séquences matures

Gène / miARN	Ech. 1	Ech. 2
X	30	7
Y	19	0
Z	24	22
...



Figure 23 Etapes de l'étude du transcriptome hépatique et de l'intestin distal *via* l'analyse par séquençage à haut débit.

Etude de l'expression de gènes par RT-qPCR

Pour la cinétique de court terme, l'expression d'un ensemble de gènes cibles a été étudiée par RT-qPCR selon le protocole suivant. Les ARNs totaux (n = 6 poissons par point de cinétique et par régime) du foie, de l'intestin proximal et de l'intestin distal ont été extraits, traités, quantifiés et leurs intégrités ont été vérifiées comme décrit pour l'étude transcriptomique. Brièvement, la synthèse d'ADNc a été réalisée sur 750 ng d'ARN en utilisant la reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen, Etats-Unis) et des amorces aléatoires (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Certains gènes différentiellement exprimés identifiés lors du séquençage à haut débit ainsi que certains marqueurs connus pour être impliqués dans les fonctions inflammatoires et immunitaires ont été sélectionnés afin d'en mesurer les expressions. Les amorces de ces gènes ont été développées, validées puis testées en qPCR sur des échantillons de foie, d'intestin proximale et d'intestin distal prélevés pour chaque point de cinétique, 6 heures après le dernier repas. Les gènes et les tissus dans lesquels les amorces ont été testées sont décrits dans le **Tableau 14 (p. 120)**.

Tableau 14 Liste des gènes dont les expressions ont été mesurées par RT-qPCR dans les différents tissus.

	Numéro d'accèsion NCBI	Foie	Intestin proximal	Intestin distal
Immunité et inflammation				
Complément C3 (<i>c3</i>)	XM_021561577.2	x	x	x
Protéoglycane-4 (<i>prg4</i>)	XM_036968497.1	x		
Alpha-2-macroglobuline (<i>a2m</i>)	XM_021587033.2	x		
Interleukine 1-béta (<i>il1-β</i>)	XM_021590496.2; AJ557021.2		x	x
Interleukine 6 (<i>il-6</i>)	NM_001124657.1		x	x
Interleukine 4 (<i>il-4</i>)	FN820500.1		x	x
Facteur de nécrose tumorale (<i>tnf-α</i>)	AJ278085.1; NM_001124357.1		x	x
Structure				
Protéine de jonction serrée 1a (<i>tjp1a</i>)	XM_036980662.1		x	x
Protéine de jonction serrée 3 (<i>tjp3</i>)	XM_031822609.1		x	x
Mucine 2 (<i>muc2</i>)	XM_036968565.1; XM_036968563.1		x	x
Claudine 15 (<i>cldn15</i>)	XM_036987534.1; XM_021615039.2		x	x
Aquaporine 7 (<i>aqp7</i>)	XM_021568669.2		x	x
Aquaporine 10a (<i>aqp10a</i>)	XM_021621544.2		x	x
Coagulation				
Membre 10 de la famille A des serpinés (<i>serpina10</i>)	XM_036954825.1; XM_036954823.1	x		
Fibrinogène (<i>fbg</i>)	XR_005053092.1; XM_036987044.1		x	x
Protéine CD9 (<i>cd9</i>)	NM_001124324.1		x	x
Protection cellulaire				
NADPH--cytochrome P450 reductase (<i>por</i>)	XM_021623734.2	x		
Myo-inositol oxygénase (<i>miox</i>)	XM_021572362.2	x		
Prolifération cellulaire				
Antigène nucléaire des cellules proliférantes (<i>pcna</i>)	XM_036936092.1		x	x
Antiviral				
Cholestérol 25-hydroxylase (<i>ch25h</i>)	XM_021564786.2		x	x
Stress du réticulum endoplasmique				
Sélénoprotéine S (<i>selenos</i>)	XM_036963928.1; XM_036981274.1		x	x

f. Analyses complémentaires : analyse peptidomique de l'extrait de levure

L'analyse peptidomique de l'extrait de levure a été réalisée par le biais d'une adaptation de la peptidomique classique n'utilisant pas de digestion enzymatique. L'analyse a consisté à appliquer une étape de réduction/alkylation avec un tampon 100 mM Tris (6 M chlorure de guanidinium, 10 mM TCEP et 40 mM chloracétamide, pH 8,5) sur 1 mg d'échantillon d'extrait de levure. Les peptides ont ensuite été purifiés avec une colonne C18, et quantifiés par spectrophotométrie à 214 nm avant l'analyse de 1 µg de peptides par nanoESI nanoRPLC MS/MS. Les analyses ont été réalisées en triplicats.

Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel PEAKS® (Bioinformatics Solution Inc.). Ce logiciel permet de faire correspondre les peptides identifiés au protéome de la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae* S288C, ainsi que de séquencer *de novo* les peptides non appariés à la base de données. La recherche des peptides bioactifs a été réalisée à partir des séquences exactes identifiées par le biais d'une recherche bibliographique et d'une sélection de peptides à partir de la base de données BIOPEP (Iwaniak et al., 2016).

CHAPITRE 4

RESULTATS

1. *In vitro* : prolifération d'entérocytes en présence d'extrait de levure dans un milieu carencé en acides aminés

a. Contexte et objectif

Des essais *in vitro* ont été mis en place afin d'évaluer la tolérance et la prolifération d'entérocytes de truite arc-en-ciel en présence d'un extrait de levure dans leur milieu de culture. La prolifération cellulaire a été évaluée à travers une cinétique durant laquelle les cellules ont été comptées aux jours 1, 5 et 7 suivant l'exposition aux milieux de culture supplémentés en extrait de levure (HBSS_{EL-1X} et HBSS_{EL-0,3X}). Le milieu L-15 constituait le contrôle positif puisqu'il s'agit d'un milieu complet utilisé en routine pour entretenir les cellules. Les milieux HBSSc et HBSS ont été utilisés afin d'évaluer respectivement l'effet d'un milieu carencé en acides aminés et celui d'un milieu totalement dépourvu d'acides aminés, de facteurs de croissance et de vitamines.

b. Résultats et éléments de discussion

Les milieux L-15, HBSSc et HBSS ont été utilisés comme contrôles. Contrairement aux milieux carencés HBSSc et HBSS, le milieu L-15 a induit une prolifération cellulaire des cellules RTGUT-GC sur une période d'exposition de 7 jours, comme l'indique la **Figure 24a (p. 124)**. Par ailleurs, le milieu totalement carencé HBSS semble avoir provoqué un début de mortalité cellulaire comme le montre la valeur de prolifération au jour 7 qui est inférieure à celle du jour 1 (**Figure 24b, p. 124**) (ANOVA 1 facteur, $p = 0,06$). Au jour 7, les proliférations étaient significativement plus importantes pour les cellules exposées aux milieux L-15 et HBSS_{EL-0,3X}, comparées aux proliférations des entérocytes exposés aux milieux HBSS_{EL-1X} et HBSSc (ANOVA 1 facteur, $p < 0,001$). Les proliférations cellulaires observées pour les milieux supplémentés en extraits de levure (1X et 0,3X) étaient supérieures à celles observées pour le milieu carencé en acides aminés. En revanche, l'induction de la prolifération cellulaire était variable en fonction de la dose d'extrait de levure utilisée et était significativement plus importante pour les cellules exposées à une concentration de 0,3X.

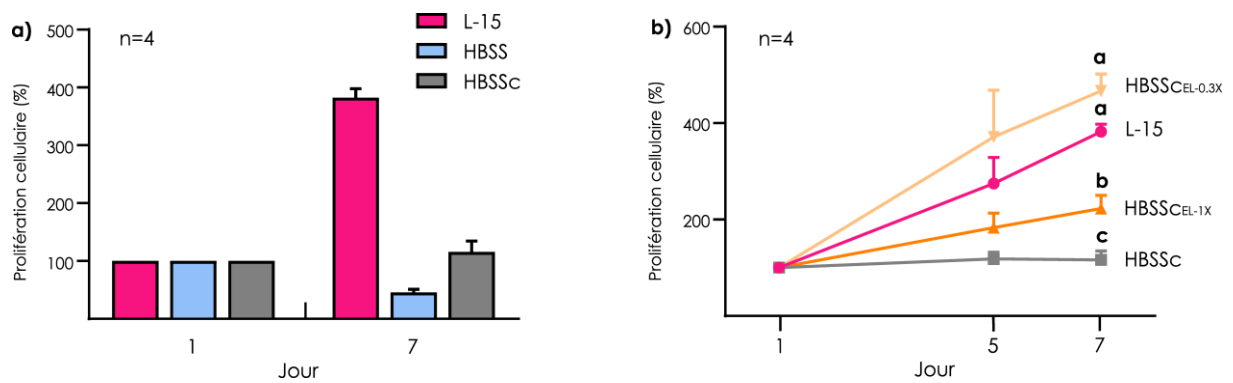


Figure 24 Prolifération cellulaire observée en milieux complets (L-15), milieux carencés en acides aminés supplémentés en extrait de levure (HBSSc_{EL-1X} et HBSSc_{EL-0,3X}) et milieu salins (HBSS)

Les données représentent la prolifération cellulaire normalisées par rapport à J1 et sont représentées par les moyennes des répliques techniques (n=4) ± SEM.

Cet essai préliminaire nous a permis de confirmer que l'extrait de levure pouvait être utilisé dans l'alimentation de la truite arc-en-ciel et était bien toléré par les entérocytes. De plus, cet essai *in vitro* a suggéré que l'ajout de l'extrait de levure dans un milieu carencé en acides aminés permettait de palier à l'absence d'acides aminés dans le milieu de culture HBSSc. Les acides aminés apportés par l'extrait de levure semblent donc être biodisponibles et utilisables par les entérocytes pour la prolifération cellulaire. Les meilleurs résultats de prolifération ont toutefois été obtenus avec la plus faible des deux doses utilisées (0,3X). Ceci suggère qu'il faille veiller à ne pas introduire une quantité trop importante de l'extrait levurien dans l'alimentation des truites comme cela a été montré par Andrews et al. (2009) dans son étude sur la carpe indienne labéo roho. En effet, les poissons présentaient une baisse de croissance lorsqu'un extrait de levure était inclus dans l'aliment en de trop fortes concentrations (Andrews et al., 2009). L'extrait de levure doit être utilisé comme un ingrédient fonctionnel et donc être à incorporé à faible dose dans les aliments, plutôt que comme une source alternative de protéines.

2. *In vivo* : effets à long-terme d'une supplémentation en extrait de levure dans un régime dépourvu de farine de poissons et à base de protéines animales transformées

a. Contexte

La substitution des farines de poissons par des sources protéiques alternatives plus durables reste une préoccupation majeure pour le secteur aquacole. Les matières premières végétales, déjà largement incluses dans les aliments commerciaux, ainsi que les protéines animales transformées représentent des candidats d'intérêt pour le remplacement des farines de poissons. Bien qu'elles présentent des propriétés nutritionnelles et économiques intéressantes, ces matières premières semblent moins efficaces lorsque l'on se place dans un contexte de substitution totale de la farine de poisson par des végétaux ou des coproduits animaux. Des voies d'amélioration de ces régimes sans farines de poissons sont néanmoins envisageables, comme par exemple en y incorporant des ingrédients fonctionnels tels que les levures. En effet, les levures sont couramment utilisées en alimentation animale pour améliorer la croissance et la santé des animaux d'élevage.

b. Objectif

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons cherché à évaluer les bénéfices, pour la truite arc-en-ciel, d'une supplémentation en extrait de levure d'un régime dépourvu de farines de poissons et composé de matières premières végétales et de protéines animales transformées. Les essais zootechniques décrits dans cet article ont été conduits afin de mettre en évidence les effets de cette supplémentation sur la digestibilité de l'aliment, la croissance des poissons et la santé du tube digestif. Une étude sans a priori de la réponse transcriptomique (ARN et miARNs) des foies et des intestins distaux, deux tissus clés du métabolisme nutritionnel, a également été réalisée afin de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents aux variations phénotypiques observées.

c. Résultats

Bien que l'ajout de 3 % de l'extrait de levure dans un aliment à base de protéines végétales et de protéines animales transformées n'ait pas influencé de manière importante la digestibilité des nutriments de l'aliment, les poissons nourris avec le régime PAP+YE ont néanmoins montré une croissance significativement plus importante que ceux nourris avec le régime PAP non supplémenté. Cependant, l'ajout de levure, bien que bénéfique, n'a pas permis d'atteindre les niveaux de croissance mesurés chez les poissons nourris avec le régime CTL contenant de la farine de poisson. Les marqueurs immunitaires plasmatiques et la structure de la muqueuse intestinale analysés n'ont pas permis de mettre en évidence de signes clairs d'inflammation. Néanmoins, la taille des villosités intestinales ainsi que les niveaux totaux d'immunoglobuline M dans le plasma étaient significativement plus élevés chez les poissons nourris avec le régime supplémenté avec l'extrait de levure. Par ailleurs, même si peu de gènes ont montré une expression différentielle dans le foie et l'intestin distal, les analyses des transcriptomes ont tout de même mis en évidence que les régimes expérimentaux avaient modulés l'expression de gènes impliqués dans les fonctions immunitaires, la réponse inflammatoire, les défenses anti-pathogènes ou encore la cicatrisation et la coagulation. Les analyses des miRNomes hépatiques et intestinaux ont indiqué que l'expression des micro-ARNs étaient très peu modulée par les régimes expérimentaux.

d. Eléments de discussion

Cette étude a confirmé l'utilité des extraits de levure pour améliorer l'efficacité des régimes sans farine de poisson chez la truite arc-en-ciel. Les poissons n'ont présenté aucun signe net d'inflammation intestinale ou de réponse immunitaire exacerbée induites par la substitution de la farine de poisson au profit de protéines végétales et de protéines issues d'animaux terrestres. Pourtant, les réponses des transcriptomes hépatiques et intestinaux ont montré que les régimes expérimentaux utilisés ont été capables de modifier l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes immunitaires innés et acquis, dans des fonctions de défense contre des pathogènes ainsi que dans des processus de coagulation et de cicatrisation des tissus. Les résultats obtenus ne permettent pas d'élucider pleinement les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des plus faibles croissances des poissons nourris avec les régimes sans farine de poisson. Néanmoins, la supplémentation en extrait de levure semble avoir modulé des voies cellulaires capables d'améliorer la robustesse de la truite arc-en-ciel. Nos résultats sont donc en accord avec des études précédentes qui attribuent aux levures, des effets

bénéfiques pour la croissance et la santé des animaux (Abu-Elala et al., 2018; Glencross et al., 2020b; Huyben et al., 2018, 2017; Vidakovic et al., 2020). Il est toutefois important de souligner que l'extrait de levure utilisé dans le cadre de cette étude était la fraction cytosolique de *Saccharomyce cerevisiae* et non la paroi connue pour sa richesse en molécules immunostimulantes comme les β -glucanes. Dans cette étude, l'extrait de levure était riche en petits peptides, en acides aminés libres et en nucléotides. Les effets observés sur la croissance, l'histologie intestinale et les modulations des transcriptomes hépatique et de l'intestin distal pourraient donc être le résultat d'une modification du profil en acides aminés de l'aliment plus favorable à la croissance, ou celui d'un apport en peptides bioactifs pouvant stimuler l'anabolisme. Ces acides aminés et peptides bioactifs ont également pu contribuer à la régulation de l'expression de gènes pouvant induire une meilleure robustesse des poissons. Enfin, il est important d'indiquer que les nucléotides sont également connus pour leurs effets bénéfiques sur l'immunité. Chez l'enfant, les nucléotides naturellement présents dans le lait maternel améliorent la santé et la fonction immunitaire (Singhal et al., 2008; Uauy et al., 1994). Chez les poissons, les nucléotides semblent également augmenter la tolérance au stress et moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Hossain et al., 2020; Low et al., 2003). De plus, les poissons nourris avec des aliments enrichis en nucléotides montreraient une meilleure résistance aux infections virales, bactériennes et parasitaires (Burrells et al., 2001a; Li et al., 2004). L'ensemble de ces molécules apportées par la supplémentation en extrait de levure pourrait donc améliorer la robustesse des truites et *in fine* leur croissance, quand l'aliment présente une formulation qui n'est pas optimale.

Afin de comprendre les fonctions et les potentiels effets des peptides contenus dans l'extrait de levure, une analyse peptidomique a été lancée à *posteriori*. Les résultats sont décrits dans la partie « **f. Résultats complémentaires : analyse des peptides bioactifs** » (p. 166).

YEAST EXTRACT IMPROVES GROWTH IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) FED A FISHMEAL-FREE DIET AND MODULATES THE HEPATIC AND DISTAL INTESTINE TRANSCRIPTOMIC PROFILE

Laura Frohn^{1,2}, Diogo Peixoto^{3,4}, Cervin Guyomar⁶, Carla Teixeira^{3,4,5}, Frédéric Terrier¹, Pierre Aguirre¹, Sarah Maman Haddad⁶, Julien Bobe⁷, Benjamin Costas^{3,4}, Nadège Richard², Karine Pinel^{1*}, Sandrine Skiba-Cassy^{1*}

¹INRAE, Univ. Pau & Pays Adour, E2S UPPA, NUMEA, 64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France.

²Phileo by Lesaffre, F-59700 Marcq-en-Barœul, France

³ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 4050-313 Porto, Portugal

⁴CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, 4450-208 Matosinhos, Portugal.

⁵SPAROS Lda, Área Empresarial de Marim, Lote C, Olhão, Portugal.

⁶Sigenae, GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326, Castanet Tolosan, France.

⁷INRAE, LPGP, Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France

*Co-last author

Corresponding author

Sandrine Skiba-Cassy

173 route de Saint Jean-de-Luz, 64480 Saint Pée-sur-Nivelle, France

sandrine.skiba@inrae.fr

+33 559515993

Short version of the title

Yeast in the rainbow trout diet.

Keywords

Yeast extract; Processed animal protein; High throughput sequencing; Rainbow trout; Nutrition

Abstract

Replacing fishmeal with alternative protein sources and improving new ingredients diets with feed additives are major objectives in aquaculture. The aim of this study was to evaluate benefits for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of supplementing a fishmeal-free diet, composed of processed animal proteins, with yeast extract. Juvenile rainbow trout (initial weight 37 ± 2 g) were fed either with a control diet (19% fishmeal) or with a diet based on terrestrial animal by-products (17%) supplemented or not with 3% of yeast extract. Effects of the diets were evaluated in a 4-week digestibility trial and a 12-week growth experiment. Fish health was investigated by measuring plasma immune markers and performing histological study of the gut. Underlying molecular responses were investigated using unbiased transcriptomic analysis of the liver and distal intestine. Results indicated that supplementing with 3% yeast extract did not influence nutrient digestibility substantially. Nevertheless, fish fed the supplemented fishmeal-free diet grew more than those fed the non-supplemented processed animal protein diet. Plasma and structural parameters indicated no exacerbated immune response or signs of intestinal inflammation in fish fed the fishmeal-free diets. However, plasma total immunoglobulin M levels and intestinal villi were significantly higher in fish fed the diet supplemented with yeast extract. The transcriptomic analysis revealed that the diets influenced immune, inflammatory, pathogen fighting and coagulation gene-related expressions. These results suggest that the dietary inclusion of yeast can enhance a fishmeal-free diet by improving rainbow trout performances and potentially their robustness.

1. Introduction

According to the most recent forecasts of the Food and Agriculture Organization, global protein consumption will increase by 14% by 2030. The production of aquatic protein will help meet the global demand for protein, since per capita fish consumption is expected to exceed more than 21 kg by then. Fishing and aquaculture activities meet financial and food requirements for populations around the world. Both sectors together employ nearly 8% of the world's population and provide many people with a major source of dietary protein. In 2020, 49% of the 178 million tons of total fish production came from aquaculture and the sector is expected to contribute more than 50% of total production by the end of the decade. Thus, aquaculture is recognized as a major contributor to global food security ^(1,2).

Although most of the production is intended for direct human consumption, some is used for other purposes. Currently, 12% of the total annual fish tonnage is used to produce fish oil and fishmeal to feed carnivorous farmed fish such as Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ⁽¹⁾. These ingredients have been used to formulate aquafeeds since they fulfill nutritional needs for protein, amino acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, and they are highly palatable and digestible ⁽³⁾. Because wild fish stocks used for this purpose have been overexploited for years, they are now protected by fishing quotas to conserve them and their use in carnivorous fish feeds tends to decrease ⁽⁴⁾.

Thus, alternative ingredients are increasingly of interest and many studies on the topic have emerged in the past few decades. For salmonids, changes in formulations have enabled replacing a large percentage of marine ingredients with plants raw materials ⁽⁵⁾. However, the presence of anti-nutritional factors and an imbalance in amino acids prohibit completely replacing fishmeal with plants since doing so decreases fish growth ^(6,7). Moreover, certain abrasive plant-based ingredients, especially soybean meal, trigger enteritis and consequently weaken the immune response in fish ⁽⁸⁾. Insect meal and microalgae are interesting alternatives due to their high nutritional qualities and the short life cycles of the organisms that provide the ingredients. However, using them as a complete substitute for fishmeal in aquafeeds is not recommended, since they are more expensive and raise concerns about environmental sustainability ^(9,10). Processed animal proteins (PAP), banned from Europe in 2001 due to spongiform encephalopathy, gradually regained popularity in the early 2010s due to increasing scientific knowledge and modernization of processing techniques. In 2013, the European Union reauthorized the use of non-ruminant by-products in aquafeeds. Like fishmeal, pig and poultry products are highly digestible, appetizing and well balanced in protein and amino acids. Derived from industrial by-products, they are also less expensive, do not compete with human food sources and have a lower carbon footprint than other ingredients ⁽¹¹⁻¹³⁾. Based on previous studies of salmonids, depending on the

percentage of inclusion in aquafeeds, poultry by-products and pig blood meal are suitable replacements for marine ingredients since they do not induce strong adverse effects on fish growth or health ^(14–16). However, PAP-based diets effectiveness still requires improvement.

Feed additives, such as yeast and its derivatives, have become of great interest in animal health and disease prevention. In the past few decades, adding yeast to the diets has been well investigated for terrestrial livestock, and positive effects of doing so have been observed for poultry, pigs and ruminants ^(17,18). Yeast supplementation has gained popularity for aquaculture species, as positive relations have been identified between nutrition and fish health ⁽¹⁹⁾. As described in the review of Agboola et al. ⁽²⁰⁾, *Saccharomyces cerevisiae* is the yeast strain studied most in aquaculture. It contains relatively high contents of crude protein, amino acids, vitamins and minerals, as well as compounds (MOS and β -glucan) that can stimulate immunity, improve intestinal integrity, assist in wound healing and thus promote growth performances by modulating metabolism ⁽²¹⁾. Yeast has been a major ingredient used to mitigate adverse effects of fishmeal-free diets of several fish species and shrimp ^(22–24). Surprisingly, its cytosolic fraction (i.e. yeast extract) is less well known and has been rarely studied, even though it has relatively high contents of protein and bioactive components, such as nucleotides and small peptides, that could also improve fish performances and health ⁽²⁵⁾.

Due to these qualities and relative lack of use, long-term benefits of a supplementation with the cytosolic fraction of *Saccharomyces cerevisiae* were assessed in this study for rainbow trout fed a fishmeal-free diet composed of poultry by-products and pig blood meal. First, effects on zootechnical parameters were evaluated in a 4-week feed digestibility trial and a 12-week growth experiment. The overall health of the fish was then evaluated, with a focus on intestinal integrity and humoral immunity. Finally, RNAs and miRNAs were sequenced to identify underlying molecular responses of the liver and distal intestine, which are key tissues sensitive to dietary changes.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Ethical statements

In vivo experiments were performed at the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) experimental fish farm facility (IE Numea, 2021 ⁽²⁶⁾), authorized for

animal experimentation by the French Veterinary Service (A64-495-1 and A40-228-1). The experiments were conducted in strict accordance with European Union regulations on the protection of animals used in scientific research (Directive 2010/63/EU) and according to the National Guidelines for Animal Care of the French Ministry of Research (decree no. 2013-118, 02 Jan 2013). In agreement with the ethical committee (C2EA-73), the experiment did not need approval, since it involved only standard rearing practices, with all diets formulated to meet the nutritional requirements (NRC, 2011) of rainbow trout⁽³⁾. The staff of the facility received training and personal authorization to perform the experiments.

Feeds formulation

To evaluate the benefits of supplementing yeast extract in a fishmeal-free diet, three feeds formulated to be isoproteic, isolipidic and isoenergetic were manufactured by extrusion at INRAE experimental facilities in Donzacq (Landes, France). The main basal composition of the diets differed (Table 1). The control diet (CTL), composed of 19.0% of fishmeal and 7.0% of fish oil, was formulated to approximate a current commercial feed. The processed animal protein (PAP) feed was composed of 10% of dehydrated poultry protein, 6.0% of hydrolyzed feather meal and 1.0% of poultry and pig blood meal. The PAP+YE feed was composed of the PAP feed supplemented with 3% yeast extract with a high content of free amino acids and peptides (Prosaf®, Phileo by Lesaffre, France). The yeast product, derived from the cytosolic fraction of *S. cerevisiae*, was composed of 71.6% crude protein, 8.7% nucleotides, and less than 0.5% lipids (Suppl. Table 1).

Digestibility trial

The digestibility trial was conducted at INRAE experimental facilities in Saint Pée-sur-Nivelle (Nouvelle Aquitaine, France). Nine batches of 15 rainbow trout, with a mean body weight (BW) of 100 ± 5 g, were distributed and acclimated into 100 L cylindrical-conical tanks for 15 days. The tanks were supplied with continuous flow (4 L/min) of well-oxygenated fresh water (9 ppm dissolved oxygen) at a constant temperature (17 ± 0.5 °C) under a 12 h photoperiod. Experimental diets, which contained 0.1% yttrium (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) as an inert marker, were randomly assigned to the tanks (three tanks per diet) (Table 1). Before collecting feces, fish were acclimated to their respective diet for another 15 days period and fed twice a day until visual satiation. During the four weeks following the adaptation period, feces were collected daily using Choubert's automatic and continuous sieving system⁽²⁷⁾, pooled by tank and stored at -20°C until further analytical assays. Apparent digestibility coefficients (ADCs) were determined using the indirect method based on

analyzing the yttrium content according to NRC (2011) ⁽³⁾. Yttrium concentrations were determined in diets and feces after an acid digestion with HNO₃ and measured with a coupled plasma-mass spectrometry (Agilent 4200 MP-AES, Santa Clara, California, USA). ADCs (%) were estimated for dry matter, energy, protein, lipids, starch, and minerals.

$$ADC \text{ dry matter (\%)} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ of yttrium in the diet}}{\% \text{ of yttrium in the feces}} \right) \right] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$ADC \text{ of } X \text{ (\% of drymatter)} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ of } X \text{ in the feces}}{\% \text{ of } X \text{ in the diet}} \right) \times \left(\frac{\% \text{ of yttrium in the diet}}{\% \text{ of yttrium in the feces}} \right) \right] \quad (\text{Eq. 2})$$

with X the nutrient of interest (e.g. protein, lipids, starch, minerals) or energy.

Growth experiment and sampling procedure

The growth experiment was conducted in the experimental facilities of INRAE in Donzacq (Landes, France). In total, 189 juvenile rainbow trout, with a mean BW of 37 ± 2 g, were divided into groups of 21 fish in 9 tanks of 100 L each supplied with natural freshwater at 17°C. The three experimental diets were randomly allocated to the tanks in triplicate (three tanks per diet) (Table 1). For 12 weeks, fish were reared under a natural photoperiod and fed twice a day by hand to visual satiation. The feed dispensed and total fish biomass in each tank were recorded every three weeks. Zootechnical parameters were calculated for feed efficiency (FE) and daily feed intake (DFI, %/day).

$$FE = \frac{finB - iniB}{WI} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$DFI = \frac{WI}{\frac{finBW + iniBW}{2} \times \Delta t} \quad (\text{Eq. 4})$$

with finB and iniB as the initial and final biomass per tank (g), respectively; iniBW and finBW the initial and final BW (g), respectively; WI as the feed dispensed during the growth experiment (g); and Δt as the feeding period (days).

After 12 weeks of feeding, fish were anesthetized and euthanized by immersion in successive baths of benzocaine (30 mg/mL and 60 mg/mL, respectively). Nine fish per condition (three per tank) were collected, measured, weighed and frozen at -20°C for analysis of body composition. On these fish, liver and viscera were collected and weighed in order to calculate hepato-somatic index (HSI, %), viscero-somatic index (VSI, %) and condition factor K.

$$HSI = \frac{\text{Liver weight}}{\text{Fish BW}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$VSI = \frac{\text{Viscera weight}}{\text{Fish BW}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\text{Factor } K = \frac{\text{Fish BW}}{\text{Fish length}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

An additional 12 fish per condition (four per tank) were anaesthetized and euthanized for tissue sampling. Blood was collected from the caudal vein 48 h after the last meal using a syringe previously treated with EDTA and centrifuged at 3000 x g for ten minutes. Plasma was recovered and frozen at -20°C to later quantify humoral immune parameters. Liver and distal intestine samples were collected 24 h after the last meal and soaked in RNA later before being immediately immersed in liquid nitrogen and kept at -80°C until further molecular analysis. Additional samples of proximal and distal intestine were collected 48 h after the last meal, immediately fixed in a 10% buffered formalin solution, and then adequately processed for later histological studies.

2.2. Proximate composition of diets, feces and whole body

The proximate compositions of the diets, feces and whole body were quantified according to the following protocols. Dry matter and ashes were determined after 24 hours of drying at 105°C and 7 hours of combustion at 550°C, respectively. Gross energy content was measured using an adiabatic bomb calorimeter (IKA C5003). Crude protein was determined using the Kjeldhal acid-digestion method⁽²⁸⁾. The total lipid content was isolated, purified and quantified gravimetrically according to the protocol of Folch et al.⁽²⁹⁾. Data on the proximate diet and whole-body compositions data were used to calculate protein, lipid and energy intake (kJ/kg BW/day), gain (kJ/kg BW/day) and retention (%), using the following equations:

$$X \text{ intake} = DFI \times \% X \text{ feed content} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$X \text{ gain} = \frac{(X_{finFish} \times finBW - X_{iniFish} \times iniBW)}{\frac{(finBW + iniBW)}{2} \times \Delta t \times 1000} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$X \text{ retention} = \frac{X \text{ gain}}{X \text{ intake}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

with X as the nutrient considered or energy; X_{finFish} and X_{iniFish} as the initial and final fish nutrient or energy content, respectively (in % of wet matter).

2.3. Humoral immune parameters

Plasma lysozyme activity, peroxidase activity, alternative complement pathway activity and total immunoglobulin M levels were measured in triplicate using a microplate reader (Synergy HT, Biotek, Winooski, Vermont, USA).

Plasma lysozyme activity

Plasma lysozyme activity (n = 12 fish per condition) was quantified using a turbidimetric assay, as described by Peixoto et al. ⁽³⁰⁾. On a microplate, 15 μ L of plasma were incubated with 250 μ L of a *Micrococcus luteus* solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 0.5 mg/mL in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.2) at 25°C. During incubation, absorbance was measured at 0.5 and 15 min at 450 nm. Lyophilized hen egg white lysozyme was serially diluted (0.5 M, pH 6.2) and used to develop a standard curve. Plasma lysozyme concentrations were calculated using the equation for the standard curve.

Plasma peroxidase activity

Total plasma peroxidase activity (n = 12 fish per condition) was measured using the protocol of Quade and Roth ⁽³¹⁾. Each plasma sample was diluted ten-fold in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and incubated 2 min with 50 μ L of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB, 20 mM) and 50 μ L hydrogen peroxide (H_2O_2 , 5 mM). At the end of incubation, the reaction was stopped by adding 50 μ L of sulfuric acid (H_2SO_4 , 2 M) and the optical density (OD) was read at 450 nm. HBSS was used as a blank and one unit of peroxidase activity was defined as the quantity of peroxidase that produces an absorbance change of 1 OD.

Plasma alternative complement pathway activity

Plasma alternative complement pathway activity (n = 9 fish per condition) was estimated using the method of Sunyer and Tort ⁽³²⁾. Rabbit red blood cells (RaRBC) were washed in GVB buffer (isotonic veronal buffered saline with 0.1% gelatin, pH 7.3) and then resuspended in GVB buffer to a concentration of 2.8×10^8 cells/mL. Plasma samples were serially diluted in Mg-EGTA-GVB buffer (GVB buffer containing 10 mM Mg^{2+} and 10 mM EGTA) and incubated in triplicate with 10 μ L of RaRBC

suspension at room temperature with constant shaking. The hemolysis reaction was stopped after 100 min by adding 150 μ L of cold EDTA-GVB (GVB buffer containing 20 mM EDTA). The degree of hemolysis was determined by measuring the OD of the supernatant at 414 nm. Plasma concentrations that yielded 50% of RaRBC hemolysis were defined as ACH50 units. Negative controls consisted of samples without plasma, from which OD values were subtracted for each sample.

Plasma total immunoglobulin M level

Total plasma immunoglobulin M levels (n = 12 fish per condition) were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ⁽³⁰⁾. Plate wells were coated with diluted plasma proteins (1:1000 in 50 mM Na₂CO₃ buffer, pH 9.6), blocked 2 h with a blocking buffer (5% low fat milk in TBST, pH 7.3) and washed with a TBST solution (1X tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.3). Samples were then incubated with 100 μ L of anti-rainbow-trout IgM monoclonal antibody (Aquatic Diagnostic Ltd., Scotland, 1:400 in a blocking buffer) for 1 h, washed again with TBST and incubated with an anti-mouse secondary antibody (EMD Millipore Corp., USA, 1:1000 in a blocking buffer) for 1 h. Subsequently, 100 μ L of TMB was added, and the reaction was stopped with 100 μ L of H₂SO₄ (2 M). Absorbance was measured at 450 nm and total immunoglobulin levels were equated to OD.

2.4. Histological analysis of the intestine

Proximal and distal intestine samples (n = 12 per condition) were processed using standard histological methods. Briefly, tissues were fixed in 10% buffered formalin before being dehydrated in consecutive ethanol baths (70%, 95% and 100%), clarified in xylene and embedded in paraffin blocks. Subsequently, 2 μ m longitudinal sections were cut and stained with hematoxylin and eosin to measure the height of intestinal villi, and additional sections were stained with periodic acid-Schiff alcian blue to quantify the number of goblet cells per mm². Villi height was measured on one slide per fish using a light microscope (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (E3CMOS Series C-mount USB3.0 CMOS Camera, Sony, Tokyo, Japan) and ToupView 3.7 software (ToupTek, Hangzhou, China).

2.5. Molecular analysis

Total RNA extraction

Total RNA and miRNA was extracted from liver and distal intestine (n = 6 per condition) using a miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol provided by the manufacturer. To avoid genomic DNA contamination, RNA samples (10 µg of each) were subjected to DNase treatment using a Turbo DNA-free kit (Invitrogen, USA). RNA concentrations and quality were determined using a Nanodrop® ND1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and subjected to a Bioanalyzer (Agilent, USA) to validate the RNA extraction procedure. RNA integrity was verified using agarose gel (1%).

Preparation and sequencing of cDNA libraries

Total RNA was quantified using a Fragment Analyzer and the standard sensitivity RNA kit (Agilent Technologies, USA). Libraries were constructed using a Stranded mRNA Prep Ligation kit (Illumina, San Diego, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, poly-A RNAs were purified using oligo(dT) magnetic beads from 500 ng of total RNA. Poly-A RNAs were fragmented and underwent a reverse transcription using random hexamers. During the second strand-generation step, dUTP added dTTP to prevent the second strand from being used as a matrix during the final PCR amplification. Double stranded cDNAs were adenylated at their 3' ends and ligated to Illumina's universal anchors. Ligated cDNAs were amplified after 13 PCR cycles. During this PCR, the libraries were indexed, and adapter sequences were added to be compatible with the cluster-generation step. PCR products were purified using AMPure XP Beads (Beckman Coulter Genomics, Brea, California, USA). Libraries were validated using the High Sensitivity NGS kit (Agilent, USA) on the Fragment Analyzer and quantified using the KAPA Library quantification kit (Roche, Basel, Switzerland).

Thirty-six libraries were pooled in equimolar amounts. The pool was then sequenced using a Novaseq 6000 (Illumina, USA) on one lane of an SP flow cell in paired-end 2*150nt mode according to the manufacturer's instructions.

RNA sequencing quality control and transcript quantification

Image analyses and base calling were performed using NovaSeq Control Software and the Real-Time Analysis component (Illumina, USA). Demultiplexing was performed using Illumina's conversion

software (bcl2fastq 2.20). The quality of the raw data was assessed using the FastQC program (version 0.11.8, Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK) and the Sequencing Analysis Viewer software (Illumina, USA). The FastQ Screen program (version 0.14, Babraham Bioinformatics, UK) was used to estimate the potential degree of contamination.

Transcripts were quantified using the Nextflow (version 20.11.0-edge) nf-core/rnaseq (revision 3.0) pipeline ⁽³³⁾ on the SLURM cluster of the Genotoul Bioinformatics platform. Nextflow is a FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable) pipeline. The pipeline used the STAR program (version 2.6.1d) ⁽³⁴⁾ to map the reads to the *O. mykiss* reference genome (Omyk_1.0) and projected the alignments onto the transcriptome (Omyk_1.0.104). The quantification count table was generated using RSEM software (version 1.3.1) ⁽³⁵⁾.

Preparation and sequencing of miRNA libraries

miRNAs were quantified using a Fragment Analyzer and the Small RNA Analysis kit (Agilent, USA). Libraries were constructed using a NEXTFLEX Small RNA-seq v3 kit (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, a 3' adenylated adapter was ligated to the 3' end of 400 ng RNA and purified to remove excess 3' adapters. A 5' adapter was ligated to the 5' end of the 3'-ligated miRNA. The resulting construction was purified to remove excess 5' adapters. The 5'- and 3'-ligated miRNAs underwent a reverse transcription using an M-MuLV reverse transcriptase and an RT primer complementary to the 3' adapter. The resulting cDNAs were used as a matrix in a 23-cycle PCR using a pair of uniquely barcoded primers. The resulting barcoded library was size-selected on a Pippin HT using a 3 % agarose cassette (Sage Science, Beverly, Massachusetts, USA), aiming for a size of 147-193 bp. Once size-selected, libraries were verified using a Fragment Analyzer and the High Sensitivity NGS kit (Agilent, USA), and quantified using the KAPA Library quantification kit (Roche, Switzerland).

Thirty-six libraries were pooled in equimolar amounts. The pool was then sequenced using a Novaseq 6000 (Illumina, USA) on one lane of an SP flow cell in paired-end 2*50nt mode according to the manufacturer's instructions.

miRNA sequencing quality control and miRNAs quantification

Quality control of miRNA sequencing was performed as described previously for RNA sequencing. miRNA raw reads were trimmed using the Cutadapt program (version 3.4) ⁽³⁶⁾ to remove

the sequencing adapter (TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG) at the 3' end. Additionally, four bases were also trimmed from the 5' end and 3' end of the reads, as described in the manual for the NEXTFLEX Small RNA-Seq v3 kit (Perkin Elmer, USA).

miRNA quantification

Trimmed miRNA libraries were processed using the Prost! program (version 0.7.60)⁽³⁷⁾ to quantify the expression of mature miRNAs. Prost! was configured to retain all reads of 17-25 nucleotides that appeared at least five times in the dataset. Sequences were aligned on the USDA_OmykA_1.1 rainbow trout reference genome (accession GCF_013265735.2). Genomic locations were then enriched by Prost! using the FishMiRNA database (version of June 2021) and 354 sequences of rainbow trout mature miRNAs described by Cardona et al. (2021)⁽³⁸⁾. Rainbow trout was used as the main species to annotate the genomic locations, which yielded a “compressed by annotation” table of Prost! results that summarized expression values for all known rainbow trout mature miRNAs. As advised by Prost! documentation, when multiple potential annotations were identified for a given location, read counts were evenly distributed among the annotations.

Analysis of transcripts and miRNAs differential expression

Differential expression was analyzed using the DESeq2 program (version 1.32)⁽³⁹⁾, with the RSEM raw counts for total RNA sequencing and the Prost! raw expression matrix of annotated mature miRNAs for miRNA sequencing. Differential expression was analyzed in the same way for both datasets using the standard DESeq2 procedure for all 36 libraries and specifying a suitable contrast for each differential expression test. Genes or mature sequences with a false discovery rate (FDR) less than 0.05 were retained for further analysis.

Gene ontology analysis

Enrichment of gene ontology terms was tested in each of the sets of differentially expressed genes. To create a set of background genes, the Manhattan method of the genefilter package⁽⁴⁰⁾ of R software⁽⁴¹⁾ (version 4.1.3) was used to retrieve a set of 100 genes with expression profiles similar for to those of each differentially expressed genes. Enrichment was then analyzed using the topGO R package (version 2.44.0)⁽⁴²⁾ and the Ensembl 104 annotation. All terms of the molecular function,

biological process and cellular compartment ontologies were tested using Fisher's exact test and the "classic" algorithm of topGO.

2.6. Statistical analysis of zootechnical parameters, plasma and histological data

Statistical analyses were performed using the Rcmdr R package. Normality of the distributions and homogeneity of the variances were assessed using a Shapiro-Wilk test and Levene's test, respectively. If normality and homoscedasticity were confirmed, the data were analyzed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's range test. If one or both conditions were not met, the data were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Apparent nutrient digestibility

Overall, ADCs were high for all diets, exceeding 80% for dry matter, protein, lipids, starch and energy, and exceeding 40% for minerals (Table 2). The PAP diet was more digestible than the CTL and PAP+YE diets, with a significant increase in dry matter, protein and energy digestibilities (Tukey's test, $p < 0.05$). Compared to the digestibilities of the CTL and PAP diets, adding the yeast extract (i.e. PAP+YE) slightly decreased the digestibility of dry matter (by 1.70% and 2.10%, respectively), protein (by 0.44% and 0.55%, respectively) and energy (by 0% and 1.57%, respectively). Nevertheless, all digestibilities remained similar to those of the CTL diet. The digestibilities of lipids, minerals and starch did not differ significantly among the diets.

3.2. Growth performances and feed consumption

Fish had the same mean BW at the beginning of the growth experiment (one-way ANOVA, $p > 0.05$), but after 12 weeks of feeding, the group fed the CTL diet showed the best growth performances, with a significantly higher final BW (Table 3). Conversely, as expected, fish fed the PAP diet showed the worst growth performances; however, adding yeast extract to the PAP diet increased fish growth significantly (Tukey's test, $p = 0.01$). DFI was highest for fish fed the PAP diet (Tukey's test, $p < 0.01$). The diets did not influence FE, despite a trend for lower FE for fish fed the PAP diet (Kruskal-Wallis, $p = 0.06$).

Anatomical indexes, including HSI, VSI and condition factor K, were not affected by the diets (one way ANOVA, $p > 0.05$).

3.3. Whole-body composition and nutrients use

At the end of the growth experiment, the diets had not influenced fish body composition of dry matter, ashes, protein, lipids or energy (one-way ANOVA, $p > 0.05$) (Table 4). The diets did not affect energy or lipid gains or lipid retention, but protein gain, energy retention and protein retention differed significantly among groups (one-way ANOVA, $p < 0.05$) (Table 5). The control group (CTL) showed the best nutrient utilization capacities for protein gain and protein retention while fish fed the PAP diet had the lowest values for protein gain, energy retention and protein retention. Compared to the PAP diet, the PAP+YE diet increased protein gain (+10.1%), energy retention (+7.0%) and protein retention (+7.3%), with values that did not differ significantly from those of the CTL diet.

3.4. Histological analysis of the intestine

The villi were significantly higher in the proximal intestine than in the distal intestine (two-way ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 1). Overall, the diet influenced villi height in both parts of the intestine, with a significant increase in height in fish fed the PAP+YE diet (two-way ANOVA, $p < 0.05$). The number of goblet cells per mm² was significantly larger in the proximal intestine (two-way ANOVA, $p < 0.001$), but the diet had no influence on it (two-way ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 2).

3.5. Plasma immune parameters

The diets did not influence lysozyme and alternative complement pathway activities after 12 weeks of feeding (Table 6). In contrast, total peroxidase activity was significantly lower in fish fed PAP diet than that in fish fed the CTL diet, while that of fish fed the PAP+YE diet was intermediate and also lower than that in fish fed the CTL diet (Kruskal-Wallis test, $p = 0.04$). Total immunoglobulin M levels did not differ significantly between the fish fed the CTL and PAP diets but were 25% higher in fish fed the PAP+YE diet (Tukey's test, $p = 0.001$).

3.6. Analysis of gene expression in the liver and distal intestine

RNA sequencing and mapping

SAMtools utilities (version 1.10) ⁽⁴³⁾ specified that 46.5-93.4 million reads per sample were generated in BAM files, of which 68.0%-83.7% per sample were properly paired. The sequencing produced 18- 22 million passed filter clusters per library. The descriptive files as well as the generated data for RNA and miRNAs sequencing are available in the NCBI SRA repository under the following accession number PRJNA924987.

Identifying differentially expressed transcripts in the liver and distal intestine in response to the diets, gene ontology enrichment and pathway analysis

In the liver, 14 transcripts were differentially expressed with three down-regulated genes (fold changes ranging from -0.64 to -1.10), and 11 up-regulated genes (fold changes ranging from 0.60 to 2.22) (Fig. 3 a), Table 7). The largest modulation was observed when comparing the PAP and CTL diets, with 11 transcripts differentially expressed, of which one and 10 were down-regulated and up-regulated, respectively. The number of differentially expressed transcripts decreased to three when comparing the PAP and PAP+YE diets, of which two were down-regulated. No genes were differentially expressed when comparing the PAP and CTL diets. Moreover, no transcript was common to all three comparisons. In the distal intestine, 28 transcripts were differentially expressed: 16 transcripts were down-regulated with a range of fold change from -0.44 to -23.67, and 12 were up-regulated with a range of fold change from 0.88 to 22.6 (Fig. 3 b), Table 8). Unlike in the liver, most of them occurred when comparing the PAP+YE and CTL diets, with 13 transcripts, of which six were down-regulated. One of the 13 transcripts was shared with the PAP+YE vs PAP comparison, while two were shared with the PAP vs CTL comparison. The PAP+YE vs PAP comparison identified seven differentially expressed transcripts, of which four were down-regulated. The PAP vs CTL comparison identified eight differentially expressed transcripts, of which two were up-regulated, with one transcript shared with the PAP+YE vs PAP comparison.

Enrichment of differentially expressed genes was tested against a set of 4990 background genes. Overall, 25-gene ontology terms were found significantly enriched in one contrast. Gene ontology enrichment and an additional literature analysis allowed to potential pathways to be assigned to each differentially expressed transcript (Table 7, Table 8 and Suppl. Fig. 1). In the liver, of the 14 differentially expressed genes, six were related to immune or inflammatory functions. The other eight transcripts were assigned to cell protection, coagulation or metabolism functions. In the distal intestine, of the 28 transcripts differentially expressed, seven were assigned putatively to immunity or inflammation functions, two to coagulation and wound healing, two to endoplasmic reticulum stress

response, three to antipathogen functions and two to metabolism. Transcripts classified into the category "Others" could not be assigned to specific functions due to lack of literature or poor genome annotation.

3.7. Analysis of miRNAs expression in the liver and distal intestine

miRNA sequencing and mapping

A total of 321 mature miRNAs with a read count greater than one transcript per million (TPM) were detected in at least one sample. As frequently occurs in miRNA sequencing, the miRNome was dominated by a few highly abundant mature sequences. The most abundant sequence (omy-miR-122-5p) had a mean normalized count of 204 000 TPM across all libraries.

miRNAs differentially expressed in the liver and distal intestine in response to the diets

Of the 318 mature miRNAs detected in the liver at more than a mean of 0.1 TPM average, only 4 were differentially expressed, and they belonged to the PAP+YE vs PAP comparison (Table 9). Two were up-regulated (miR-222b-3p and miR-92a-3p) and the other two were down-regulated (miR-18a-5p and miR-217a-5p) in response to the addition of yeast extract. In contrast, the diets had no influence on the differential expression of the 310 mature miRNAs detected in the distal intestine.

4. Discussion

Replacing fishmeal with alternative ingredients and improving fishmeal-free diets has become increasingly necessary for the sustainable development of aquaculture, especially for carnivorous species of high economic value. It is well established that salmonids, such as rainbow trout, have a low tolerance to fishmeal-free diets. Completely replacing fishmeal with plant-based ingredients is likely to worsen fish performances^(44,45). To counteract the adverse effects on farmed fish growth, alternative animal protein sources (e.g. poultry by-product meal, feather meal, poultry or pig blood meal) have been investigated because of their high protein content. However, results of partially or completely removing fishmeal from the diet remain unsatisfactory for rainbow trout⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾, gilthead seabream (*Sparus aurata*)⁽⁴⁹⁾ and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)⁽⁵⁰⁾. This was confirmed in the present study, which showed that juvenile rainbow trout grow more slowly on a fishmeal-free diet

containing plant-based ingredients and PAP than on a 19% fishmeal diet, even though the nutrient requirements were fully met. One solution to improve the performance of fishmeal-free diets is to use functional ingredients such as yeast, which is used not only as a source of protein, but also for its beneficial effects on animal growth and health due to its ability to stimulate the immune system ⁽²¹⁾. In the present study, adding 3% yeast extract increased the effectiveness of the PAP diet, as indicated by the final BW of fish fed the PAP+YE diet, which approached that of fish fed the fishmeal-based diet.

Studies agree that animal by-products in diets are appetizing and highly digestible, especially their protein fractions, for several fish species ^(13,51–53), which was confirmed in the present study. Because adding yeast to the diet barely changed nutrient digestibility, the increased growth of fish fed the PAP+YE diet was due not to an increase in digestibility, but to better metabolic use of nutrients. Indeed, adding yeast tended to increase the FE, and trout fed the PAP+YE diet retained more protein than those fed the PAP diet. Because rainbow trout are more tolerant of soybean meal than Atlantic salmon are ⁽⁵⁴⁾, the small decrease in soybean meal content of the PAP+YE diet was likely not the main cause of the increase in growth. The benefits of yeast for growth have been demonstrated for many fish species such as salmon ⁽⁵⁵⁾ and tilapia (*Oreochromis mossambicus*) ⁽⁵⁶⁾. However, these studies used yeast to replace fishmeal protein and thus included it in percentages higher than the 3% used in the present study. The protein in the yeast extract (71.6 %DM) used in the present was composed mainly of small peptides and free amino acids. This characteristic may have increased the bioavailability of amino acids, as previously demonstrated for rainbow trout ⁽⁵⁷⁾, and thus promoted amino acid use and growth. The increased growth could also have been related to a positive effect of the yeast extract on the structure of the intestinal mucosa. Trout fed the PAP+YE diet had significantly higher intestinal villi, which agrees with previous observations of Eurasian carp (*Cyprinus carpio*) fed a diet in which fishmeal was partially replaced with 3% of a complex product derived from the enzymatic hydrolysis of yeast ⁽⁵⁸⁾. These results suggest that adding yeast extract does not harm the intestinal mucosa but instead provides a larger surface area for nutrient absorption, particularly for amino acids and peptides, due to its positive effect on the height of villi ⁽⁵⁹⁾.

Strong evidence suggests a relation among fish nutrition, health and growth performances. In this respect, plasma immune markers and gut structure were analyzed extensively, since they have been identified as relevant for assessing fish health ^(60,61). An unbiased transcriptomic analysis was performed on genes and miRNAs in the liver and distal intestine. In the plasma, only total peroxidase activity was significantly lower in fish fed the PAP diet, and the diets did not influence lysozyme or alternative complement pathway activities. In the gut, enteritis is usually indicated by an increase in the number of goblet cells and shortening of the intestinal villi ^(62,63). This phenotype, which is found in Atlantic salmon fed a diet rich in soybean products ⁽⁶⁴⁾, was not observed in the present study, in which the mean number

of goblet cells was identical among the three diets. Fish fed the PAP and PAP+YE diets did not have shorter villi than those fed the CTL diet. Therefore, plasma immune indicators and intestinal histology did not indicate an exacerbated inflammatory-type immune response in fish fed diets containing animal by-products, with or without yeast. Nevertheless, fish fed the supplemented PAP+YE diet had the highest level of total immunoglobulin M, which can be explained by the high content of small peptides (50.1% of total peptides are smaller than 0.50 kDa) in the yeast extract ⁽⁶⁵⁾. Peptides from a variety of sources are known to have nutraceutical effects due to their antioxidant, antimicrobial and immunomodulatory properties ⁽⁶⁶⁾. Regarding their influence on immunity, bioactive peptides can stimulate lymphocytes and thus the secretion of immunoglobulins ^(67,68), which has been reported for large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea* R.) fed a diet supplemented with a fish-protein hydrolysate assumed to contain bioactive peptides ⁽⁵⁹⁾. Thus, our results suggest that supplementation with a peptide-rich yeast extract could improve acquired humoral immunity and consequently fish defenses against pathogenic stresses. This hypothesis will need to be verified through a pathogenic challenge.

Unlike previous studies that performed high-throughput sequencing transcriptomic analysis of fish, including rainbow trout ^(69,70), few genes were differentially expressed in the liver and distal intestine. This difference could be related to the timing of sampling, which occurred 24 h after the last meal. Thus, the modulations were likely related more to background changes in fish physiology than to short-term postprandial effects. While the PAP diet altered the transcriptomic profile of the liver, adding only 3% yeast extract to it appeared to restore a hepatic physiological response similar to that obtained with the CTL diet, which is consistent with the observed phenotypes. The transcriptomic response of the gut to the diets was less distinct, although most of the differentially expressed genes were observed in fish fed the PAP+YE or CTL diet. While analysis of plasma immune markers and intestinal histology studies did not provide clear evidence of inflammation, as confirmed by the lack of induction of key cytokines in the gut immune response, analysis of gene ontology terms and the literature revealed that a large proportion of the differentially expressed transcripts were related to inflammation and immune functions. In the liver, nearly half of the differentially expressed transcripts were assigned putatively to immune or inflammatory functions, and induced in fish fed the PAP diet compared to those fed the CTL diet. Specifically, the analysis revealed the up-regulation of two acute phase proteins (*hpx* ⁽⁷¹⁾ and *α2m* ⁽⁷²⁾), as well as a transcriptional regulator of acute-phase responses (*foxa2* ^(73,74)). The protein encoded by *prg4*, which is responsible for activating and stimulating hepatic macrophages in rats ⁽⁷⁵⁾, and the enzyme encoded by *csgalnact2*, which is required for elongation during chondroitin sulfate synthesis, were also up-regulated in fish fed the PAP diet. In the distal intestine, effects associated with immune functions were prevalent in trout fed the PAP+YE diet, suggesting that the cytosolic fraction of yeast could have specifically targeted immune- or inflammation-related genes of the intestinal mucosa (i.e.

serping1⁽⁷⁶⁾, *apoa2*⁽⁷⁷⁾, *mapk1b*⁽⁷⁸⁾, and *c15orf48*⁽⁷⁹⁾). Also, two of them were related to stimulation of T- and/or B-cells (i.e. *fut8*^(80,81) and *cd3d*⁽⁸²⁾). In the liver and distal intestine, the C3 component was the only complement member that was differentially expressed among the diet. The complement system plays a fundamental role in the innate immune system since it is involved in phagocytosis, inflammatory reactions and production of antibodies. Among the many proteins involved in activating the complement cascade, the C3 molecule is one of the most important⁽⁸³⁾. In the present study, the dietary regulations differed between these two tissues. While the liver was more sensitive to the PAP diet, the distal intestine was more sensitive to the PAP+YE diet. These results are consistent with an increase in expression of intestinal complement C3 in response to the use of yeast in gilthead seabream^(84,85). In fish fed the diet PAP+YE, the transcriptomic response of the intestine also revealed the modulation of genes related to mechanisms of pathogen control or allergic reaction. Indeed, we observed an up-regulation of *ch25h*, the key enzyme in the production of 25-hydroxycholesterol, a powerful soluble antiviral factor that restricts the propagation of viruses⁽⁸⁶⁾ and that was induced in response to viral infections in Atlantic salmon⁽⁸⁷⁾. Compared to the PAP diet, the PAP+YE diet modulated expression of antipathogen-related genes *mfap4* and *hrh1*. In Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), MFAP4 proteins are known to agglutinate and opsonize bacterial pathogens, which helps to prevent bacterial infections⁽⁸⁸⁾. The histamine receptor 1, encoded by the *hrh1* gene, is an effector of the action of histamine on phagocyte function in mammals and fish^(89,90). Overall, our results indicate that including yeast in the diet of rainbow trout could strengthen defense capacities of the gut, which is one of the main contact and entry points of pathogens and allergens in the body. Of all the differentially expressed genes, selenoprotein S-like (*selenos*) varies the most in response to diet, and its expression is highly pronounced in the intestine in response to diets that contain terrestrial animal by-products. Selenos is a protein in the endoplasmic reticulum that is involved in reducing oxidative and endoplasmic reticulum stress⁽⁹¹⁾. The issue of whether PAP diets induce oxidative and endoplasmic reticulum stress remains to be investigated, since the transcriptomic analysis revealed no marker genes for stress that would support this hypothesis. We also observed the modulation of certain genes putatively involved in coagulation and healing in both the liver and distal intestine. In the intestine, fish fed the PAP diet showed a down-regulation of coagulation markers *fbg*⁽⁹²⁾ and *cd9*⁽⁹³⁾, suggesting a reduction in coagulation capacity. However, adding 3% yeast extract may have restored it, as indicated by the opposite effect of the PAP+YE diet on the expression of *fbg* in the intestine and a downregulation of anticoagulant *serpina10*⁽⁹⁴⁾ in the liver.

The analysis of small non-coding RNAs did not help to identify mechanisms that underlay the observed growth phenotypes. Under the study conditions (samples collected 24 hours after the last meal), few miRNAs were modulated in response to the diet (only four in the liver and none in the distal

intestine). However, miR-217-5p varied the most in expression, which in mammals appears to target inflammatory mechanisms⁽⁹⁵⁾. Its expression decreased greatly in response to the PAP+YE diet.

In conclusion, the study confirms the utility of adding yeast products to improve the nutritional quality of fishmeal-free diets for rainbow trout. The mechanisms that underlay the decreased growth performance of fish fed a diet without fishmeal remain unclear. The results showed no consistent inflammatory reaction, but they did suggest that the molecular response of fish to the fishmeal-free diets stimulates both innate and acquired defense mechanisms, including those that fight pathogens and allergens, as well as those that support tissue coagulation and healing processes. Supplementation with yeast extract could induce some of these mechanisms, which confirms that yeast products could increase the robustness and growth of rainbow trout. In animal nutrition, yeast is considered beneficial for growth and health. The yeast extract used to supplement the PAP diet was the cytosolic fraction, rich in small peptides, free amino acids and some nucleotides. Thus, the observed effects on growth, intestinal histology and gene expression were likely due to the nucleotides, or the presence of specific bioactive peptides, which should be investigated in future studies.

5. Acknowledgment

We dedicate this study to Frank Sandres, who cared for the fish during this study and sadly passed away. We thank Anthony Lanuque for monitoring the growth experiment. We are grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, <https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12>) for providing help, computing resources and storage resources. We would also like to thank Christophe Klopp for his advices in the analysis of the high-throughput sequencing data.

6. Financial support

This study was financially supported by the iSlte E2S-UPPA project. Diogo Peixoto and Benjamin Costas were supported by FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal (UI/BD/150900/2021 and 2020.00290.CEECIND, respectively). This study also received funds from FCT within the scope of UIDB/04423/2020 and UIDP/04423/2020 granted to CIIMAR.

7. Conflict of Interest

None.

8. Authorship

Study design: SSC, NR, KP

Funding acquisition: SSC

Animal experiments: FT, PA

Feed formulation: FT, NR, SSC, KP, LF

Biological analyses: LF, DP, CT

Bioinformatics analyses: LF, SMH, CG, CK, JB

Statistical analysis: LF, CG, BC

Project administration and supervision: SSC, NR, KP

Writing - original draft: LF

Writing - review & editing: LF, SSC, KP, NR, BC, JB, DP, CT, CG, SMH, CK

9. References

1. OECD & Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022) *OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031*. OECD.
2. Fiorella KJ, Okronipa H, Baker K, et al. (2021) Contemporary aquaculture: implications for human nutrition. *Current Opinion in Biotechnology* **70**, 83–90.
3. Council NR (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*.
4. Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, et al. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* **405**, 1017–1024. Nature Publishing Group.
5. Aas TS, Ytrestøyl T & Åsgård T (2019) Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports* **15**, 100216.
6. Gatlin III DM, Barrows FT, Brown P, et al. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* **38**, 551–579.
7. Palma M, Bledsoe JW, Tavares LC, et al. (2021) Digesta and Plasma Metabolomics of Rainbow Trout Strains with Varied Tolerance of Plant-Based Diets Highlights Potential for Non-Lethal Assessments of Enteritis Development. *Metabolites* **11**, 590. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
8. Krogdahl Å, Penn M, Thorsen J, et al. (2010) Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research* **41**, 333–344.
9. Hua K, Cobcroft JM, Cole A, et al. (2019) The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth* **1**, 316–329.
10. Quang Tran H, Van Doan H & Stejskal V (2022) Environmental consequences of using insect meal as an ingredient in aquafeeds: A systematic view. *Rev Aquacult* **14**, 237–251.
11. Dawood MAO & Koshio S (2020) Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **12**, 987–1002.

12. Kumar S, Sándor Zs J, Nagy Z, et al. (2017) Potential of processed animal protein versus soybean meal to replace fish meal in practical diets for European catfish (*Silurus glanis*): growth response and liver gene expression. *Aquaculture Nutrition* **23**, 1179–1189.
13. Bureau DP, Harris AM & Cho CY (1999) Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **180**, 345–358.
14. Galkanda-Arachchige HSC, Wilson AE & Davis DA (2020) Success of fishmeal replacement through poultry by-product meal in aquaculture feed formulations: a meta-analysis. *Rev Aquacult* **12**, 1624–1636.
15. Hatlen B, Oaland Ø, Tvenning L, et al. (2013) Growth performance, feed utilization and product quality in slaughter size Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet with porcine blood meal, poultry oil and salmon oil. *Aquacult Nutr* **19**, 573–584.
16. Lu F, Haga Y & Satoh S (2015) Effects of replacing fish meal with rendered animal protein and plant protein sources on growth response, biological indices, and amino acid availability for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Sci* **81**, 95–105.
17. Burdick Sanchez NC, Broadway PR & Carroll JA (2021) Influence of Yeast Products on Modulating Metabolism and Immunity in Cattle and Swine. *Animals* **11**, 371. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
18. Vohra A, Syal P & Madan A (2016) Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology* **219**, 31–47.
19. Mahdy MA, Jamal MT, Al-Harb M, et al. (2022) Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. *J App Biol biotech*, 59–65.
20. Agboola JO, Øverland M, Skrede A, et al. (2021) Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. *Reviews in Aquaculture* **13**, 949–970.
21. Broadway PR, Carroll JA & Sanchez NCB (2015) Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review. *Microorganisms* **3**, 417–427. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
22. Richard N, Costas B, Machado M, et al. (2021) Inclusion of a protein-rich yeast fraction in rainbow trout plant-based diet: Consequences on growth performances, flesh fatty acid profile and health-related parameters. *Aquaculture* **544**, 737132.
23. Zhao L, Wang W, Huang X, et al. (2017) The effect of replacement of fish meal by yeast extract on the digestibility, growth and muscle composition of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* **48**, 311–320.
24. Trosvik KA, Rawles SD, Thompson KR, et al. (2012) Growth and Body Composition of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fry Fed Organic Diets Containing Yeast Extract and Soybean Meal as Replacements for Fish Meal, with and without Supplemental Lysine and Methionine. *Journal of the World Aquaculture Society* **43**, 635–647.
25. Liu D, Ding L, Sun J, et al. (2016) Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **36**, 181–192.
26. IE Numea (2021) Fish nutrition and aquaculture. INRAE.
27. Choubert G, De la Noüe J & Luquet P (1982) Digestibility in fish: Improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture* **29**, 185–189.

28. Kjeldahl (1883) A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z Anal Chem* **22**, 366.
29. Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509.
30. Peixoto D, Machado M, Azeredo R, et al. (2022) Chronic Inflammation Modulates Opioid Receptor Gene Expression and Triggers Respiratory Burst in a Teleost Model. *Biology* **11**, 764. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
31. Quade MJ & Roth JA (1997) A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **58**, 239–248.
32. Oriol Sunyer J & Tort L (1995) Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **45**, 333–345.
33. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, et al. (2020) The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol* **38**, 276–278.
34. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21.
35. Li B & Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323.
36. Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12.
37. Desvignes T, Batzel P, Sydes J, et al. (2019) miRNA analysis with Prost! reveals evolutionary conservation of organ-enriched expression and post-transcriptional modifications in three-spined stickleback and zebrafish. *Sci Rep* **9**, 3913.
38. Cardona E, Guyomar C, Desvignes T, et al. (2021) Circulating miRNA repertoire as a biomarker of metabolic and reproductive states in rainbow trout. *BMC Biol* **19**, 235.
39. Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550.
40. R. Gentleman VC (2017) genefilter. *Bioconductor*.
41. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/> (accessed January 2023).
42. Alexa A & Rahnenfuhrer J (2022) topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. Bioconductor version: Release (3.15).
43. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079.
44. Lazzarotto V, Médale F, Larroquet L, et al. (2018) Long-term dietary replacement of fishmeal and fish oil in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth, whole body fatty acids and intestinal and hepatic gene expression. *PLOS ONE* **13**, e0190730. Public Library of Science.
45. Lansard M, Panserat S, Seilliez I, et al. (2009) Hepatic protein kinase B (Akt)–target of rapamycin (TOR)-signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets. *Br J Nutr* **102**, 1564.
46. Steffens W (1994) Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **124**, 27–34.

47. Parés-Sierra G, Durazo E, Ponce MA, et al. (2014) Partial to total replacement of fishmeal by poultry by-product meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect on fatty acids from muscle tissue and the time required to retrieve the effect. *Aquaculture Research* **45**, 1459–1469.
48. Lee K-J, Dabrowski K, Blom JH, et al. (2001) Replacement of Fish Meal by a Mixture of Animal By-Products in Juvenile Rainbow Trout Diets. *North American Journal of Aquaculture* **63**, 109–117. Taylor & Francis.
49. Karapanagiotidis IT, Psafakis P, Mente E, et al. (2019) Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition* **25**, 3–14.
50. Soares M, Rezende PC, Corrêa NM, et al. (2020) Protein hydrolysates from poultry by-product and swine liver as an alternative dietary protein source for the Pacific white shrimp. *Aquaculture Reports* **17**, 100344.
51. Davies SJ, Gouveia A, Laporte J, et al. (2009) Nutrient digestibility profile of premium (category III grade) animal protein by-products for temperate marine fish species (European sea bass, gilthead sea bream and turbot). *Aquaculture Research* **40**, 1759–1769.
52. Cruz-Suárez LE, Nieto-López M, Guajardo-Barbosa C, et al. (2007) Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* **272**, 466–476.
53. Hernández C, Olvera-Novoa M a., Hardy R w., et al. (2010) Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance. *Aquaculture Nutrition* **16**, 44–53.
54. Refstie S, Korsøen ØJ, Storebakken T, et al. (2000) Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **190**, 49–63.
55. Øverland M, Karlsson A, Mydland LT, et al. (2013) Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **402–403**, 1–7.
56. Olvera-Novoa M a., Martínez-Palacios C a. & Olivera-Castillo L (2002) Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) fry. *Aquaculture Nutrition* **8**, 257–264.
57. Rolland M, Larsen BK, Holm J, et al. (2015) Effect of plant proteins and crystalline amino acid supplementation on postprandial plasma amino acid profiles and metabolic response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Int* **23**, 1071–1087.
58. Yuan X-Y, Jiang G-Z, Wang C-C, et al. (2019) Effects of partial replacement of fish meal by yeast hydrolysate on antioxidant capability, intestinal morphology, and inflammation-related gene expression of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Physiol Biochem* **45**, 187–197.
59. Tang H, Wu T, Zhao Z, et al. (2008) Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **9**, 684–690.
60. Esmaeili M (2021) Blood Performance: A New Formula for Fish Growth and Health. *Biology* **10**, 1236. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

61. Raskovic B, Stankovic M, Markovic Z, et al. (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J Agric Sci BGD* **56**, 87–100.
62. Baeverfjord G & Krogdahl A (1996) Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases* **19**, 375–387.
63. Sahlmann C, Sutherland BJG, Kortner TM, et al. (2013) 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**, 599–609.
64. van den Ingh TSGAM, Krogdahl Å, Olli JJ, et al. (1991) Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture* **94**, 297–305.
65. Mirzaei M, Shavandi A, Mirdamadi S, et al. (2021) Bioactive peptides from yeast: A comparative review on production methods, bioactivity, structure-function relationship, and stability. *Trends in Food Science & Technology* **118**, 297–315.
66. Sánchez A & Vázquez A (2017) Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety* **1**, 29–46.
67. Martínez-Augustin O, Rivero-Gutiérrez B, Mascaraque C, et al. (2014) Food Derived Bioactive Peptides and Intestinal Barrier Function. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 22857–22873. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
68. Cicero AFG, Fogacci F & Colletti A (2017) Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology* **174**, 1378–1394.
69. He Y, Ye G, Chi S, et al. (2020) Integrative Transcriptomic and Small RNA Sequencing Reveals Immune-Related miRNA–mRNA Regulation Network for Soybean Meal-Induced Enteritis in Hybrid Grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂. *Frontiers in Immunology* **11**.
70. Abernathy J, Brezas A, Snekvik KR, et al. (2017) 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**, e0180972. Public Library of Science.
71. Yin X, Li X, Chen N, et al. (2021) Hemopexin as an acute phase protein regulates the inflammatory response against bacterial infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules* **187**, 166–178.
72. Ho A-S, Cheng C-C, Lee S-C, et al. (2010) Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J Biomed Sci* **17**, 58.
73. Chen G, Wan H, Luo F, et al. (2010) Foxa2 Programs Th2 Cell-Mediated Innate Immunity in the Developing Lung. *The Journal of Immunology* **184**, 6133–6141. American Association of Immunologists.
74. Xie W, Xue Y, Zhang H, et al. (2022) A high-concentrate diet provokes inflammatory responses by downregulating Forkhead box protein A2 (FOXA2) through epigenetic modifications in the liver of dairy cows. *Gene* **837**, 146703.
75. Laskin JD, Dokidis A, Gardner CR, et al. (1991) Changes in sulfated proteoglycan production after activation of rat liver macrophages. *Hepatology* **14**, 306–312.
76. Beinrohr L, Murray-Rust TA, Dyksterhuis L, et al. (2011) Chapter Four - Serpins and the Complement System. In *Methods in Enzymology*, vol. **499**, pp. 55–75 [Whisstock JC, Bird PI, editors]. Academic Press.
77. Yang M, Liu Y, Dai J, et al. (2018) Apolipoprotein A-II induces acute-phase response associated AA amyloidosis in mice through conformational changes of plasma lipoprotein structure. *Sci Rep* **8**, 5620.

78. Yamaguchi T, Miyashita C, Koyano S, et al. (2009) JNK-binding protein 1 regulates NF- κ B activation through TRAF2 and TAK1. *Cell Biology International* **33**, 364–368.
79. Lee CQE, Kerouanton B, Chothani S, et al. (2021) Coding and non-coding roles of MOCCI (C15ORF48) coordinate to regulate host inflammation and immunity. *Nat Commun* **12**, 2130. Nature Publishing Group.
80. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, et al. (2016) Core Fucosylation on T Cells, Required for Activation of T-Cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, Is Increased in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **150**, 1620–1632.
81. Cantero-Recasens G, Burballa C, Ohkawa Y, et al. (2022) The ulcerative colitis-associated gene FUT8 regulates the quantity and quality of secreted mucins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2205277119.
82. Liang G, Malmuthuge N, Bao H, et al. (2016) Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system development in the small intestine of neonatal calves. *BMC Genomics* **17**, 602.
83. Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, et al. (2016) Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunological Reviews* **274**, 33–58.
84. Reyes-Becerril M, Angulo C, Angulo M, et al. (2021) Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research* **52**, 2715–2726.
85. Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, et al. (2008) Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 731–739.
86. Liu S-Y, Aliyari R, Chikere K, et al. (2013) Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* **38**, 92–105.
87. Krasnov A, Johansen L-H, Karlsen C, et al. (2021) Transcriptome Responses of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) to Viral and Bacterial Pathogens, Inflammation, and Stress. *Front. Immunol.* **12**, 705601.
88. Wu H, Mu L, Yin X, et al. (2020) A microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4) from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) possesses agglutination and opsonization ability to bacterial pathogens. *Fish & Shellfish Immunology* **104**, 182–191.
89. Smolinska S, Winiarska E, Globinska A, et al. (2022) Histamine: A Mediator of Intestinal Disorders—A Review. *Metabolites* **12**, 895. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
90. Galindo-Villegas J, Garcia-Garcia E & Mulero V (2016) Role of histamine in the regulation of intestinal immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* **64**, 178–186.
91. Addinsall AB, Wright CR, Andrikopoulos S, et al. (2018) Emerging roles of endoplasmic reticulum-resident selenoproteins in the regulation of cellular stress responses and the implications for metabolic disease. *Biochemical Journal* **475**, 1037–1057.
92. Pählman LI, Mörgelin M, Kasetty G, et al. (2013) Antimicrobial activity of fibrinogen and fibrinogen-derived peptides – a novel link between coagulation and innate immunity. *Thromb Haemost* **109**, 930–939. Schattauer GmbH.
93. Zhang J, Dong J, Gu H, et al. (2012) CD9 Is Critical for Cutaneous Wound Healing through JNK Signaling. *Journal of Investigative Dermatology* **132**, 226–236.

94. Huang X, Swanson R, Broze GJ, et al. (2008) Kinetic Characterization of the Protein Z-dependent Protease Inhibitor Reaction with Blood Coagulation Factor Xa. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 29770–29783.
95. Shamran H, Singh NP, Zumbrun EE, et al. (2017) Fatty acid amide hydrolase (FAAH) blockade ameliorates experimental colitis by altering microRNA expression and suppressing inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity* **59**, 10–20.
96. Anee IJ, Alam S, Begum RA, et al. (2021) The role of probiotics on animal health and nutrition. *The Journal of Basic and Applied Zoology* **82**, 52.

Table 1. Formulation and proximate composition of experimental diets. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract; DM, dry matter.

	CTL	PAP	PAP+YE
<i>Ingredient (%)</i>			
Corn gluten	15.0	17.9	16.0
Soy protein concentrate	14.0	11.0	12.0
Soybean meal	12.0	10.5	8.3
Faba bean	8.0	12.0	8.0
Whole wheat	10.8	9.2	13.0
Fishmeal	19.0	-	-
Dehydrated poultry protein	-	10.0	10.0
Hydrolyzed feather meal	-	6.0	6.0
Poultry and pig blood meal	-	1.0	1.0
Rapeseed oil	12.2	10.5	10.5
Fish oil	7.0	7.9	7.9
Yeast extract	-	-	3.0
L-lysine	-	0.3	0.5
L-methionine	-	0.3	0.3
Soy lecithin	-	0.5	0.4
Vitamin premix ¹	1.0	1.0	1.0
Dicalcium phosphate	-	1.0	1.0
Mineral premix ²	1.0	1.0	1.0
Yttrium	0.1	0.1	0.1
<i>Proximate composition³</i>			
Dry matter (%)	97.1	97.4	97.2
Protein (%DM)	46.9	46.5	46.3
Lipid (%DM)	22.1	21.6	20.8
Energy (%DM)	25.0	25.1	24.9
Ash (%DM)	6.76	5.53	5.59
Starch (%DM)	12.1	13.5	14.2

¹Provided per 100 g of premix: vitamin A 500 000 IU, vitamin D3 250 000 IU, vitamin E 5 00 mg, vitamin C 1 429 mg, vitamin B1 10 mg, vitamin B2 50 mg, vitamin B3 100 mg, vitamin B5 200 mg, vitamin B6 30 mg, vitamin B7 3 000 mg, vitamin B8 100 mg, vitamin B9 10 mg, vitamin B12 100 mg, vitamin K3 200 mg, folic acid 10 mg, biotin 100 mg, choline chloride 16 700 mg, and cellulose 76 921mg.

²Provided per 100 g of premix: calcium hydrogen phosphate 49 478 mg, calcium carbonate 21 500 mg, sodium chloride 4 000 mg, potassium chloride 9 000 mg, magnesium oxide 12 400 mg, iron sulfate 2 000 mg, zinc sulfate 900 mg, manganese sulfate 300 mg, copper sulfate 300 mg, cobalt chloride 2 mg, potassium iodide 15 mg, sodium selenite 5 mg and sodium fluoride 100 mg.

³Analyzed values

Table 2. Apparent digestibility coefficients (ADCs) of nutrients and energy. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract. Data are presented as the mean \pm standard deviation (STD) (n=3 per condition). Degrees of significance (p-value) were estimated with a one-way ANOVA followed by a Tukey's test, or a Kruskal-Wallis test. Different letters indicate significant differences among groups.

Nutrients or energy	CTL		PAP		PAP+YE		p-value
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD	
Dry matter	81.5 ^c	0.24	84.6 ^a	0.15	82.9 ^b	0.20	<0.001
Protein	90.7 ^b	0.42	91.6 ^a	0.27	91.1 ^{ab}	0.35	0.04
Lipids	93.8	1.89	94.5	0.48	93.6	0.05	0.56
Minerals	43.8	1.44	51.8	0.92	44.2	1.22	0.08
Starch	93.8	0.64	95.3	0.62	95.2	0.83	0.08
Energy	87.5 ^b	0.63	88.9 ^a	0.39	87.5 ^b	0.61	0.03

Table 3. Growth performances and consumption parameters. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract; SGR, specific growth rate; FE, feed efficiency; DFI, daily feed intake; HSI, hepatosomatic index; VS.I, viscerosomatic index. Data are presented as the mean \pm standard deviation (STD) (n=3 per condition). Degrees of significance (p-value) were estimated with a one-way ANOVA followed by a Tukey's test, or a Kruskal-Wallis test. Different letters indicate significant differences among groups.

	CTL		PAP		PAP+YE		p-value
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD	
Initial body weight (g)	36.7	1.98	36.6	1.00	37.1	2.32	0.99
Final body weight (g)	230.5 ^a	7.6	182.3 ^c	13.5	206.7 ^b	14.2	0.01
SGR (day ⁻¹)	2.19 ^a	0.05	1.91 ^b	0.12	2.04 ^{ab}	0.05	0.02
FE	1.16	0.01	0.99	0.04	1.15	0.03	0.06
DFI (%/day)	1.49 ^b	0.01	1.61 ^a	0.04	1.44 ^b	0.04	0.006
HSI (%)	1.18	0.20	1.31	0.22	1.36	0.24	0.18
VS.I (%)	13.7	2.10	12.97	1.39	14.09	2.19	0.47
Condition factor K	1.65	0.14	1.62	0.13	1.58	0.17	0.67

Table 4. Final whole-body composition. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract; DM, dry matter. Data are presented as the mean \pm standard deviation (STD) (n=3 per condition). Degrees of significance (p-value) were estimated with a one-way ANOVA followed by a Tukey's test, or a Kruskal-Wallis test.

	CTL		PAP		PAP+YE		p-value
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD	
Dry matter (%)	34.1	0.2	34.5	1.3	34.6	1.7	0.73
Ash (% DM)	5.9	0.1	5.8	0.3	5.7	0.3	0.79
Protein (% DM)	46.1	0.3	44.0	1.8	42.4	2.2	0.09
Total lipids (% DM)	51.3	0.7	55.1	2.5	57.0	7.3	0.11
Energy (% DM)	30.3	0.2	30.4	0.5	30.7	0.4	0.40

Table 5. Use of the diets. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract. Data are presented as the mean \pm standard deviation (STD) (n=3 per condition). Degrees of significance (p-value) were estimated with a one-way ANOVA followed by a Tukey's test, or a Kruskal-Wallis. Different letters indicate significant differences among groups.

	CTL		PAP		PAP+YE		p-value
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD	
Gain							
Energy (kJ/g)	1.86	0.02	1.78	0.14	1.83	0.13	0.65
Protein (g/kg/day)	2.73 ^a	0.01	2.28 ^c	0.14	2.51 ^b	0.04	0.002
Lipids (g/kg/day)	3.18	0.02	3.39	0.70	3.38	0.36	0.67
Retention							
Energy (%)	51.6 ^{ab}	0.76	45.2 ^b	1.85	52.2 ^a	4.07	0.03
Protein (%)	40.4 ^a	0.48	31.3 ^b	2.26	38.7 ^a	0.93	0.03
Lipids (%)	99.8	2.12	99.7	16.2	115.9	12.8	0.24

Table 6. Plasma immune parameters. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein feed supplemented with 3% yeast extract; ACP, alternative complement pathway. Data are presented as the mean \pm standard deviation (STD) (n=9 per condition). Degrees of significance (p-value) were estimated with a one-way ANOVA test or a Kruskal-Wallis. Different letters indicate significant differences among groups.

	CTL		PAP		PAP+YE		p-value
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD	
Lysozyme activity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	11.4	3.3	9.8	3.5	10.9	4.8	0.37
Peroxidase activity (U/mL)	19.7 ^a	17.0	9.7 ^b	8.1	12.4 ^{ab}	10.4	0.04
ACP (U/mL)	103.5	42.2	106.6	48.32	115.4	38.9	0.60
Total immunoglobulin (OD _{450nm})	0.61 ^b	0.18	0.70 ^b	0.15	0.88 ^a	0.16	0.001

Table 7. Differentially expressed hepatic genes grouped by diet comparison and putative function. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract. N=6 per condition.

Comparison	Gene name and putative function	Abbreviation	Ensembl ID	log2FoldChange	padj
PAP vs. CTL	<i>Immunity and inflammation</i>				
	Hemopexin a	<i>hpx</i>	ENSOMYG00000000744	1.34	0.01
	Proteoglycan 4	<i>prg4</i>	ENSOMYG00000011441	0.64	0.01
	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	<i>csgalnact2</i>	ENSOMYG00000043233	0.71	0.04
	Alpha-2-macroglobulin isoform X2	<i>α2m</i>	ENSOMYG00000036729	0.79	0.03
	Forkhead box protein A2-like	<i>foxa2</i>	ENSOMYG00000011219	1.04	0.04
	Complement component C3-3	<i>c3-3</i>	ENSOMYG00000018801	0.61	0.04
	<i>Cell protection</i>				
	NADPH--cytochrome P450 reductase	<i>por</i>	ENSOMYG00000032398	-0.64	0.04
	<i>Others</i>				
	Guanine deaminase	<i>gda</i>	ENSOMYG00000026930	1.95	<0.001
	Histone H1.0-B-like	<i>h10b</i>	ENSOMYG00000018545	0.98	0.01
5.8S ribosomal RNA		ENSOMYG00000008170	2.22	0.04	
Uncharacterized protein		ENSOMYG00000035109	1.47	0.04	
PAP+YE vs. PAP	<i>Cell protection</i>				
	Myo-inositol oxygenase	<i>miox</i>	ENSOMYG00000029635	-1.00	<0.001
	<i>Coagulation</i>				
Protein Z-dependent protease inhibitor-like	<i>serpina10</i>	ENSOMYG00000042079	-1.10	0.002	
<i>Metabolism</i>					
Zinc transporter 1-like	<i>znt1</i> or <i>slc30a1</i>	ENSOMYG00000000887	0.60	0.003	

Table 8. Differentially expressed genes in the distal intestine grouped by diet comparison and putative function. CTL. commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP. processed animal protein diet; PAP+YE. processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract. N=6 per condition.

Comparison	Gene name and putative function	Abbreviation	Ensembl ID	log2FoldChange	padj
PAP vs. CTL	<i>Immunity and inflammation</i>				
	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	<i>serping1</i>	ENSOMYG00000011625	-6.50	0.001
	Apolipoprotein A-II	<i>apoa2</i>	ENSOMYG00000002485	-4.20	0.03
	<i>Metabolism</i>				
	Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2 isoform X3	<i>aldh3a2</i>	ENSOMYG00000044867	3.50	0.001
	<i>Coagulation and wound healing</i>				
	Fibrinogen beta chain	<i>fbg</i>	ENSOMYG00000017143	-5.30	0.04
	CD9 protein	<i>cd9</i>	ENSOMYG00000045180	-1.20	0.04
	<i>Endoplasmic reticulum stress</i>				
	Selenoprotein S-like	<i>selenos</i>	ENSOMYG00000033848	8.70	<0.001
Protein LEG1 homolog	<i>leg1</i>	ENSOMYG00000016452	-5.40	0.04	
<i>Others</i>					
	RIMS-binding protein 2	<i>rimbp2</i>	ENSOMYG00000031007	-2.90	<0.001
PAP+YE vs. CTL	<i>Immunity and inflammation</i>				
	T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain	<i>cd3d</i>	ENSOMYG00000029525	0.88	0.007
	Mitogen-activated protein kinase-binding protein 1 isoform X	<i>mapkbp1</i>	ENSOMYG00000017876	-4.23	0.02
	<i>Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein</i>	<i>c15orf48 or nmes1 or mocchi</i>	ENSOMYG00000016819	1.68	0.04
	<i>Alpha-(1.6)-fucosyltransferase</i>	<i>fut8</i>	ENSOMYG00000032051	-0.44	0.02
	<i>Antipathogen</i>				
	<i>Cholesterol 25-hydroxylase</i>	<i>ch25h</i>	ENSOMYG00000013956	1.89	0.03
	<i>Endoplasmic reticulum stress</i>				
	Selenoprotein S-like	<i>selenos</i>	ENSOMYG00000033848	22.6	<0.001
	<i>Metabolism</i>				
Zinc transporter ZIP4-like	<i>slc39a4</i>	ENSOMYG00000012539	-1.92	<0.001	
SEC16 homolog B. endoplasmic reticulum export factor	<i>sec16b</i>	ENSOMYG00000015924	-0.55	0.02	

	<i>Kelch repeat and BTB domain-containing protein 2-like</i>	<i>kbtbd2</i>	ENSOMYG00000030759	-1.20	0.03
	<i>Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2 isoform X3</i>	<i>aldh3a2</i>	ENSOMYG00000044867	3.14	0.03
	<i>Others</i>				
	BICD family-like cargo adapter 1	<i>bicdl1</i>	ENSOMYG00000031226	1.78	0.01
	Actin. alpha skeletal muscle 2	<i>acta1b</i>	ENSOMYG00000041113	-2.25	0.02
	Unnamed protein product		ENSOMYG00000034384	0.94	0.04
PAP+YE VS. PAP	<i>Immunity and inflammation</i>				
	Complement C3-like	<i>c3</i>	ENSOMYG00000038040	2.02	0.02
	<i>Antipathogen</i>				
	Histamine receptor H1	<i>hrh1</i>	ENSOMYG00000001293	-1.00	<0.001
	Microfibril associated protein 4	<i>mfap4</i>	ENSOMYG00000027695	1.72	0.02
	<i>Metabolism</i>				
	Zinc transporter ZIP4-like	<i>slc39a4 or zip4</i>	ENSOMYG00000012539	-2.40	<0.001
	<i>Coagulation and wound healing</i>				
	Fibrinogen beta chain	<i>fbg</i>	ENSOMYG00000017143	3.84	0.02
	<i>Others</i>				
GATA binding protein 4	<i>gata4</i>	ENSOMYG00000018611	-23.6	<0.001	
zgc:171566		ENSOMYG00000031594	-3.01	0.02	

Table 9. Differentially expressed hepatic miRNAs when comparing the PAP+YE and PAP diets. PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein diet supplemented with 3% yeast extract. N=6 per condition.

miRNA	log2FoldChange	padj
miR-222b-3p	1.08	0.01
miR-18a-5p	-1.17	0.01
miR-92a-3p	0.62	0.04
miR-217a-5p	-2.73	0.04

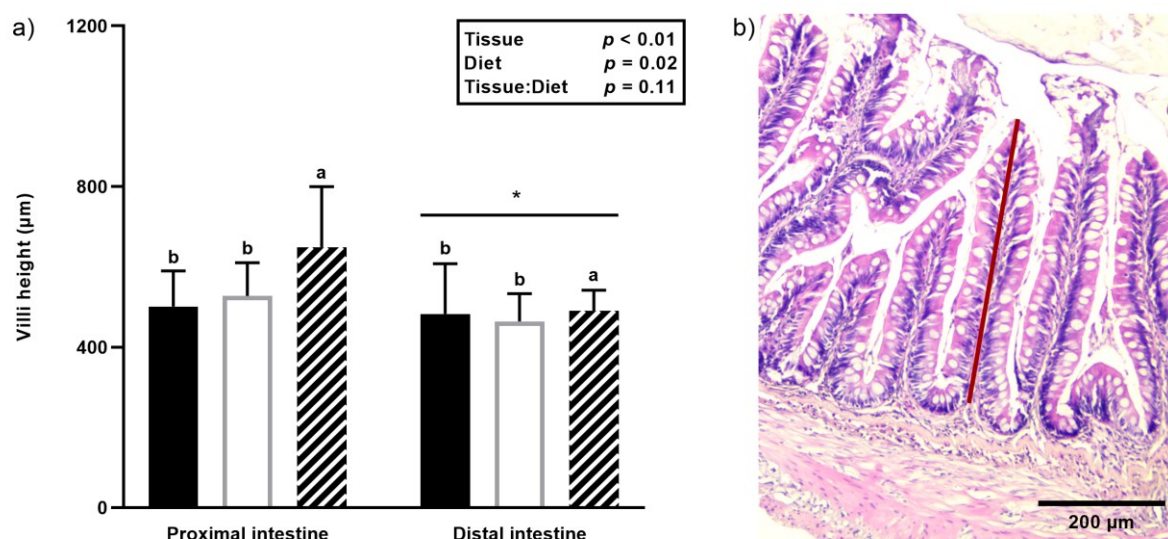


Fig. 1. Height of villi in the proximal and distal intestine in rainbow trout after 12 weeks of feeding (a) (■ fish fed the CTL diet; □ fish fed the PAP diet; ▨ fish fed the PAP+YE diet). Villi height was measured from the intestinal epithelium to their apical end, located towards the lumen, as indicated by the red line (b) (n=12 fish per diet). Data are represented as the mean and standard deviation, and were analyzed using a two-way ANOVA. Letters indicate significant differences between diets. * indicates significant differences between tissues. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein feed supplemented with 3% yeast extract.

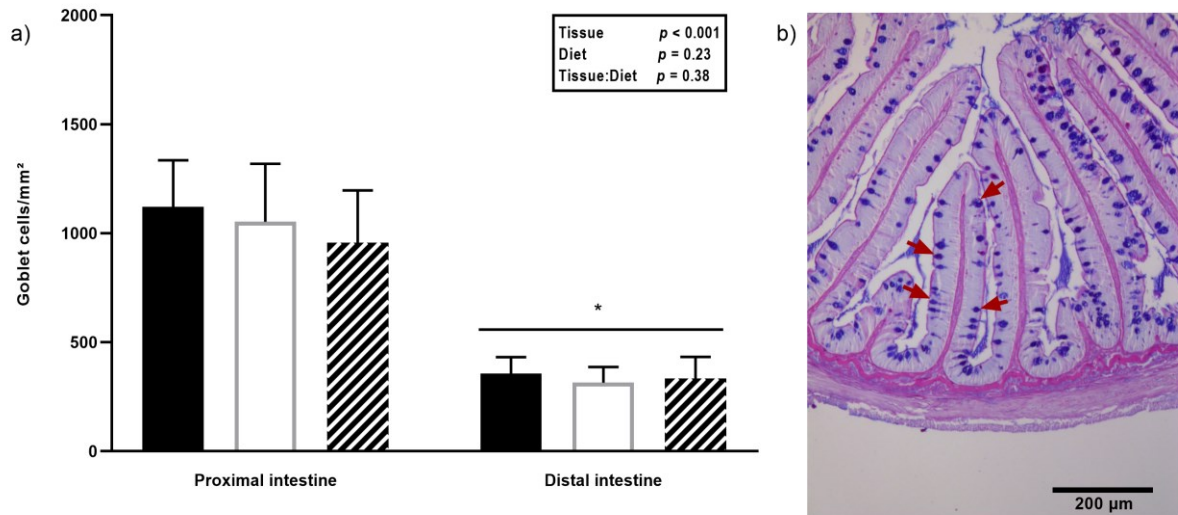


Fig. 2. Number of goblet cells per mm² in the proximal and distal intestine in rainbow trout after 12 weeks of feeding (a) (■ fish fed the CTL diet; □ fish fed the PAP diet; ▨ fish fed the PAP+YE diet). Goblet cells are indicated by red arrows and were counted and related to the area of the villi (b) (n=12 fish per diet). Data are represented by as mean and standard deviation, and were analyzed using a two-way ANOVA. * indicates significant differences between tissues. CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein feed supplemented with 3% yeast extract.

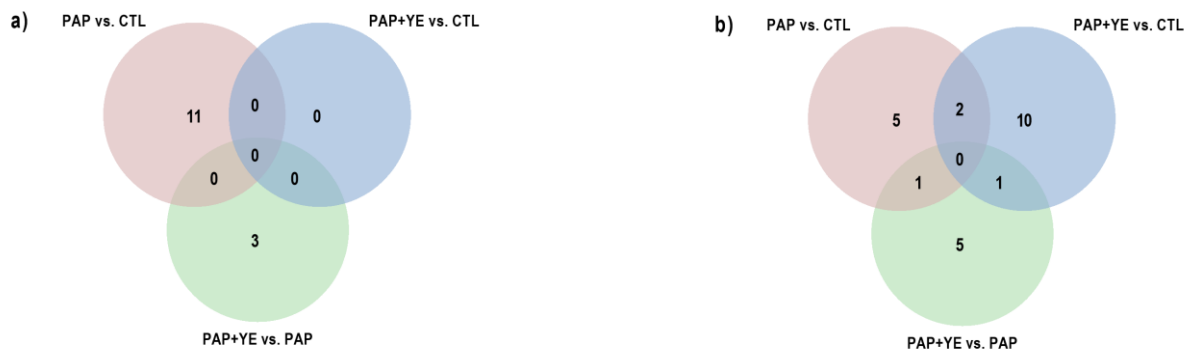
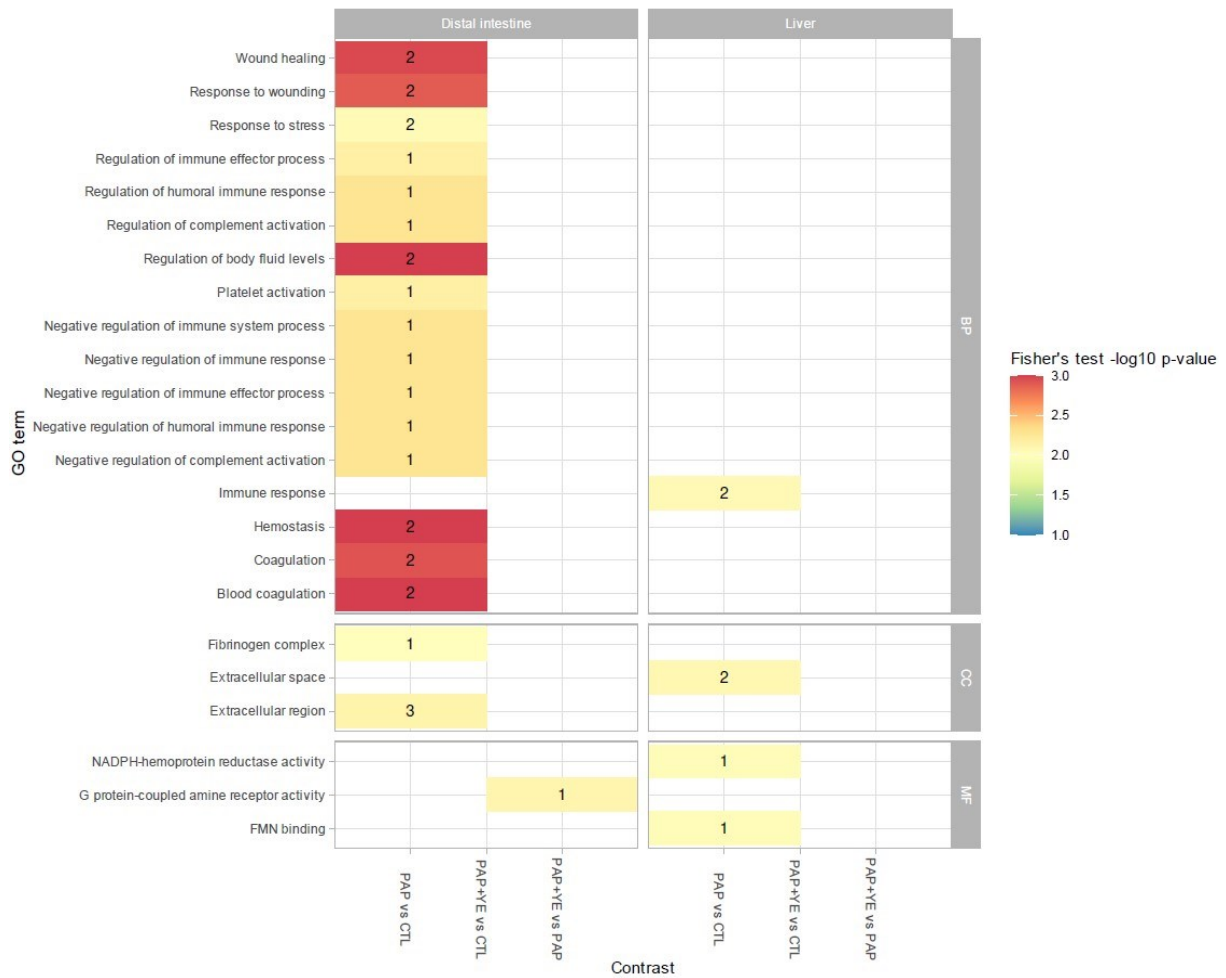


Fig. 3. Venn diagrams of RNA sequencing analysis in (a) the liver and (b) distal intestine of rainbow trout fed one of three experimental diets for 12 weeks. Each diagram summarizes the total number of differentially expressed genes in each tissue, the number of differentially expressed genes in each comparison and the common genes (in overlapping regions). CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein feed supplemented with 3% yeast extract.

Supplementary Table 1. Analytical composition (% dry matter (DM)) of the yeast extract (Prosaf®, Phileo by Lesaffre).

Component	Analysed values
Dry matter (%)	95.7
Crude protein (% DM)	71.6
Crude lipid (% DM)	< 0.5
Ash (% DM)	8.9
Energy (kJ/g DM)	20.1
Total nucleotides (% DM)	8.7
Phosphorus (g/kg DM)	13.8
Arginine (% DM)	3.1
Histidine (% DM)	1.3
Isoleucine (% DM)	2.8
Leucine (% DM)	4.0
Lysine (% DM)	4.6
Threonine (% DM)	2.7
Valine (% DM)	3.6
Methionine (% DM)	0.9
Cysteine (% DM)	0.8
Phenylalanine (% DM)	2.3
Tyrosine (% DM)	2.0
Tryptophan (% DM)	0.8
Alanine (% DM)	4.5
Aspartic acid (% DM)	6.4
Glutamic acid (% DM)	12.0
Glycine (% DM)	2.8
Proline (% DM)	2.9
Serine (% DM)	2.7



Supplementary Figure 1. Gene ontology enrichment of terms with significant differences (Fisher's exact test, p-value < 0.1) in the liver and distal intestine. Labels indicate the number of differentially expressed genes associated to a particular term (BP, biological process; CC, cellular component; MF, molecular function). CTL, commercial-like diet containing fishmeal and fish oil; PAP, processed animal protein diet; PAP+YE, processed animal protein feed supplemented with 3% yeast extract.

f. Résultats complémentaires : analyse des peptides bioactifs

Parmi un nombre moyen de 9785 peptides (> 3 acides aminés) identifiés dans l'extrait de levure analysé en triplicats techniques, le nombre de peptides qui correspondaient à la base de données de la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae* S288c ne dépassait pas 1 560 peptides en moyenne (**Tableau 15, p. 166**). Le séquençage *de novo* du logiciel PEAKS® a permis d'identifier en moyenne 8 224 peptides supplémentaires dans l'extrait de levure. Une recherche exacte des séquences bioactives comprises dans la liste globale de peptides a ensuite permis d'identifier en moyenne 70 peptides bioactifs de taille compris entre 3 et 5 acides aminés. Parmi ces 70 peptides, 62 séquences étaient communes entre au moins deux des trois répliques techniques (**Figure 25, p. 167**). Les propriétés bioactives de ces 62 peptides étaient associées à des fonctions antioxydantes (24 séquences, 30 % des peptides bioactifs), à des fonctions « *ACE inhibitor* » (34 séquences, 42,5 % des peptides bioactifs), à des fonctions « *DPP IV inhibitor* » (5 séquences, 6,3% des peptides bioactifs) et à des fonctions anti-inflammatoires (4 séquences, 5% des peptides bioactifs). La majorité des peptides bioactifs identifiés a été assignée à une seule activité, mais certains possédaient deux ou plusieurs activités biologiques.

Tableau 15 Résultats de l'analyse peptidomique de l'extrait de levure utilisé dans l'aliment PAP+YE.

	Répliques 1	Répliques 2	Répliques 3	Valeurs moyennes
Peptides totaux	10 349	10 199	8 806	9 785
Peptides DB ¹	1 700	1576	1406	1 560
Peptides identifiés de novo	8 649	8623	7 400	8 224
Peptides bioactifs	71	75	63	70

¹Peptides correspond à la base de données de la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae* S288c

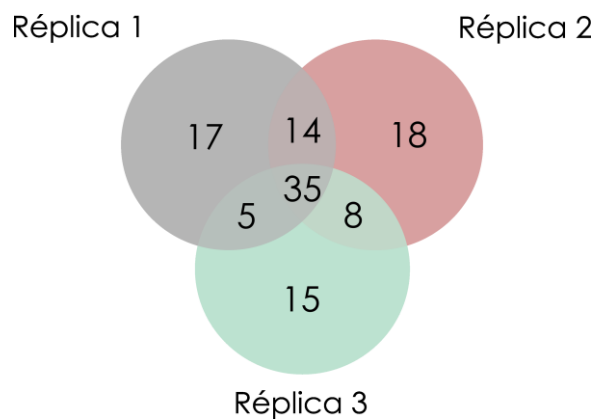


Figure 25 Nombre de peptides bioactifs communs aux répliques techniques de l'analyse peptidomique de l'extrait de levure utilisée dans l'aliment PAP+YE.

3. *In vivo* : effets à court-terme d'une supplémentation en extrait de levure dans un régime dépourvu en farine de poissons composé de protéines animales transformées ou de végétaux

a. Contexte et objectifs

Après avoir démontré l'intérêt d'une supplémentation en extrait levurien pour améliorer la croissance de la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime à base de végétaux et coproduits d'animaux terrestres, nous avons cherché à déterminer si le phénotype observé au terme des 12 semaines d'alimentation et les mécanismes moléculaires associés résultaient d'une réaction précoce de l'animal aux régimes expérimentaux. Pour répondre à cette question, des truites arc-en-ciel ont été mise à jeun pendant 4 jours afin de vider le contenu de leur tube digestif puis réalimentées pendant 8 jours avec les mêmes régimes expérimentaux que ceux utilisés dans l'essai de croissance.

b. Approche méthodologique

Les effets à court-terme d'une supplémentation en extrait de levure dans un régime à base de végétaux et de protéines animales transformées ont été étudiés en analysant certains marqueurs de la

réponse immunitaire systémique, en évaluant la structure de la muqueuse intestinale et en mesurant l'expression d'un ensemble de gènes dont certains ont été identifiés comme différentiellement exprimés à l'issue de l'essai de croissance.

c. Résultats

Au cours de la période d'alimentation et pour la majorité des paramètres considérés, quasiment aucune différence significative n'a été observée en réponse aux différents aliments que ce soit pour les marqueurs immunitaires plasmatiques, la structure de l'intestin ou l'expression des gènes. On note uniquement une augmentation de l'expression de la claudine 15 chez les poissons nourris avec l'aliment supplémenté avec l'extrait de levure comparés aux poissons nourris avec le régime CTL composé de farine de poisson. En revanche, la privation de nourriture pendant 4 jours suivie d'une réalimentation a affecté de manière significative la plupart des paramètres analysés. La surface des villosités a augmenté de manière significative au cours de la réalimentation dans l'intestin proximal alors que la densité des cellules de gobelet a eu tendance à diminuer. Bien qu'il n'y ait pas eu de modification de la réponse immunitaire plasmatique ou de signes majeurs d'inflammation intestinale, certains gènes hépatiques et intestinaux impliqués dans la structure, la cascade du complément, les fonctions antivirales, la coagulation et la réponse au stress du réticulum endoplasmique ont été significativement régulés par la réalimentation qui a fait suite à 4 jours de jeûne.

d. Éléments de discussion

Nous n'avons pas démontré de bénéfices précoces ou d'incidences associés à l'utilisation d'un régime sans farine de poisson contenant des protéines animales transformées, supplémenté ou non par l'extrait de levure, sur la réponse immunitaire et la structure intestinale de la truite arc-en-ciel. Par conséquent, la diminution des performances de croissance associée au régime PAP, l'amélioration de l'efficacité de ce régime avec l'ajout d'extrait de levure, ainsi que les changements dans les profils transcriptomiques hépatiques et intestinaux observés à long terme n'étaient probablement pas liés à une réaction rapide et précoce de l'animal, mais plutôt le fruit d'une adaptation à long terme. En revanche, cette étude met en évidence qu'un jeûne de courte durée modifie de manière significative la physiologie de l'intestin et du foie, indépendamment de la composition du régime alimentaire. Des périodes de jeûne de courte durée sont couramment pratiquées en élevage en prévision d'un transport,

d'une manipulation des poissons ou pour gérer un épisode infectieux. Ces courtes périodes de privation alimentaire, bien que n'ayant pas de conséquence sur la survie du poisson, ne sont néanmoins pas dénuées d'effets physiologiques pour l'animal.

e. Article 2

GUT PHYSIOLOGY OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) IS INFLUENCED MORE BY SHORT-TERM FASTING FOLLOWED BY REFEEDING THAN BY FEEDING FISHMEAL-FREE DIETS

Laura Frohn^{1,2}, Diogo Peixoto^{3,4}, Frédéric Terrier¹, Benjamin Costas^{3,4}, Jérôme Bugeon⁵, Christel Cartier⁶, Nadège Richard², Karine Pinel¹, Sandrine Skiba-Cassy¹

¹INRAE, Univ. Pau & Pays Adour, E2S UPPA, NUMEA, F-64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France

²Phileo by Lesaffre, F-59700 Marcq-en-Barœul, France

³ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 4050-313 Porto, Portugal

⁴CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, 4450-208 Matosinhos, Portugal

⁵INRAE, LPGP, Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France

⁶INRAE, ToxAlim, ENVIT, INP El Purpan, UPS, F-31027 Toulouse, France

Abbreviated title

Short-term fasting and refeeding of rainbow trout

Corresponding author

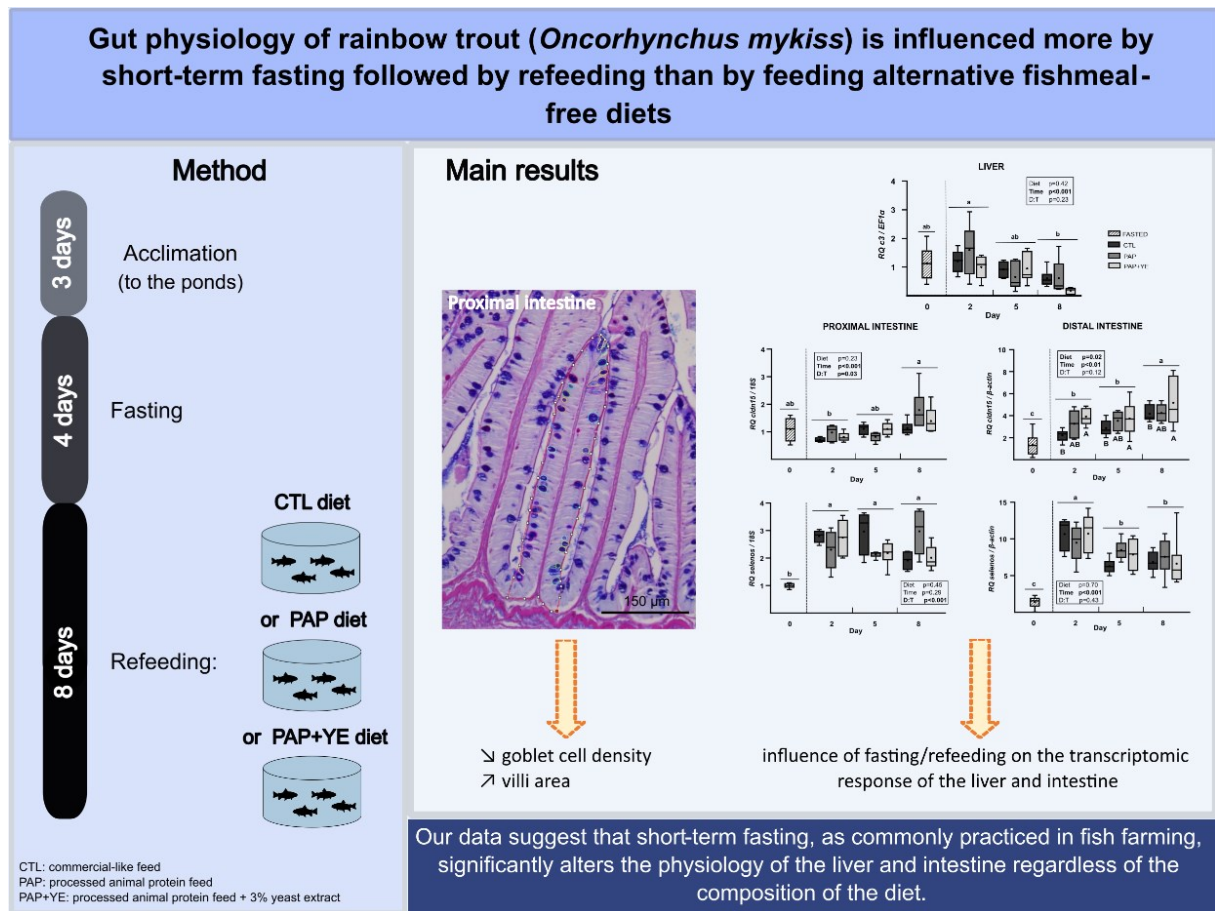
Sandrine Skiba-Cassy

E-mail: sandrine.skiba@inrae.fr

Telephone: +33 559515993

Abstract

Supplementing a fishmeal-free diet with yeast extract improves rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance and modulates the hepatic and intestinal transcriptomic response. These effects are often observed in the long term, but are not well documented after short periods of fasting. Fasting for a few days is a common practice in fish farming, especially before handling the fish, such as for short sorting, tank transfers and vaccinations. In the present study, rainbow trout were subjected to a four-day fast and then refed, for eight days, a conventional diet containing fishmeal (control diet) or alternative diets composed of terrestrial animal by-products supplemented or not with a yeast extract. During the refeeding period alone, most of the parameters considered did not differ significantly in response to the different feeds. Only the expression of claudin-15 was upregulated in fish fed the yeast-supplemented diet compared to the control diet. Conversely, fasting followed by refeeding significantly influenced most of the parameters analyzed. In the proximal intestine, the surface area of villi significantly increased and the density of goblet cell tended to decrease during refeeding. Although no distinct plasma immune response or major signs of gut inflammation were observed, some genes involved in the structure, complement pathway, antiviral functions, coagulation and endoplasmic reticulum stress response of the liver and intestine were significantly regulated by refeeding after fasting. These results indicate that short-term fasting, as commonly practiced in fish farming, significantly alters the physiology of the liver and intestine regardless of the composition of the diet.



1. Introduction

Aquaculture rearing practices and feeds changed greatly during the 20th century. Development of extruded pellets in the late 1980s and the gradual replacement of fishmeal and fish oil with plant ingredients (e.g. whole grains, oilseeds, legumes) helped address the constraints faced by the sector, particularly in reducing human pressures on wild forage-fish populations ^(1, 2). From 1990-2020, especially for Atlantic salmon (*Salmo salar*), the contents of fish oil and fishmeal in feed decreased from 65.4% and 24.0%, respectively, to 12.1% and 10.3%, respectively, with no influence on zootechnical performances ⁽³⁾. Nonetheless, most carnivorous fish species, such as salmonids (salmon and trout), are sensitive to dietary changes, which prohibits completely replacing fishmeal and fish oil in their feed. Thus, for these species, plant-based diets are likely to influence feed intake, nutrient digestion, absorption and assimilation (e.g. metabolism) ⁽⁴⁻⁶⁾. These diets can also degrade intestinal health by causing inflammation in the digestive tract, likely due to the presence of anti-nutritional factors (e.g. oligosaccharides, lectins, saponins) in the plant ingredients ^(7, 8). Therefore, plant-based diets are likely to decrease the growth and degrade the health of the fish, thus rendering them more sensitive to stress ^(9, 10).

In addition to plant ingredients, the aquaculture sector is considering other replacements for marine ingredients, such as insect meals, microalgae and industrial by-products from terrestrial animals. However, their use is restricted due to variable growth performances that result from their inconsistent quality and nutritional values, as well as the amounts included in diets ⁽¹¹⁾. Including functional ingredients can meet the objectives of maintaining acceptable growth performances and mitigating adverse effects of alternative diets. For example, yeast can be included whole or in derived form (i.e. cell wall, cytosolic fraction, purified components). Including yeast in feed has been shown to provide many benefits for most terrestrial and aquatic livestock, such as improvements in feed palatability, nutrient digestibility (due to enzyme production and intestinal pH regulation), the immune system and pathogen resistance (due to bioactive components such as MOS, β -glucan, nucleotides and peptides), the quality of meat and milk, egg production of poultry and growth performances of fish and pigs ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

The performance of new feeds or the benefits of feed additives are often examined over the long term to assess effects on growth without necessarily analyzing the early physiological responses of animals. However, a study of Atlantic salmon fed a soybean meal diet showed that diet can have effects on the first day of exposure, particularly on intestinal histopathology and on the regulation of genes involved in immunity, detoxification, cellular repair and metabolism ⁽¹⁵⁾. These early effects should be reconsidered, since periods of fasting and refeeding are frequently implemented in aquaculture. On fish farms, short-term fasting is strongly recommended and commonly applied during periods of stress (i.e.

animal handling, transport between different production sites, epizootic situations) or in order to induce a compensatory growth^(16–18). It lowers the metabolic rate of fish and causes the energy required for digestion to be directed to vital functions such as maintaining cellular homeostasis and immune functions, without necessarily causing weight loss. Like birds and mammals, fish in their natural environment are frequently subjected to periods of fasting during winter, migration periods and reproduction events^(19, 20). Even when short, these periods influence gut microbiota⁽²¹⁾, metabolism⁽²²⁾, and digestive and hepatic physiology^(20, 23, 24).

In this study, we evaluated the influences of a short fasting period followed by refeeding on the histology of the intestine and parameters related to defense and protection mechanisms. In this context, we compared three diets: a conventional efficient diet containing fishmeal and fish oil, an alternative diet based on plant ingredients and terrestrial animal by-products (which had decreased the growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a previous study⁽²⁵⁾) and the same diet supplemented with yeast extract (which had significantly increased their growth).

2. Materials and methods

Ethical statement

Rainbow trout were reared at the French National Research Institute for Agriculture, Feed and Environment (INRAE) experimental facility⁽²⁶⁾, authorized for animal experimentation by the French Veterinary Service (A64-495-1 and A40-228-1). The technical staff received training and authorization to conduct experiments. The experiment was conducted in strict agreement with Directive 2010/63/EU of European Union regulations on the protection of animals used in scientific research, and the National Guidelines for Animal Care of the French Ministry of Research (decree no. 2013-118, 02 Jan 2013). The experiment did not need approval from the ethical committee (C2EA-73) since it complied with current rearing standards.

Feed formulation and experimental design

Rainbow trout, with mean body weight of 232 ± 39 g, were reared in 80 L tanks supplied continuously with well-oxygenated freshwater at 17 °C. Three experimental feeds were formulated to meet the nutritional requirements of the rainbow trout according to NRC recommendations⁽²⁷⁾. The control diet (CTL) was formulated as close as possible to a commercial feed and contained 19% fishmeal and 7.0%

of fish oil. Two processed animal protein diets (10% dehydrated poultry protein, 6% hydrolyzed feather meal and 1 % poultry and pig blood meal) were also formulated: one not supplemented (PAP) and one supplemented with yeast extract (PAP+YE). The yeast extract used contained the cytosolic fraction of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Prosaf®, Phileo by Lesaffre, Marcq-en-Barœul, France). The contents of other ingredients in the experimental feeds varied (Table 1).

Rainbow trout were distributed among four tanks, which contained 30 fish each. After batching, the fish were acclimated and fed a commercial feed (T3P Omega®, Skretting, Fontaine-les-Vervins, France) for three days (distributed daily to visual satiation) and then fasted for four days to empty their digestive tracts completely. Then, each experimental diet was randomly assigned to three tanks, and fish were fed twice a day until visual satiation, for eight days. The fish in the fourth tank, which were not refed after fasting, were used to represent day 0 of the experiment, when six of them were sampled by anesthetizing and euthanizing them in successive baths of tricaine (50 mg/L and 150 mg/L, respectively). On days 2, 5 and 8, fish in each of the other tanks were sampled in the same way, 6 hours after the last meal. Samples of the liver and distal intestine were collected, soaked in RNA later and immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80 °C until molecular analyses was performed. Additional samples of the proximal and distal intestine were fixed in a 10% buffered formalin solution before being processed for histological analysis. Blood was drawn from the caudal vein using an EDTA-treated syringe, centrifuged at 3000 g for 10 minutes and the plasma extracted was stored at -20°C until plasma immune markers were quantified.

Plasma immune markers

Activities of the alternative complement pathway, lysozyme and peroxidase were measured in the plasma, as described by Frohn et al. ⁽²⁵⁾. Total antiprotease activity was determined by assessing the ability of plasma to inhibit trypsin activity, as described by Peixoto et al. ⁽²⁸⁾.

Histology of intestine

According to recommendations of Feldman & Wolfe ⁽²⁹⁾, samples of proximal and distal intestine were fixed in buffered formalin, dehydrated in successive ethanol baths, clarified in xylene and embedded in paraffin blocks. Transverse intestine sections 2 µm thick were cut using a semi-automatic rotating microtome (HM 340E, Microm Microtech, Brignais, France). Tissue was then stained with periodic acid-Schiff alcian blue to assess gut morphology and count the number of goblet cells in the intestinal mucosa, as it has been described by Frohn et al. ⁽²⁵⁾.

Image analysis

Images of the intestinal mucosa were obtained using a microscope (DMRB, Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera (DP71 1.4M pixels, Olympus, Tokyo, Japan). The images were then processed using two macros that were created using the MorphoLibJ⁽³⁰⁾ and StarDist⁽³¹⁾ plugins of FIJI 1.53t software⁽³²⁾. The first macro measured the surface area (μm^2) of a given villus and counted the number of goblet cells in it, in order to calculate the density of goblet cells (per mm^2). The cells were detected using the StarDist Versatile (H&E nuclei) model, and each villus of interest was manually delineated (polygon-selection tool). The cells inside the villus were manually corrected if incorrectly segmented (Fig. 1). The second macro measured villi height (μm) manually using the segmented-line tool of FIJI. Five villi per section were analyzed.

Molecular analysis: RNA extraction and real-time RT-qPCR

Total RNA was extracted from the liver, proximal intestine and distal intestine (n = 6 per sampling day and diet) according to the miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was treated with the Turbo DNA-free kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) to avoid genomic DNA contamination. RNA integrity was verified on 1% agarose gel, and RNA concentrations were quantified using a spectrophotometer (Nanodrop[®] ND1000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The cDNA synthesis was performed with 750 ng of total RNA using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and random primers (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to manufacturers' instructions. Then, for each gene of interest, real-time RT-qPCR was performed using the Lightcycler[®] 480 II system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with primers designed based on (i) genes identified in a previous study of Frohn et al. (25) using the same diet during a long-term feeding period and (ii) supplemental genes that are key markers of the pathways of interest (Table 2). These genes were involved in immunity and inflammation, structure, coagulation functions, cell protection, antiviral functions and endoplasmic reticulum stress.

Real-time RT-qPCR was performed using a reaction mix containing 2 μL of diluted cDNA, 3 μL of Light Cycler 480 SYBR[®] Green I Master mix (Roche Diagnostics, Switzerland), 0.24 μL of each primer (10X) and 0.52 μL of RNase- and DNase-free water (Thermo Fisher Scientific, USA). Negative controls constituted of RT- and cDNA-free samples. Each RT-qPCR assay was deposited in triplicates on a FrameStar[®] 384-well skirted qPCR plate (Roche Diagnostics, Switzerland). The qPCR program was initiated at 95°C for 10 minutes to denature the cDNA and activate the TAQ polymerase enzyme in a thermocycler (Lightcycler[®] 480 II Roche thermocycler, Roche Diagnostics, Switzerland). The initiation was followed by 45 amplification cycles, each consisting of successive thermal steps (15 sec at 95°C, 10 sec at 60°C and 15

sec at 72 °C). Melting curves (0.5°C/10 sec from 65 to 95°C) were run at the end of each amplification cycle to confirm the specificity of the reaction. The relative expression of genes was quantified using the $\Delta\Delta CT$ method (33). Expression levels were normalized relative to those of the fasted fish using elongation factor EF1 α (forward 5'-TCCTCTGGTCGTTTCGCTG-3'; reverse 3'-ACCCGAGGGACATCCTGTG-5'), 18S rRNA (forward 5'-CGGAGGTTCTGAAGACGATCA-3'; reverse 3'-TCGCTAGTTGGCATCGTTTAT-5') and β -actin (forward 5'-GATGGGCCAGAAAGACAGCTA-3'; reverse 3'-TCGTCCCCAGTTGGTGACGAT-5') for the liver, proximal intestine and distal intestine, respectively.

Statistical analysis

Plasma immune markers, histological parameters and gene expressions were statistically analyzed using the Rcmdr package of R software (version 4.1.2). For each dataset, normality of the distributions and homogeneity of the variances were assessed using a Shapiro-Wilk's test and a Levene's test, respectively. When these prerequisites were met, the effects of the diet and duration of refeeding (days 2, 5 and 8) were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) by excluding the fasted fish. Then, the influence of time (i.e. sampling day) was tested independent of the diet by analyzing the datasets from day 0 (fasted fish) to day 8 using one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant at the 5 % threshold.

3. Results

Plasma immune markers

Neither time nor diet (one-way ANOVA, $p > 0.05$) significantly influenced the plasma activities of the alternative complement pathway, lysozyme, antiprotease or peroxidase (two-way ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 2). However, an interaction between diet and time was observed for plasma lysozyme activity ($p < 0.05$), perhaps because it decreased significantly in fish fed the PAP diet on day 8 compared to day 2, and compared to the fish fed the CTL diet on days 5 and 8.

Histological parameters of the proximal and distal intestine

In the proximal and distal intestine, neither diet nor time significantly influenced villi height on days 2, 5 or 8 (two-way ANOVA, $p > 0.05$), and villi height did not differ significantly between fasted fish (day

0) and refed fish (one-way ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 3). In the proximal intestine, the diet did not influence villi surface area (two-way ANOVA, $p > 0.05$), but time did with a significant increase in villi surface area on day 8 compared to those on days 2 and 0 (two-way ANOVA, $p < 0.05$). The surface area of villi for fasted fish (day 0) and refed fish on day 2 was significantly smaller than that of refed fish on day 8 (one-way ANOVA, $p < 0.05$). In the distal intestine, neither diet nor time influenced villi surface area on days 2, 5 or 8 (two-way ANOVA, $p > 0.05$), nor did (one-way ANOVA, $p > 0.05$).

The diet did not influence the mean density of goblet cells in the proximal or distal intestine (two-way ANOVA, $p > 0.05$), but refeeding did (two-way ANOVA, $p < 0.05$), since it was significantly lower on day 8 compared to day 2. Fasted fish (day 0) and refed fish on day 5 had intermediate densities (one-way ANOVA, $p < 0.05$).

Gene expression in the liver and the proximal and distal intestine

In the liver, the diets did not significantly influence the expression of genes related to inflammation and immunity (i.e. main complement molecule C3 (*c3*); proteoglycan 4 (*prg4*) and alpha-2-macroglobulin isoform X2 (*a2m*)) and to cell protection (i.e. myo-inositol oxygenase (*miox*)) (two-way ANOVA, $p > 0.05$). However, their expression significantly decreased during refeeding (two-way ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 4). Expression of the *c3* and *prg4* genes was significantly downregulated on day 8 compared to that on day 2 and was intermediate on days 0 and 5. Expression of the acute-phase protein encoded by *a2m* was significantly upregulated in fasted fish (day 0) compared to that on day 8 and was intermediate on days 2 and 5. Expression of the *miox* gene peaked on days 0 and 5, was intermediate on day 2, and was significantly downregulated on day 8. Expression of the *por* (NADPH-cytochrome P450 reductase) and *serpina10* (protein Z-dependent protease inhibitor-like) genes, involved in cell protection and coagulation respectively, was too low in the liver to be quantified adequately (i.e. > 32 amplification cycles (Ct)).

In the proximal intestine, expression of genes related to immunity and inflammation (i.e. *c3*, interleukin-1 beta (*il1b*), interleukin-6 (*il6*), interleukin-4 (*il4*) and tumor necrosis factor alpha (*tnfa*)) was too low (Ct > 32) to be quantified adequately using RT-qPCR. In the distal intestine, the expressions levels of genes *c3*, apolipoprotein A-II (*apoa2*), *il4*, *il6* and *tnfa* were also too low (Ct > 32) to be analyzed. Interleukin *il1b* was the only gene related to inflammation that was sufficiently expressed in the distal intestine, in which its expression was related to time during refeeding (two-way ANOVA, $p < 0.001$). Compared to fasted fish, the expression of *il1b* increased after 2 days of refeeding, and then returned to the fasted level on days 5 and 8 (one-way ANOVA, $p < 0.001$). Its expression was not influenced by the diet (two-way ANOVA, $p > 0.05$), but was significantly influenced by the interaction between diet

and time due to upregulation of *il1b* on day 2 in fish fed the PAP compared to fish fed the CTL diet on day 5 (two-way-ANOVA, $p < 0.05$). Expression of the cholesterol 25-hydroxylase gene (*ch25h*), involved in anti-viral defense, was too low ($Ct > 32$) in the proximal intestine to be quantified adequately, but was significantly down regulated in the distal intestine of fish on day 5 compared to fasted fish (one-way ANOVA, $p < 0.05$). However, diet, time and their interaction had no significant effect (two-way ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 5).

Among the tight-junction proteins analyzed in the proximal and distal part of the intestine, only tight-junction protein-3 (*tjp3*) and claudin-15 (*cldn15*) were expressed (Fig. 6). In both sections of the intestine, expression of tight junction protein-1 (*tjp1*) was too low to be quantified adequately using RT-qPCR ($Ct > 32$). In the proximal intestine, *tjp3* and *cldn15* were significantly influenced by time (two-way ANOVA, $p < 0.001$) but not by the diet (two-way ANOVA, $p > 0.05$) during refeeding. Moreover, a significant interaction was observed between diet and time for *tjp3* and *cldn15*, which was related to overexpression of both genes on day 8 in fish fed the PAP diet. Over the entire experiment, time had a significant influence (one-way ANOVA, $p < 0.01$): both genes had significantly higher expression on day 8 when compared to days 0, 2 and 5 for *tjp3*, and compared to day 2 for *cldn15*. In the distal part of the intestine, *tjp3* expression did not differ during refeeding (two-way ANOVA, $p > 0.05$), but it was significantly lower in fasted fish, especially compared to refed fish on days 2 or 8 (one-way ANOVA, $p < 0.05$). Expression of *cldn15* also gradually increased from days 0 to 8, being triggered by refeeding (two-way ANOVA, $p < 0.05$). Expression of *muc2*, which encodes a protein involved in secretion of intestinal mucus, was upregulated in the proximal and distal intestine on 8 compared to those on days 0, 2 and 5 (one-way ANOVA, $p < 0.05$ and one-way ANOVA, $p < 0.01$, respectively). Expression of *muc2* was not influenced by the diets in either section of the intestine (two-way ANOVA, $p > 0.05$). Expression of the aquaporins *aqp7* and *aqp10a* was too low in both sections of the intestine to be quantified adequately ($Ct > 32$). Expression of the proliferating cell nuclear antigen (*pcna*) gene, involved in DNA replication and cell proliferation, was regulated by the diet in the proximal intestine, being lower in fish fed the PAP+YE diet than in fish fed the PAP diet (two-way ANOVA, $p < 0.05$). Its expression was also influenced by refeeding (two-way ANOVA, $p < 0.01$) and its duration (one-way ANOVA, $p < 0.001$). Fasted fish had the lowest expression of *pcna* and refeeding induced a gradual increase in *pcna* expression on days 2 and 8, with intermediated expression on day 5. In the distal intestine, time influenced *pcna* expression between fasted and refed fish (one-way ANOVA, $p < 0.01$). As in the proximal intestine, expression of *pcna* in the distal intestine was lower in fasted fish, increased significantly in refed fish on day 2 and decreased on days 5 and 8, but remained significantly higher than that in fasted fish (Fig. 6).

For genes involved in coagulation, expression of the fibrinogen beta chain (*fbg*) gene was too low ($Ct > 32$) to be quantified adequately, but that of the transcript *cd9* was significantly upregulated in the

proximal and distal intestine during refeeding (Fig. 7). In the proximal and distal intestine, *cd9* expression was low in fasted fish and increased after 8 days of refeeding (one-way ANOVA, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). However, diet did not influence its expression in either section of the intestine (two-way ANOVA, $p > 0.05$).

Expression of selenoprotein S (*selenos*) gene, involved in the endoplasmic reticulum stress response, was strongly down-regulated in fasted fish in both sections of the intestine (one-way ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 8). It increased on day 2 in refed fish and remained high in the proximal intestine until day 8, while it decreased in the distal intestine without returning to the expression level of fasted fish (two-way ANOVA, $p < 0.001$). A significant interaction between diet and time was observed in the proximal intestine, indicating strong upregulation of *selenos* expression in fish fed the CTL diet on day 5 and in fish fed the PAP diet on day 8, compared to fish fed the CTL diet on day 8 (two-way ANOVA, $p < 0.001$).

4. Discussion

We investigated the early effects of a fishmeal-free diet containing terrestrial animal by-products and yeast-extract supplementation on the structure of the intestine and the inflammatory and immune response of rainbow trout. To avoid potential residual effects of the commercial feed used before and during acclimation, the fish first fasted for four days to empty their digestive tracts. Early responses to the diets were evaluated by quantifying plasma markers of innate immunity and performing histological analysis of the intestinal mucosa. We also investigated the early influence of refeeding on the hepatic and intestinal expression of genes involved in immunity, inflammation, intestinal structure, coagulation and stress response, some of which had been found in a previous study to be significantly influenced by the same diets after 12 weeks of feeding ⁽²⁵⁾.

Feeding diets that contain processed animal proteins and no fishmeal decrease growth performance, but this can be counteracted by adding yeast extract ⁽²⁵⁾. In the long term, it has been shown that these growth performances are accompanied by changes in the transcriptomic profiles of the liver and especially the intestine. The modulated genes were related mainly to the innate immune response, inflammation, coagulation and the response to cellular or pathogenic stress. As previously observed after 12 weeks of feeding ⁽²⁵⁾, the diets did not induce signs of systemic or intestinal inflammation in juvenile rainbow trout. The genes whose expression was modified in the long term were not differentially expressed in the short term, suggesting that the long-term effects were chronic rather than acute, which is the opposite of observations of more sensitive salmonid species, such as Atlantic

salmon. The early symptoms of diet-related inflammation in Atlantic salmon are accompanied by an immune response, shriveling of the intestinal villi, increase mucus production by goblet cells and transcriptomic changes⁽¹⁵⁾. Regardless of the diet fed during refeeding, we observed no significant effect on plasma immune markers or the structure of the intestinal mucosa. Of the parameters studied, only two intestinal genes were significantly modulated by the diet: *pcna* and *cldn15*. Over the eight days of refeeding, *pcna* was upregulated in the distal intestine of fish fed the PAP diet, which could indicate an early compensatory effect. Overall, the results suggest that the diets did not cause inflammation, even moderate. Early benefits of including a yeast extract in the diet have been described for common carp (*Cyprinus carpio*)⁽³⁴⁾ and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)⁽³⁵⁾, but we were not able to demonstrate that doing so had an early influence on the immune response or intestinal structure of rainbow trout. Only the expression of *cldn15* was upregulated in the proximal intestine in response to yeast-extract supplementation, suggesting that it can stimulate intestinal cell adhesion after dietary stress and modulate tissue permeability by preventing the entry of pathogens or toxic molecules⁽³⁶⁾.

Nonetheless, short-term fasting seemed to induce major changes in the structure of the digestive tract and modulate the physiology of the liver and intestine. Intestinal mucosa and the liver are key organs for metabolism, detoxification and maintenance of homeostasis and play a major role in immunity and protective functions. Although fish can survive fasting for a long period, it soon causes structural changes, induces the response of immune mediators and modulates transcriptomic responses^(37–42). During fasting, structural changes include atrophy of the digestive tract and a decrease in the length of the gut, followed by intestinal weight loss and a decrease in the surface area of the intestinal mucosa. A decrease in gut length and mass has been observed in neon damselfish (*Pomacentrus coelestis*) subjected to 16 days of fasting, in javelin goby (*Synechogobius hasta*) on day 7 of fasting^(43, 44), and in common carp (*Cyprinus carpi*) subjected to 6 months of starvation⁽⁴⁵⁾. As shown for traíra (*Hoplias malabaricus*), a decrease in gut length can also be accompanied by a decrease in the height of intestinal mucosa and the surface area of villi⁽⁴⁶⁾. In the present study, short-term fasting had no significant influence on intestinal villi height in the proximal or distal intestine, suggesting that it did not influence mucosa thickness greatly. However, feeding trout after 4 days of fasting significantly increased villi surface area in the proximal intestine on day 8, which indicates a strong relation between refeeding and absorptive capacity. This increase in villi surface area is consistent with upregulation of *pcna*, which has been observed in the intestine of frogs (*Xenopus laevis*) refed after fasting⁽⁴⁷⁾. Although this effect was not observed in the distal intestine, our results are consistent with previous observations for salmonids. For short- or medium-term fasting, the gut responds rapidly to fasting, and the effects seem to be reversible upon refeeding, as described for rainbow trout and Atlantic salmon^(48, 49).

Genes *tjp3* and *cldn15*, which are involved in enterocytes adhesion and intestinal permeability, were downregulated in the trout during fasting and the first five days of refeeding, and then up-regulated after eight days of refeeding, which confirms the influence of short-term fasting on gut structure. The response of tight junction proteins differed between the sections of the intestine: the distal section seemed to respond more quickly to refeeding, which indicates its higher sensitivity to nutritional status of the fish⁽⁵⁰⁾. Like tight junction proteins, goblet cells play an important role in maintaining intestinal homeostasis since they produce intestinal mucus and are present throughout the digestive tract. As a lubricant, mucus facilitates passage of feed nutrients through the digestive tract and protects the intestinal mucosa. During fasting, the number of goblet cells in the intestinal mucosa of teleost fish, such as northern pike (*Esox lucius*) and southern catfish (*Silurus meridionalis*), can decrease significantly to redirect energy to other physiological functions^(51–53). Although fasting did not influence the density of goblet cells in the proximal intestine of rainbow trout, two days of refeeding increased it, likely in response to the reactivation by feed in the digestive tract. Conversely, the observed modulation of expression of *muc2* (i.e. low in fasted fish but higher in both sections of the intestine after eight days of refeeding) supports the observations for northern pike and southern catfish. Regarding the phenotype highlighted for intestinal villi surface area and goblet cell density, short-term fasting appeared to influence the proximal intestine more than the distal intestine and refeeding influences goblet cell density and villi surface area significantly.

No significant changes were observed in the activities of the plasma alternative complement pathway, lysozyme, antiprotease or peroxidase. In fish, fasting influences plasma immune markers within the first few days of fasting, and its influence is likely to increase if fasting lasts more than two weeks. The complement pathway, part of innate immunity, groups proteins involved in pathogen lysis and elimination. In fish, its plasma activity can be influenced by short- or long-term fasting. For example, tinfoil barb (*Barbonymus schwanenfeldii*) and crucian carp (*Carassius auratus*), exposed to short- (two weeks) and long-term fasting (60 days), respectively, showed a significant decrease in plasma alternative complement activity. Thus, nutrient deprivation could cause the innate immune system to fail, which could decrease the ability to fight pathogens, but this was not observed in rainbow trout, likely due to the short fasting period^(54, 55). Lysozyme, also part of innate immunity, protects against bacterial infections when released by phagocytes. In the present study, the short fasting period did not seem to influence plasma lysozyme activity in rainbow trout, as it was similar for fasted and refeed fish. This agrees with the literature, which indicates that the influence of fasting on plasma lysozyme activity depends greatly on the species studied, its physiological status and the duration of fasting⁽⁵⁶⁾. For tinfoil barb, Eslamloo et al.⁽⁵⁴⁾ showed that one week of fasting was sufficient to induce an increase in lysozyme activity, which then decreased sharply after two weeks of fasting. In Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), 43

days of fasting clearly induced lysozyme activity ⁽⁵⁷⁾, while prolonged fasting did not influence it in European sea bass, red seabream (*Pagellus bogaraveo*) or European eel (*Anguilla anguilla*) ⁽⁵⁸⁾. Peroxidase is an antioxidant enzyme involved in eliminating reactive oxygen species released during oxidative stresses that are induced, for example, in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) by fasting ⁽⁵⁹⁾. Several studies of fish show that plasma peroxidase can be induced soon after fasting begins. For example, plasma peroxidase activity in binni (*Mesopotamichthys sharpeyi*) fingerlings was strongly induced on day 8 of fasting ⁽⁶⁰⁾, and gilthead seabream (*Saprus aurata*) had the highest peroxidase activity after 7 days of fasting ⁽⁶¹⁾. However, some studies have shown that if fasting exceeds several weeks, peroxidase activity may sharply decrease due to fatigue of the antioxidant system ^(54, 62). In the present study, peroxidase activity was similar for fasted and refed fish, suggesting that the four days of fasting may have been too short to increase peroxidase activity in rainbow trout. Plasma antiproteases protect against pathogens by inhibiting the released proteases. Little is known about the influence of fasting on antiprotease activity, and existing studies focus mainly on tissues other than blood or analyze antiprotease activity after a bacterial challenge ^(54, 63, 64). However, in a study of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fasted for 21 days, plasma antiprotease activity significantly increased but then decreased during refeeding. Rather than being immune-related, these effects were due to inhibiting proteases that degrade dietary proteins and thus prevent them from being digested and assimilated during prolonged fasting ⁽⁶⁵⁾. Overall, our results suggest that the fasting period was too short to induce a systemic immune response or protein catabolism in rainbow trout.

Although we did not observe systemic or histological inflammation in response to the four-day fast, the expression of certain genes related to immunity, inflammation and cell protection in the liver and intestine differed between fasted and refed fish. In agreement with observations on red porgy (*Pagrus pagrus*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) ^(66–68), expression of the complement *c3* gene in rainbow trout was higher after two days of refeeding, although it was not significantly lower in fasted fish, perhaps because the fasting period was shorter than those in previous studies. The protein encoded by the *a2m* gene was upregulated in trout subjected to a four-day fast, suggesting early regulation of acute phase protein homeostasis after short-term fasting. The opposite was observed in red porgy and Japanese grenadier anchovy, but these fish were subjected to a longer fast, suggesting that prolonged fasting may decrease the activity of this acute phase protein in fish ^(66, 68). Expression of *prg4*, which encodes a proteoglycan stimulating macrophages during inflammation ⁽⁶⁹⁾, decreased during refeeding but did not necessarily differ from that of fasted trout. To our knowledge, no study has described the influence of fasting on *prg4* expression in the liver of fish. However, the results obtained for rainbow trout suggest that nutrients must be present to maintain sufficient immune function.

In the intestine, most genes related to the immune and inflammatory responses were not expressed, or their expression was too low to be quantified adequately. Although *ch25h* has been implicated in inflammatory and viral pathologies^(70, 71), its high expression in the distal intestine of fasted fish was not sufficient to indicate that it is related to the immune or inflammatory response in the intestine, since the trout had no clear sign of inflammation caused by fasting. However, *il1β* expression strongly but temporarily increased in response to refeeding. Response related to inflammation in the gut seem to occur more frequently when long-term fasting exceeds several weeks^(72–75).

Although we could not quantify all genes related to coagulation in the liver and intestine due to low expression, the response of the *cd9* gene in the intestine suggests that fasting decreases wound healing and clotting capacities and that refeeding tends to restore these functions, which agrees with previous studies. Fasting impairs hemostasis and clotting, which may be restored upon refeeding, as observe for traíra⁽⁷⁶⁾ and for rainbow trout, in which all transcripts that encoded for proteins involved in blood coagulation were downregulated in the liver during fasting⁽⁷⁷⁾.

The *miox* gene, which encodes myo-inositol oxygenase, was upregulated in the liver of fasted rainbow trout compared to fish refed on day 8. In Nile tilapia, myo-inositol is used as an osmolyte to protect cells and maintain normal cytoplasmic osmolarity under hypertonic conditions^(78, 79). In plants, specifically thale cress (*Arabidopsis thaliana*), *miox* is upregulated under low nutrients conditions⁽⁸⁰⁾. Since fasting can stress cells and impair osmolarity of rainbow trout⁽⁷⁷⁾, its upregulation in the liver of fasted fish seems consistent with its protective function. Moreover, its downregulation after eight days refeeding seems to be related to a return to normal osmolarity after refeeding and the presence of nutrients in the gut. In the intestine, especially in the distal section, *selenos* expression, a gene encoding a protein involved in protein folding in the endoplasmic reticulum and in glucose metabolism, was also strongly influenced by the transition from fasting to refeeding. These results agree with those of previous studies and suggest that *selenos* is regulated by glucose deprivation, and that fasting is likely to cause endoplasmic reticulum stress, and consequently a failure of protein folding^(81–83).

In conclusion, we were unable to demonstrate early benefits or repercussions associated with feeding rainbow trout a diet that contained animal by-products but no fishmeal on their immune response and gut structure, whether the diet was supplemented with yeast extract or not. Thus, the decrease in growth performances associated with the PAP diet, the improvement of this diet with the addition of yeast extract and the changes in the hepatic and intestinal transcriptomic profile were not related to an early reaction of the fish, but to a long-term adaptation⁽²⁵⁾. Conversely, short-term fasting seems to have much more influence on the physiology of the liver and intestine. Four days of fasting followed by refeeding significantly increased the intestinal surface and modulated the expression of

genes involved in inflammation and immunity, the pathogen response and cellular stress in liver and intestine, with no clear evidence of systemic or tissue inflammation. This difference may be associated with the relatively short duration that rainbow trout were fasted. However, these findings are consistent with the current use of fasting periods on fish farms to increase survival, maintain growth and improve the immune defenses of fish in stressful or epizootic situations ^(84, 85).

5. Acknowledgement

We dedicate this study to Frank Sandres, who cared for the fish during this study and sadly passed away. We are also grateful to the research unit ToxAlim (INRAE, Toulouse, France) for providing their knowledge and lending us the equipment used to perform histology in this study.

6. References

1. Tacon AGJ, Metian M. Fishing for Aquaculture: Non-Food Use of Small Pelagic Forage Fish—A Global Perspective. *Reviews in Fisheries Science* **17**: 305–317, 2009. doi: 10.1080/10641260802677074.
2. Bandara T. Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES* **6**: 3087, 2018.
3. Aas TS, Ytrestøyl T, Åsgård T. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports* **15**: 100216, 2019. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100216.
4. Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerré D, Geurden I, Médale F, Kaushik S, Corraze G. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* **294**: 123–131, 2009. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.05.013.
5. Bureau DP, Harris AM, Young Cho C. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **161**: 27–43, 1998. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00254-8.
6. Li Y, Ai Q, Mai K, Xu W, Deng J, Cheng Z. Comparison of high-protein soybean meal and commercial soybean meal partly replacing fish meal on the activities of digestive enzymes and aminotransferases in juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828). *Aquaculture Research* **45**: 1051–1060, 2014. doi: 10.1111/are.12042.
7. Gatlin III DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl Å, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, J Souza E, Stone D, Wilson R, Wurtele E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* **38**: 551–579, 2007. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x.
8. Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **199**: 197–227, 2001. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00526-9.

9. 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* **10**: e0117609, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0117609.
10. Krogdahl Å, 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* **41**: 333–344, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x.
11. Galkanda-Arachchige HSC, Wilson AE, Davis DA. Success of fishmeal replacement through poultry by-product meal in aquaculture feed formulations: a meta-analysis. *Rev Aquacult* **12**: 1624–1636, 2020. doi: 10.1111/raq.12401.
12. Vohra A, Syal P, Madan A. Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology* **219**: 31–47, 2016. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.05.019.
13. Gatesoupe FJ. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* **267**: 20–30, 2007. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.005.
14. Agboola JO, Øverland M, Skrede A, Hansen JØ. Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. *Reviews in Aquaculture* **13**: 949–970, 2021. doi: 10.1111/raq.12507.
15. Sahlmann C, Sutherland BJG, 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* **34**: 599–609, 2013. doi: 10.1016/j.fsi.2012.11.031.
16. Jena AK, Biswas P, Saha H. ADVANCED FARMING SYSTEMS IN AQUACULTURE: STRATEGIES TO ENHANCE THE PRODUCTION. *Innovative Farming*, 2455-6521 2: 84–89, 2017.
17. Dobson SH, Holmes RM. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* **25**: 649–656, 1984. doi: 10.1111/j.1095-8649.1984.tb04911.x.
18. Cho SH. Compensatory Growth of Juvenile Flounder *Paralichthys olivaceus* L. and Changes in Biochemical Composition and Body Condition Indices during Starvation and after Refeeding in Winter Season. *Journal of the World Aquaculture Society* **36**: 508–514, 2005. doi: 10.1111/j.1749-7345.2005.tb00398.x.
19. Navarro I, Gutiérrez J. Chapter 17 Fasting and starvation. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, edited by Hochachka PW, Mommsen TP. *Elsevier*, p. 393–434.
20. Bar N. Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. *Can J Fish Aquat Sci* **71**: 1447–1458, 2014. doi: 10.1139/cjfas-2013-0175.
21. Xia JH, Lin G, Fu GH, Wan ZY, Lee M, Wang L, Liu XJ, Yue GH. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics* **15**: 266, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-266.
22. Black D, Skinner ER. Features of the lipid transport system of fish as demonstrated by studies on starvation in the rainbow trout. *J Comp Physiol B* **156**: 497–502, 1986. doi: 10.1007/BF00691035.
23. Krogdahl Å, Marie Bakke-McKellep A. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **141**: 450–460, 2005. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.06.002.
24. Martin SAM, Cash P, Blaney S, Houlihan DF. Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**: 259–270, 2001. doi: 10.1023/A:1014015530045.

25. Frohn L, Peixoto D, Guyomar C, Teixeira C, Terrier F, Aguirre P, Haddad SM, Bobe J, Costas B, Richard N, Pinel K, Skiba-Cassy S. Yeast extract improves growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fishmeal-free diet and modulates the hepatic and distal intestine transcriptomic profile. *bioRxiv*: 2023.02.23.529675, 2023.
26. IE Numea. *Fish nutrition and aquaculture*.
27. Council NR. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*.
28. Peixoto D, Machado M, Azeredo R, Costas B. Chronic Inflammation Modulates Opioid Receptor Gene Expression and Triggers Respiratory Burst in a Teleost Model. *Biology* **11**: 764, 2022. doi: 10.3390/biology11050764.
29. Feldman AT, Wolfe D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In: *Histopathology: Methods and Protocols*, edited by Day CE. *Springer*, p. 31–43.
30. Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* **32**: 3532–3534, 2016. doi: 10.1093/bioinformatics/btw413.
31. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. In: *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018*, edited by Frangi AF, Schnabel JA, Davatzikos C, Alberola-López C, Fichtinger G. *Springer International Publishing*, p. 265–273.
32. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682, 2012. doi: 10.1038/nmeth.2019.
33. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45, 2001. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
34. Sakai M, Taniguchi K, Mamoto K, Ogawa H, Tabata M. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* **24**: 433–438, 2001. doi: 10.1046/j.1365-2761.2001.00314.x.
35. Bagni M, Romano N, Finioia MG, Abelli L, Scapigliati G, Tiscar PG, Sarti M, Marino G. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* **18**: 311–325, 2005. doi: 10.1016/j.fsi.2004.08.003.
36. Zhang H, Ran C, Teame T, Ding Q, Hoseinifar SH, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Olsen RE, Gatlin DM, Ringø E, Duan M, Zhou Z. Research progress on gut health of farmed teleost fish: a viewpoint concerning the intestinal mucosal barrier and the impact of its damage. *Rev Fish Biol Fisheries* **30**: 569–586, 2020. doi: 10.1007/s11160-020-09614-y.
37. Bar N, Volkoff H. Adaptation of the Physiological, Endocrine, and Digestive System Functions to Prolonged Food Deprivation in Fish. In: *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*, edited by McCue MD. *Springer*, p. 69–89.
38. Secombes CJ, Wang T, Bird S. The interleukins of fish. *Developmental & Comparative Immunology* **35**: 1336–1345, 2011. doi: 10.1016/j.dci.2011.05.001.
39. Mohapatra S, Chakraborty T, Shimizu S, Urasaki S, Matsubara T, Nagahama Y, Ohta K. Starvation beneficially influences the liver physiology and nutrient metabolism in *Edwardsiella tarda* infected red sea bream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **189**: 1–10, 2015. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.07.003.

40. Enyu Y-L, Shu-Chien A c. Proteomics analysis of mitochondrial extract from liver of female zebrafish undergoing starvation and refeeding. *Aquaculture Nutrition* **17**: e413–e423, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00776.x.
41. Song H, Xu D, Tian L, Chen R, Wang L, Tan P, You Q. Overwinter mortality in yellow drum (*Nibea albiflora*): Insights from growth and immune responses to cold and starvation stress. *Fish & Shellfish Immunology* **92**: 341–347, 2019. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.030.
42. Waagbø R, Jørgensen SM, Timmerhaus G, Breck O, Olsvik PA. Short-term starvation at low temperature prior to harvest does not impact the health and acute stress response of adult Atlantic salmon. *PeerJ* **5**: e3273, 2017. doi: 10.7717/peerj.3273.
43. Hall KC, Bellwood DR. Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. *Journal of Fish Biology* **47**: 438–454, 1995. doi: 10.1111/j.1095-8649.1995.tb01913.x.
44. Zhou R, Wu G, Qu L, Zhong X, Gao Y, Ding Z, Xu J, Chen X, Cheng H. Effect of starvation on intestinal morphology, digestive enzyme activity and expression of lipid metabolism-related genes in javelin goby (*Synechogobius hasta*). *Aquaculture Research* **53**: 87–97, 2022. doi: 10.1111/are.15555.
45. Gas N, Noaillac-Depeyre J. Studies on intestinal epithelium involution during prolonged fasting. *Journal of Ultrastructure Research* **56**: 137–151, 1976. doi: 10.1016/S0022-5320(76)80161-X.
46. Rios FS, Kalinin AL, Fernandes MN, Rantin FT. Changes in gut gross morphology of traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after refeeding. *Braz J Biol* **64**: 683–689, 2004. doi: 10.1590/S1519-69842004000400017.
47. Tamaoki K, Okada R, Ishihara A, Shiojiri N, Mochizuki K, Goda T, Yamauchi K. Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. *Cell Biosci* **6**: 2, 2016. doi: 10.1186/s13578-016-0067-9.
48. Krogdahl Å, Marie Bakke-McKellep A. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **141**: 450–460, 2005. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.06.002.
49. Weatherley AH, Gill HS. Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* **18**: 195–208, 1981. doi: 10.1111/j.1095-8649.1981.tb02814.x.
50. van den Ingh TSGAM, Krogdahl Å, Olli JJ, Hendriks HGCJM, Koninkx JGJF. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture* **94**: 297–305, 1991. doi: 10.1016/0044-8486(91)90174-6.
51. Bucke D. The anatomy and histology of the alimentary tract of the carnivorous fish the pike *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology* **3**: 421–431, 1971. doi: 10.1111/j.1095-8649.1971.tb05914.x.
52. Khojasteh SM. The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review. *International Journal of Aquatic Science* **3**, 2012.
53. Zeng L-Q, Li F-J, Li X-M, Cao Z-D, Fu S-J, Zhang Y-G. The effects of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **162**: 200–211, 2012. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.02.022.

54. Eslamloo K, Morshedi V, Azodi M, Akhavan SR. Effect of starvation on some immunological and biochemical parameters in tinfoil barb (*Barbonymus schwanenfeldii*). *Journal of Applied Animal Research* **45**: 173–178, 2017. doi: 10.1080/09712119.2015.1124329.
55. Li T, Qi M, Gatesoupe F-J, Tian D, Jin W, Li J, Lin Q, Wu S, Li H. Adaptation to Fasting in Crucian Carp (*Carassius auratus*): Gut Microbiota and Its Correlative Relationship with Immune Function. *Microb Ecol* **78**: 6–19, 2019. doi: 10.1007/s00248-018-1275-0.
56. Bowden TJ. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunology* **25**: 373–383, 2008. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.017.
57. Feng G, Shi X, Huang X, Zhuang P. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses after Long-term Fasting in Blood of Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Procedia Environmental Sciences* **8**: 469–475, 2011. doi: 10.1016/j.proenv.2011.10.074.
58. Caruso G, Maricchiolo G, Micale V, Genovese L, Caruso R, Denaro MG. Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. *Fish Physiol Biochem* **36**: 71–83, 2010. doi: 10.1007/s10695-008-9290-6.
59. Bu T, Xu L, Zhu X, Cheng J, Li Y, Liu L, Bao L, Chu W. Influence of short-term fasting on oxidative stress, antioxidant-related signaling molecules and autophagy in the intestine of adult *Siniperca chuatsi*. *Aquaculture Reports* **21**: 100933, 2021. doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100933.
60. Najafi A, Salati AP, Yavari V, Asadi F. Effects of short-term starvation and re-feeding on antioxidant defense status in *Mesopotamichthys sharpeyi* (Günther, 1874) fingerlings. *International Journal of Aquatic Biology* **2**, 2014. doi: 10.22034/ijab.v2i5.136.
61. Pascual P, Pedrajas JR, Toribio F, López-Barea J, Peinado J. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions* **145**: 191–199, 2003. doi: 10.1016/S0009-2797(03)00002-4.
62. Morales AE, Pérez-Jiménez A, Carmen Hidalgo M, Abellán E, Cardenete G. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **139**: 153–161, 2004. doi: 10.1016/j.cca.2004.10.008.
63. Irunbam S, Devi W, Monsang SJ, Kamilya D. Effect of feed deprivation on immune-haematological responses and resistance of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Indian Journal of Animal Health* **60**: 193–200, 2021. doi: 10.36062/ijah.2021.spl.02721.
64. Esteban MÁ, Espinosa-Ruíz C, Albaladejo-Riad N. Feed Deprivation effects on Bactericidal and Immunological activity of Blood and skin mucus, and on blood Chemistry of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). 2, 2020. doi:10.5281/zenodo.3906149.
65. Sakyi ME, Cai J, Tang J, Xia L, Li P, Abarike ED, Kuebutornye FKA, Jian J. Short term starvation and re-feeding in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758): Growth measurements, and immune responses. *Aquaculture Reports* **16**: 100261, 2020. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100261.
66. Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Genovese L, Mancari F, Maricchiolo G. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. *Marine Environmental Research* **81**: 18–25, 2012. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.07.003.
67. Martin SA, Douglas A, Houlihan DF, Secombes CJ. Starvation alters the liver transcriptome of the innate immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* **11**: 418, 2010. doi: 10.1186/1471-2164-11-418.

68. Wang M, Xu G, Tang Y, Su S, Wang Y, Zhu Z. Investigation of the Molecular Mechanisms of Antioxidant Damage and Immune Response Downregulation in Liver of *Coilia nasus* Under Starvation Stress [Online]. *Frontiers in Endocrinology* **12**, 2021. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.622315> [23 Feb. 2023].
69. Krawetz RJ, Abubacker S, Leonard C, Masson AO, Shah S, Narendran N, Tailor P, Regmi SC, Labit E, Ninkovic N, Corpuz JM, Ito K, Underhill TM, Salo PT, Schmidt TA, Biernaskie JA. Proteoglycan 4 (PRG4) treatment enhances wound closure and tissue regeneration. *npj Regen Med* **7**: 1–18, 2022. doi: 10.1038/s41536-022-00228-5.
70. Liu S-Y, Aliyari R, Chikere K, Li G, Marsden MD, Smith JK, Pernet O, Guo H, Nusbaum R, Zack JA, Freiberg AN, Su L, Lee B, Cheng G. Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* **38**: 92–105, 2013. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.005.
71. Lathe R, Saponova A, Kotelevtsev Y. Atherosclerosis and Alzheimer - diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature. *BMC Geriatrics* **14**: 36, 2014. doi: 10.1186/1471-2318-14-36.
72. Jawahar J, McCumber AW, Lickwar CR, Amoroso CR, de la Torre Canny SG, Wong S, Morash M, Thierer JH, Farber SA, Bohannan BJM, Guillemin K, Rawls JF. Starvation causes changes in the intestinal transcriptome and microbiome that are reversed upon refeeding. *BMC Genomics* **23**: 225, 2022. doi: 10.1186/s12864-022-08447-2.
73. Foyosal MJ, Fotedar R, Tay ACY, Gupta SK. Effects of long-term starvation on health indices, gut microbiota and innate immune response of fresh water crayfish, marron (*Cherax cainii*, Austin 2002). *Aquaculture* **514**: 734444, 2020. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734444.
74. Tran NT, Xiong F, Hao Y-T, Zhang J, Wu S-G, Wang G-T. Starvation influences the microbiota assembly and expression of immunity-related genes in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* **489**: 121–129, 2018. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.016.
75. Zhao Z, Zhang X, Zhao F, Zhou Z, Zhao F, Wang J, Liu T, Yang X, Zhang X, Li Z. Stress responses of the intestinal digestion, antioxidant status, microbiota and non-specific immunity in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) under starvation. *Fish & Shellfish Immunology* **120**: 411–420, 2022. doi: 10.1016/j.fsi.2021.12.008.
76. Rios FS, Oba ET, Fernandes MN, Kalinin AL, Rantin FT. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **140**: 281–287, 2005. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.12.006.
77. Salem M, Silverstein J, Rexroad CE, Yao J. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* **8**: 328, 2007. doi: 10.1186/1471-2164-8-328.
78. Foroutan B, Pongtippatee P, Kerdmusic C, Sirimanapong W, Vanichviriyakit R, Withyachumnarnkul B. Myo-inositol supplement helps the performance of seawater-acclimated Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture and Fisheries*, 2022. doi: 10.1016/j.aaf.2022.09.002.
79. Pan J, Chen L, Ji Y, Huang Y, Bu X, Zhu J, Li E, Qin J, Wang X. A crucial role in osmoregulation against hyperosmotic stress: Carbohydrate and inositol metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports* **28**: 101433, 2023. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101433.
80. Alford S, Rangarajan P, Williams S, Gillaspay G. Myo-inositol oxygenase is required for responses to low energy conditions in *Arabidopsis thaliana* [Online]. *Frontiers in Plant Science* **3**, 2012. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2012.00069> [14 Feb. 2023].

- 81.** Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress – SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Letters* **563**: 185–190, 2004. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00296-0.
- 82.** Kondo H, Sano H, Wang Y, Kawase J, Shimanoki E, Jirapongpaioj W, Nozaki R, Hirono I. Starvation–refeeding causes cellular stress responses in the gut and liver of Masu salmon *Oncorhynchus masou masou*. *Fish Sci* **86**: 1037–1042, 2020. doi: 10.1007/s12562-020-01464-8.
- 83.** Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **569**: 29–63, 2005. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.
- 84.** Pirhonen J, Schreck CB, Reno PW, Ögüt H. Effect of fasting on feed intake, growth and mortality of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, during an induced *Aeromonas salmonicida* epizootic. *Aquaculture* **216**: 31–38, 2003. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00435-0.
- 85.** Hvas M, Nilsson J, Vågseth T, Nola V, Fjelldal PG, Hansen TJ, Oppedal F, Stien LH, Folkedal O. Full compensatory growth before harvest and no impact on fish welfare in Atlantic salmon after an 8-week fasting period. *Aquaculture* **546**: 737415, 2022. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737415.

Table 1. Ingredients and proximate composition of three experimental diets: commercial-like feed (CTL), processed animal protein feed (PAP) and PAP with 3% yeast extract (PAP+YE).

	CTL	PAP	PAP+YE
<i>Ingredient (%)</i>			
Corn gluten	15.0	17.9	16.0
Soy protein concentrate	14.0	11.0	12.0
Soybean meal	12.0	10.5	8.3
Faba bean	8.0	12.0	8.0
Whole wheat	10.8	9.2	13.0
Fishmeal	19.0	-	-
Dehydrated poultry protein	-	10.0	10.0
Hydrolyzed feather meal	-	6.0	6.0
Poultry and pig blood meal	-	1.0	1.0
Rapeseed oil	12.2	10.5	10.5
Fish oil	7.0	7.9	7.9
Yeast extract ¹	-	-	3.0
L-lysine	-	0.3	0.5
L-methionine	-	0.3	0.3
Soy lecithin	-	0.5	0.4
Vitamin premix ²	1.0	1.0	1.0
Dicalcium phosphate	-	1.0	1.0
Mineral premix ³	1.0	1.0	1.0
<i>Proximate composition⁴</i>			
Dry matter (DM) (%)	97.1	97.4	97.2
Protein (%DM)	46.9	46.5	46.3
Lipid (%DM)	22.1	21.6	20.8
Energy (%DM)	25.0	25.1	24.9
Ash (%DM)	6.8	5.5	5.6
Starch (%DM)	12.1	13.5	14.2

¹Cytosolic fraction of *Saccharomyces cerevisiae* (Prosaf®, Phileo by Lesaffre, Marcq-en-Barœul, France)

²Provided per 100 g of premix: vitamin A 500 000 IU, vitamin D3 250 000 IU, vitamin E 5 00 mg, vitamin C 1 429 mg, vitamin B1 10 mg, vitamin B2 50 mg, vitamin B3 100 mg, vitamin B5 200 mg, vitamin B6 30 mg, vitamin B7 3 000 mg, vitamin B8 100 mg, vitamin B9 10 mg, vitamin B12, 100 mg, vitamin K3 200 mg, folic acid 10 mg, biotin 100 mg, choline chloride 16 700 mg, and cellulose 76 921mg.

³Provided per 100 g of premix: calcium hydrogen phosphate 49 478 mg, calcium carbonate 21 500 mg, sodium chloride 4 000 mg, potassium chloride 9 000 mg, magnesium oxide 12 400 mg, iron sulfate 2 000 mg, zinc sulfate 900 mg, manganese sulfate 300 mg, copper sulfate 300 mg, cobalt chloride 2 mg, potassium iodide 15 mg, sodium selenite 5 mg and sodium fluoride 100 mg.

⁴Analyzed values

Table 2. Primer sequences for RT-qPCR analysis of the liver, and proximal and distal intestine.

Gene, by category	NCBI Accession Number	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (3' - 5')	Liver	Proximal Intestine	Distal intestine
Immunity and inflammation						
<i>c3</i>	XM_021561577.2	TGTCACTTCGCCATACACCA	TTTGCAAACCGTTGGCCC	x	x	x
<i>prg4</i>	XM_036968497.1	GGCATAGAAGAGCCAGAACCA	AATGGCATAGGCTGGTCGTC	x		
<i>α2m</i>	XM_021587033.2	GAGACTGTCCCAAAGGGCTC	CTGCCAACTTCAAGGTGACTTC	x		
<i>il1β</i>	XM_021590496.2; AJ557021.2	CCCTGCCAGTTGTCTTAGGG	GTCCTTACAGCGCTCCAACT		x	x
<i>il6</i>	NM_001124657.1	CTATCTCTCACTCCTCTCGGC	CTCCACGGGCTTCTGAAAC		x	x
<i>il4</i>	FN820500.1	GACAATCTTGGCTCCGTGA	CCACCTGGTCTTGGCTCTTC		x	x
<i>tnfa</i>	AJ278085.1; NM_001124357.1	TGCAAAGCAGCCATCCATT	AACGAAGAAGAGCCCAGTGT		x	x
Structure						
<i>tjp1a</i>	XM_036980662.1	TCAGCTGCGCTATGATGAGG	GGTCGTAACGTAGAGGAGCG		x	x
<i>tjp3</i>	XM_031822609.1	GGGACACAGCCGTGATAGTT	TGACACGCCATTGACCATGA		x	x
<i>muc2</i>	XM_036968565.1; XM_036968563.1	GACCCTGAAGGAGTTCCACG	GTTTGAGACAGACCTTGGGT		x	x
<i>cldn15</i>	XM_036987534.1; XM_021615039.2	TCTACATTGGCTGGTGCTCG	GTCCTGGCCGTAGGAAGTG		x	x
<i>aqp7</i>	XM_021568669.2	TGAACGTGTTGAGTGGGAC	AAGGTACTCTCCGAACGCAC		x	x
<i>aqp10a</i>	XM_021621544.2	CGATGTCGTCCAATTGCGG	CAGGTGCCATGCGATGAAGA		x	x
Coagulation						
<i>serpina10</i>	XM_036954825.1; XM_036954823.1	TCGCACTTTGTCTCCCCAAA	GCTAGGTTGAGCCCCTCAG	x		
<i>fbg</i>	XR_005053092.1; XM_036987044.1	CTGGGTAACGACCGCATCAG	GGCTGTTCTGAATACCCATC		x	x
<i>cd9</i>	NM_001124324.1	TTCCTGCGTGTAGCGTTGA	AACCCGAACATCGCAAACC		x	x

Cell protection					
<i>por</i>	XM_021623734.2	GTGGTCGCACAATAATGACGTAG	ATGGGGCCACTCACTGTCTG	x	
<i>miox</i>	XM_021572362.2	CAAGCTGATGCACACCAACC	TCCAGCGATATGACGGCTTC	x	
<i>Cell proliferation</i>					
<i>pcna</i>	XM_036936092.1	ATCCTGAAGTGTGCTGGGAA	TCCCAACTGTTCTACATCGAGA		x x
Antiviral					
<i>ch25h</i>	XM_021564786.2	GGGCTTCTCTCGTCGGTT	GTCCTCCACAGAAAGCCAGA		x x
Endoplasmic reticulum stress					
<i>selenos</i>	XM_036963928.1; XM_036981274.1	ACTGAAGAGGCCAGCACATC	ACAGGATCCACCTCCCTCTC		x x

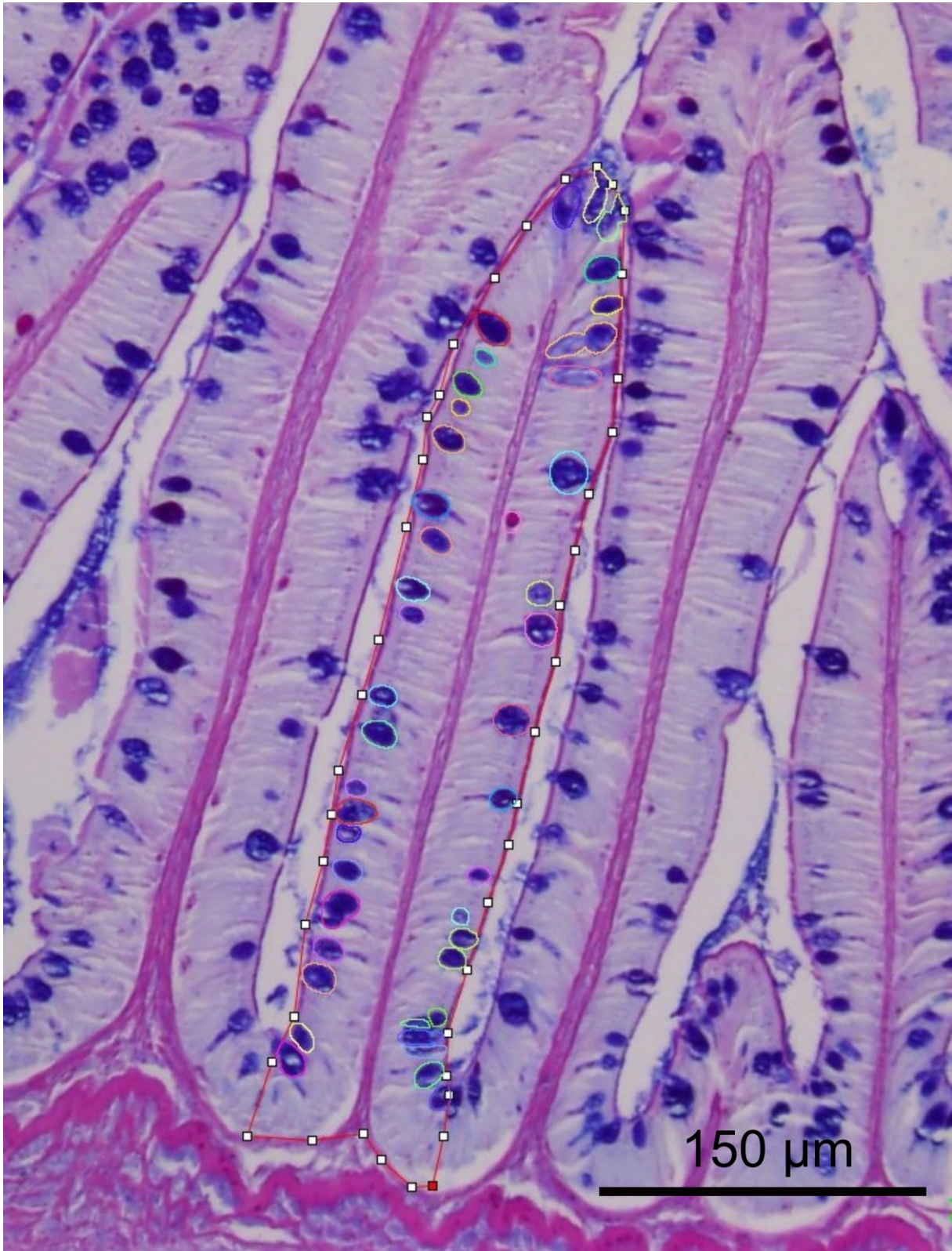


Figure 1. Example of manual delineation of a villus (red line) and detection of goblet cells (circles) using FIJI software.

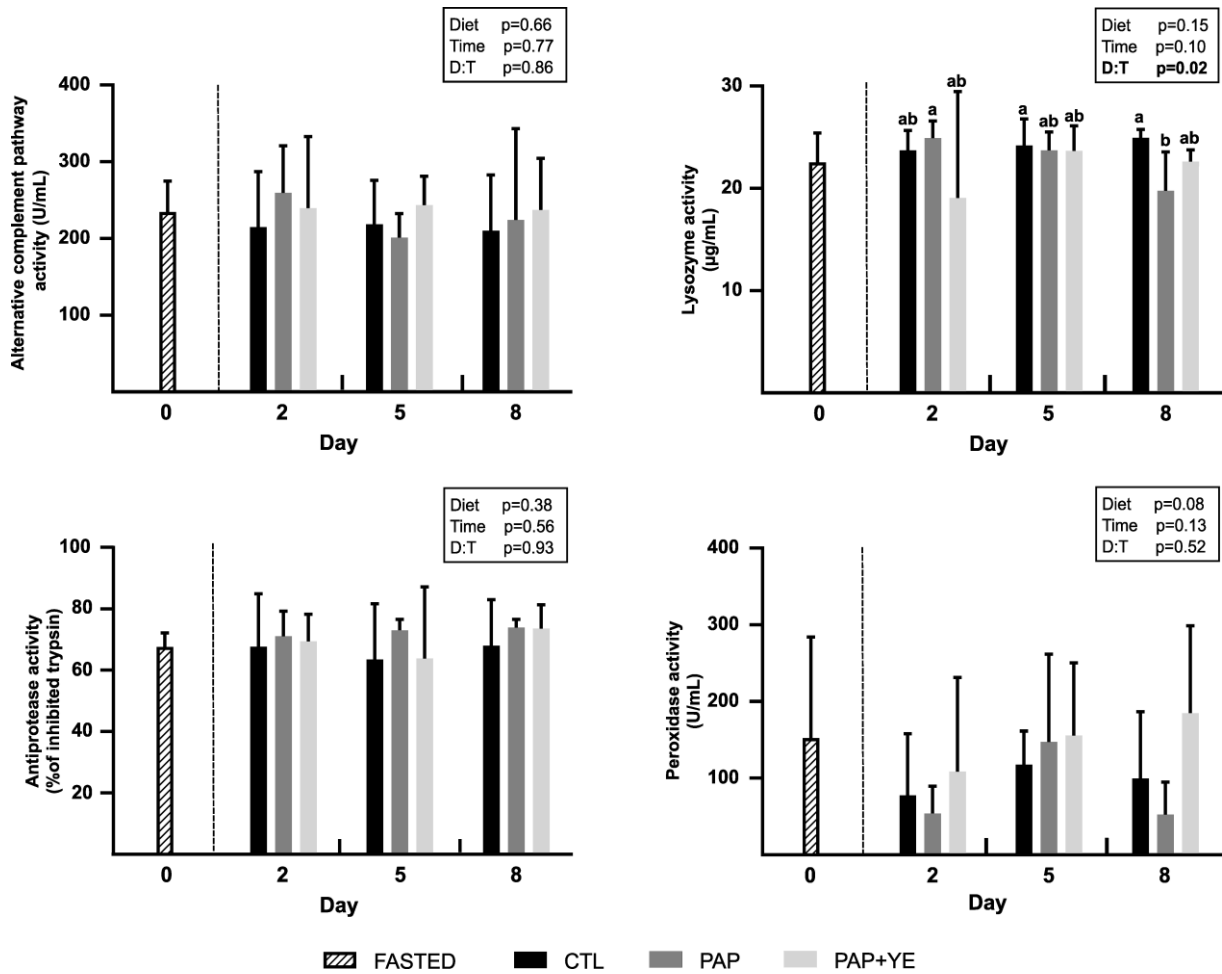


Figure 2. Mean activity (+ standard deviation) (n = 6) of plasma immune markers in rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction (D:T). Lowercase letters indicate the significant differences in the interaction between diet and time.

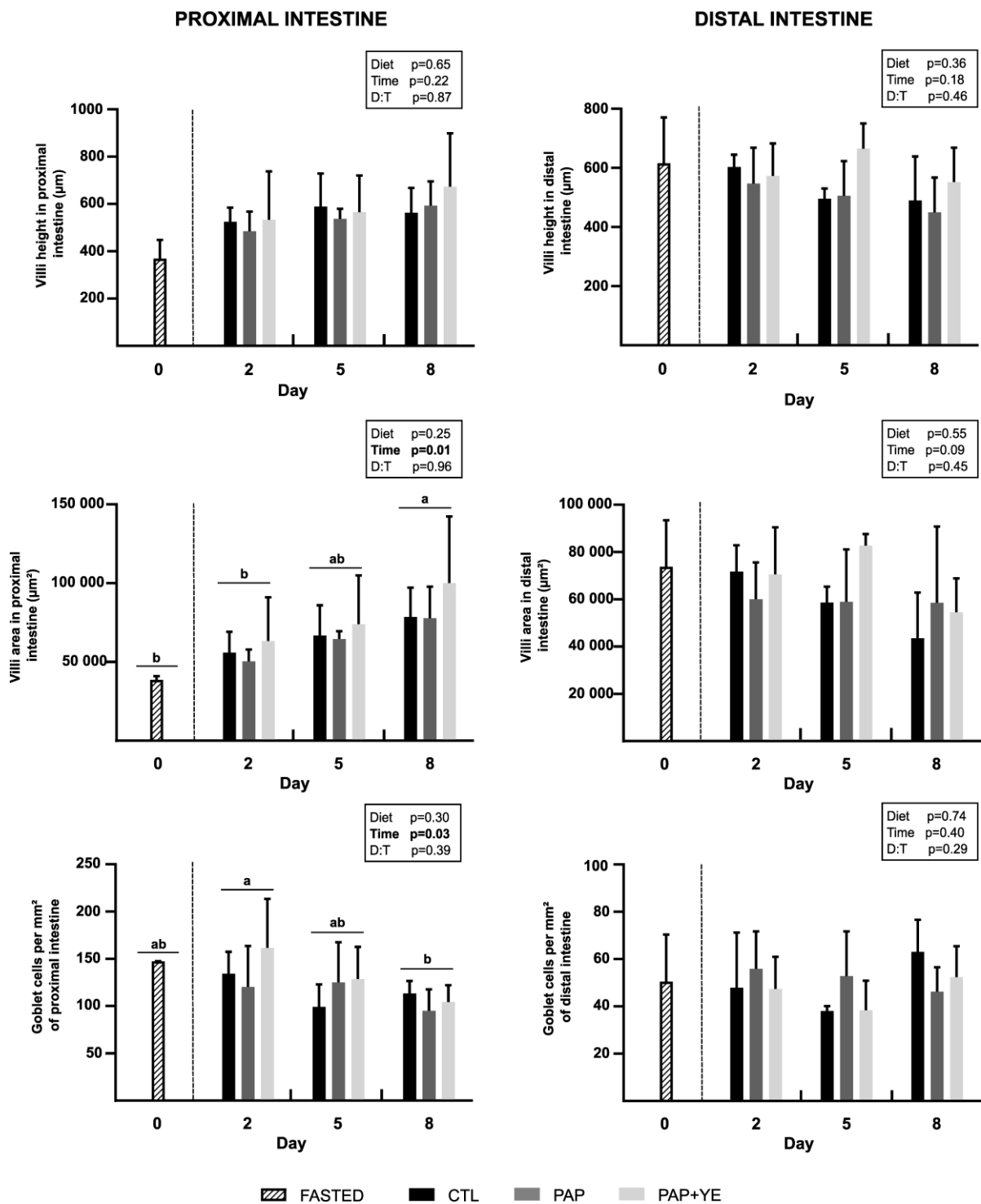


Figure 3. Mean morphometric markers (+ standard deviation) ($n = 6$) of the proximal and distal intestine of rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction (D:T). Lowercase letters indicate significant differences between sampling days.

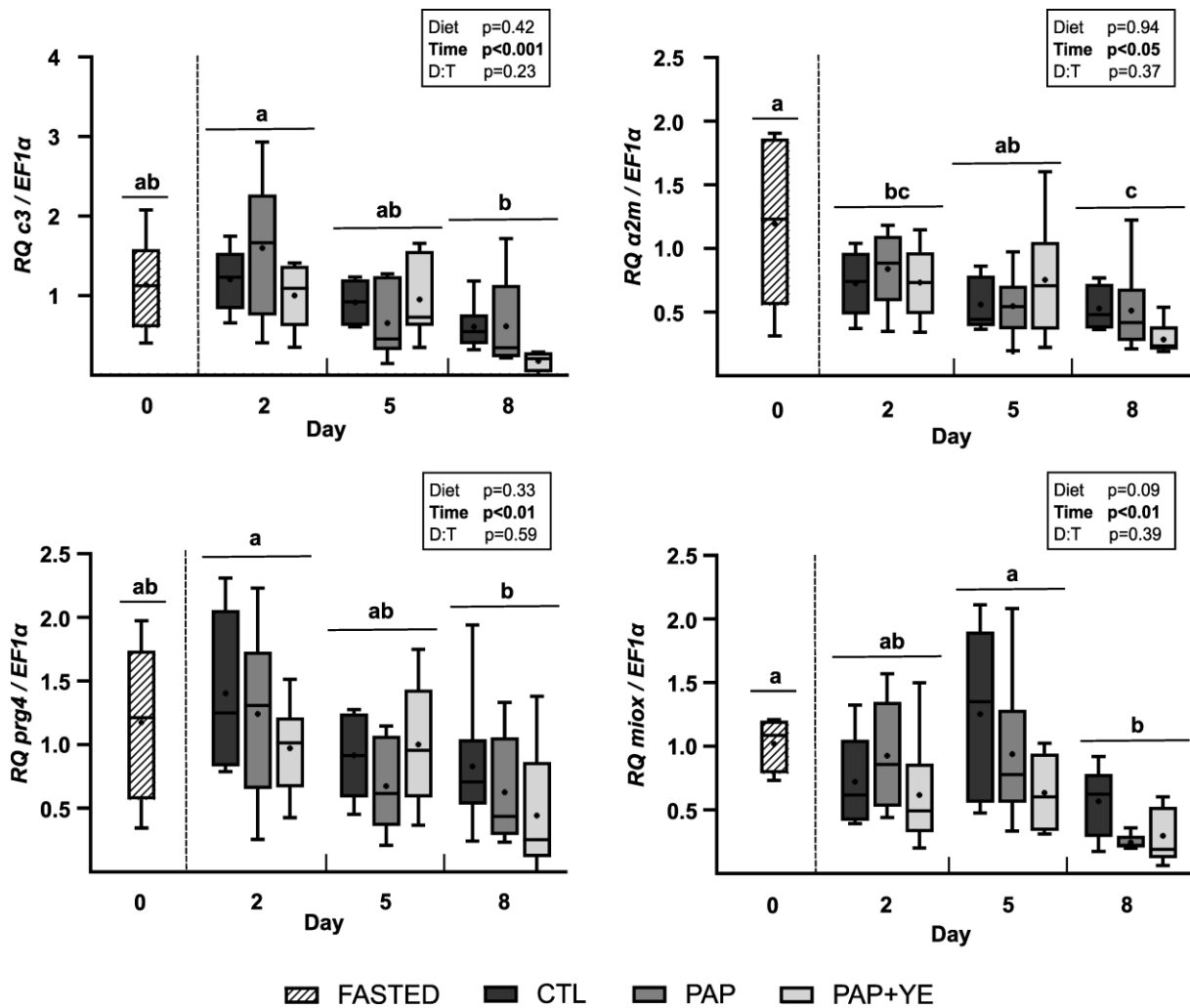


Figure 4. Mean normalized expression (+ standard deviation) (n = 6) of genes related to immunity, inflammation and cell protection in the liver of rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract. *c3*, main complement molecule C3; *prg4*, proteoglycan 4; *miox*, myo-inositol oxygenase; $\alpha 2m$, alpha-2-macroglobulin isoform X2. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction (D:T). Lowercase letters indicate significant differences between sampling days.

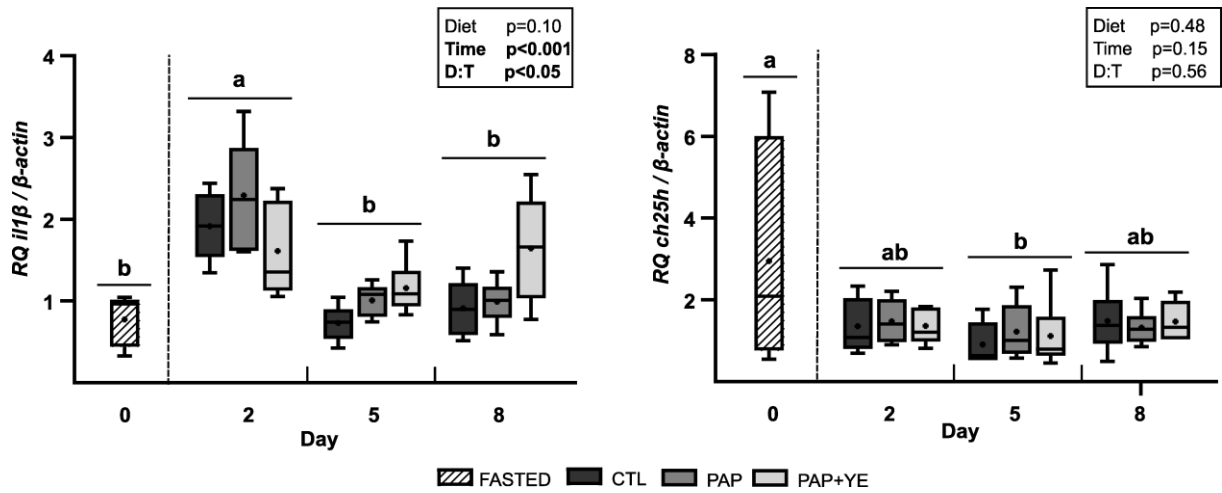


Figure 5. Mean normalized expression (+ standard deviation) (n = 6) of genes related to inflammation and antiviral functions in the distal intestine of rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract; *i11β*, interleukin-1 beta; *ch25h*, cholesterol 25-hydroxylase. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction (D:T). Lowercase letters indicate significant differences between sampling days.

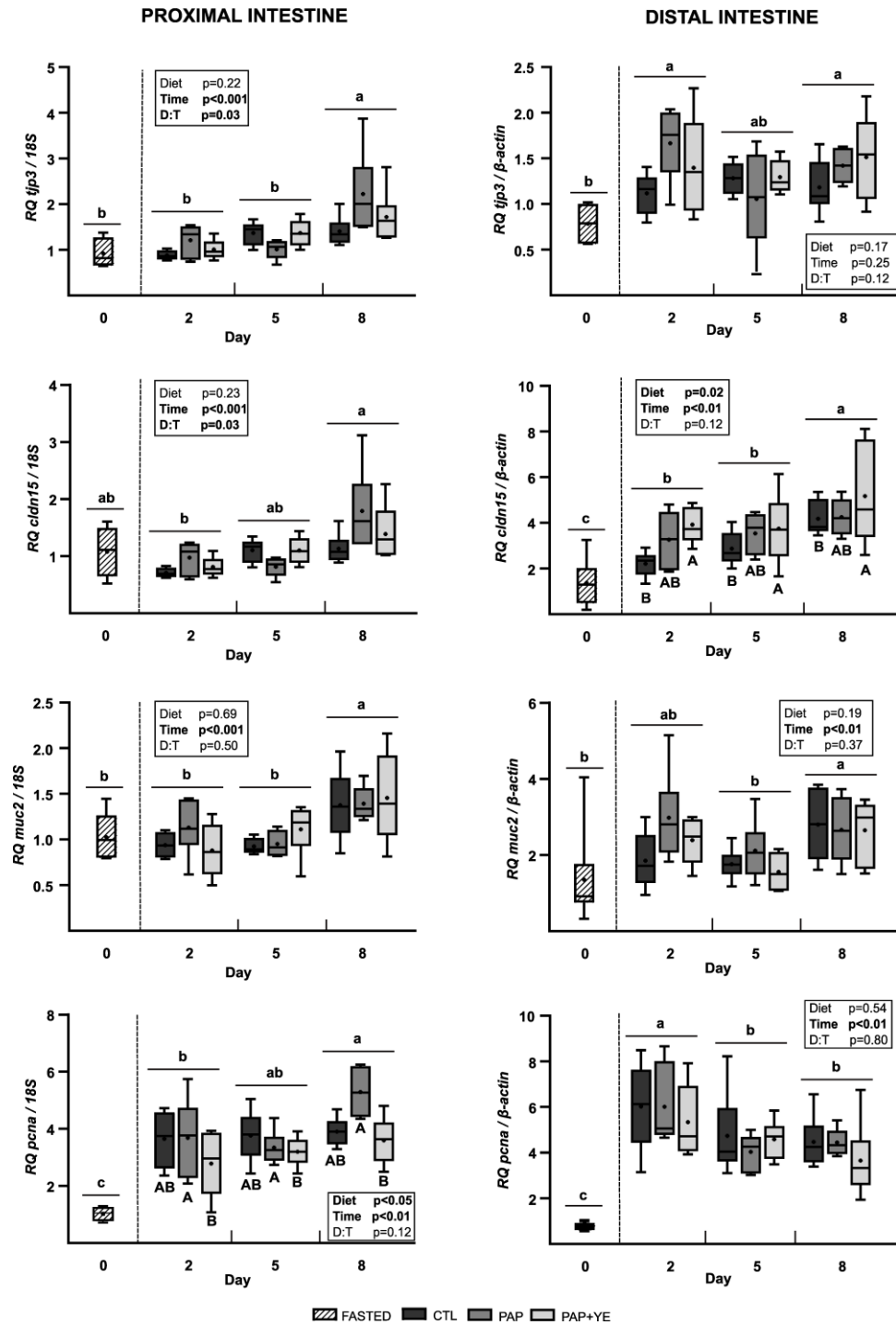


Figure 6. Mean normalized expression (+ standard deviation) (n = 6) of genes related to structure, mucus synthesis and cell proliferation in the proximal and distal parts of the intestine of rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract; *tjp3*, tight junction protein 3; *cldn15*, claudin-15; *muc2*, mucin-2; *pcna*, proliferating cell nuclear antigen. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction (D:T). Lowercase letters indicate significant differences between sampling days. Uppercase letters indicate significant differences between diets.

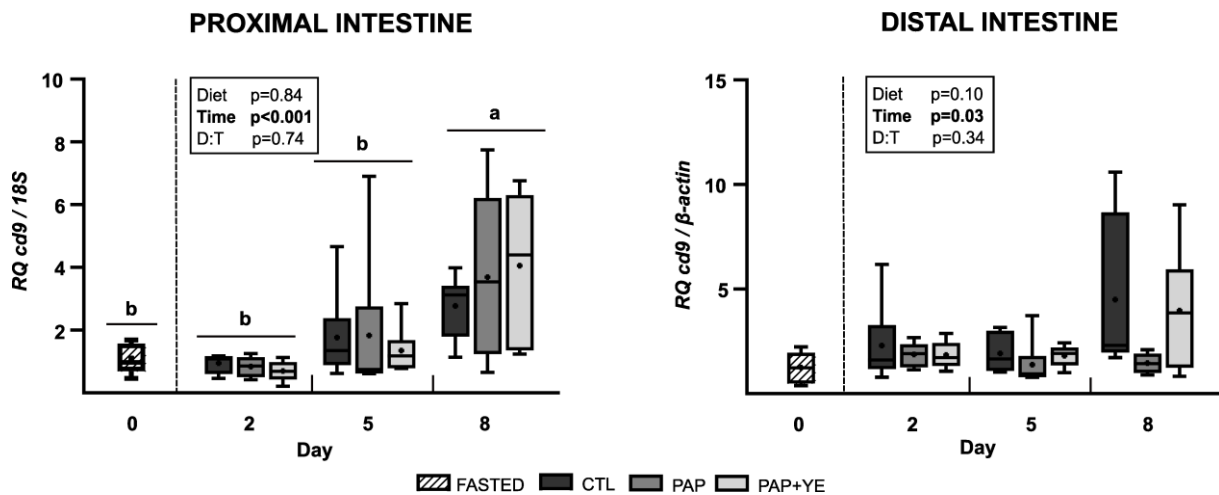


Figure 7. Mean normalized expression (+ standard deviation) ($n = 6$) of the *cd9* gene, involved in coagulation, in the proximal and distal intestine of rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract; *cd9*, CD9 protein. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction (D:T). Lowercase letters indicate significant differences between sampling days.

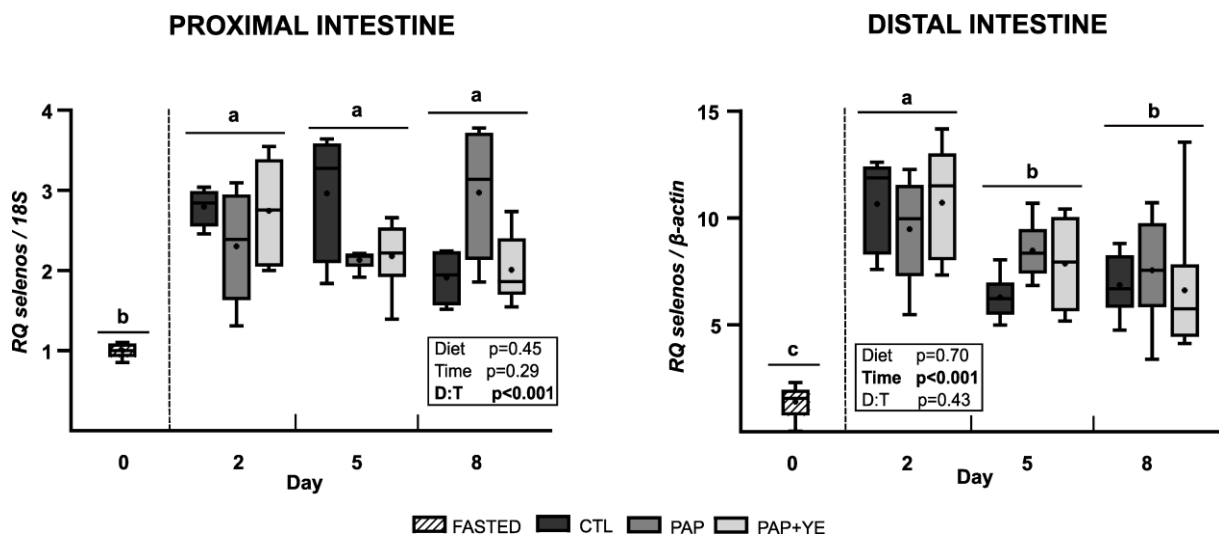


Figure 8. Mean normalized expression (+ standard deviation) ($n = 6$) of the selenoprotein S (*selenos*) gene, involved in the endoplasmic reticulum stress response, in the proximal and distal intestine of rainbow trout after fasting and on three of the eight subsequent days of refeeding. CTL, commercial-like feed; PAP, processed animal protein feed; PAP+YE, PAP with 3% yeast extract. Insets indicate the significance of effects of diet, time and their interaction. Lowercase letters indicate significant differences between sampling days.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

PARTIE 1

Effets à long terme d'une supplémentation en extrait de levure dans un régime à base de protéines végétales et de coproduits animaux

1. La supplémentation en extrait de levure améliore l'efficacité d'un régime sans farine de poissons composé d'ingrédients alternatifs

Dans la littérature, de nombreuses études dépeignent les effets néfastes des régimes dépourvus de farine de poissons chez les espèces aquacoles. Les salmonidés tels que la truite arc-en-ciel sont particulièrement sensibles à la substitution des farines de poissons par des ingrédients alternatifs. Chez la truite, une alimentation à base d'ingrédients alternatifs s'accompagne généralement d'une diminution des performances de croissance (Kirimi et al., 2016; Lazzarotto et al., 2015), ce qui représente une perte économique pour les éleveurs. Néanmoins, des études montrent que ces effets néfastes peuvent être atténués en utilisant des levures (Øverland et al., 2013). Les levures sont utilisées en nutrition animale pour leurs profils nutritionnels mais aussi pour leurs propriétés immunostimulantes (**Propriétés nutritionnelles et bioactives des fractions pariétales et cytosoliques des levures, p. 86**). Cette thèse avait pour objectif premier d'évaluer, à long terme, la valeur nutritionnelle et les bénéfices d'une supplémentation en extrait de levure dans un aliment composé de sources protéiques alternatives à la farine de poissons. Le choix des matières premières alternatives s'est tourné vers l'utilisation d'un mélange de protéines végétales ainsi que des coproduits d'animaux terrestres. En effet, les végétaux et les protéines animales transformées se placent aujourd'hui en tant que candidats de taille dans la substitution des farines de poisson en aquaculture en raison de leurs profils nutritionnels avantageux, de leurs coûts réduits et de leur caractère durable. L'extrait de levure utilisé dans le cadre de la thèse représente la fraction cytosolique de la cellule. Ce produit est riche en azote protéique, en petits peptides (**Figure 18, p. 106**) et en nucléotides (**Tableau 12, p. 104**).

a. Bénéfices de la supplémentation en extrait de levure sur les performances de croissance

La valeur nutritionnelle de la supplémentation en extrait de levure a d'abord été évaluée à long terme par le biais d'un essai de digestibilité et d'un essai de croissance. Conformément à ce qui est généralement observé dans la littérature (El-Haroun and Bureau, 2007; Kirimi et al., 2016), un retard de croissance a été observé chez les truites nourries avec le régime PAP à la fin des 12 semaines d'alimentation. Néanmoins, l'ajout de 3 % d'extrait de levure dans le régime PAP a permis d'améliorer la croissance des poissons, se rapprochant sensiblement des performances observées dans le groupe CTL (**Figure 26A, p. 207**). Dans la littérature, les baisses de croissance observées chez les poissons nourris avec un régime composé de protéines végétales et de coproduits animaux sont généralement expliquées par (1) une baisse de digestibilité liée à la nature des ingrédients utilisés (Bureau et al., 1999; Espe et al., 2006; Pratoomyot et al., 2010), (2) par une diminution de la consommation de l'aliment en lien avec son appétence (Abdel-Warith et al., 2001; Hansen et al., 2007; Tripathi and Mishra, 2007), (3) par une mauvaise assimilation et utilisation métabolique des nutriments apportés par l'aliment (Campos et al., 2019; De Francesco et al., 2007; Moutinho et al., 2017), (4) ainsi que par une altération de la santé du tube digestif (G Baeverfjord and Krogdahl, 1996).

b. Les performances de croissance s'expliquent-elles par une altération de la digestibilité, de la consommation et/ou de l'utilisation métabolique des aliments expérimentaux ?

Chez les poissons carnivores, les baisses de croissance observées avec des régimes à base d'ingrédients végétaux et de coproduits animaux ont souvent été associées à la nature des matières premières. Les végétaux sont riches en facteurs antinutritionnels qui interfèrent avec la digestion des nutriments, et les coproduits d'origine animale sont riches en acides gras saturés moins bien assimilés au niveau intestinal. Cependant, l'hypothèse que les effets observés sur la croissance dans cette étude puissent être liés à une altération de la digestibilité des aliments a été infirmée. En effet, le retard de croissance observé chez les poissons nourris avec le régime PAP ne s'explique pas par une baisse de la digestibilité de l'aliment puisque les coefficients de digestibilité de cet aliment sont similaires voire meilleurs que ceux des aliments CTL et PAP+YE. L'amélioration de la croissance observée chez les poissons nourris avec le régime supplémenté PAP+YE n'a pas non plus été associée à une augmentation des coefficients de digestibilité de l'aliment (**Figure 26B, p. 207**).

Le retard de croissance chez les poissons nourris avec le régime PAP ne peut pas non plus être expliqué par une diminution de la prise alimentaire (**Figure 26C, p. 207**). En effet, ces poissons présentaient la consommation journalière d'aliment (DFI) la plus élevée comparés aux groupes CTL et PAP+YE. Dans la littérature, les coproduits d'origine animale sont parfois décrits comme appétants mais la hausse significative de la prise alimentaire semble plutôt refléter un effet compensatoire potentiellement lié à un déséquilibre en acides aminés ou en acides gras. Par ailleurs, les extraits de levure riches en nucléotides sont également considérés comme appétants mais le régime PAP+YE n'a pour autant pas induit une hausse de la prise alimentaire chez les truites.

En termes d'assimilation et d'utilisation des nutriments, les différences d'efficacité alimentaire n'étaient pas statistiquement significatives entre les régimes. Cependant, les poissons nourris avec le régime PAP présentaient une efficacité alimentaire numériquement plus faible, et la valeur P du test statistique était de 0,06, ce qui suggère une tendance à une diminution de l'efficacité alimentaire par rapport à l'aliment CTL à base de farine de poissons, et une amélioration de cette efficacité avec l'ajout de l'extrait de levure dans l'aliment (**Figure 26D, p. 207**). Cette hypothèse est en adéquation avec les paramètres d'utilisation des nutriments. En effet, en analysant les gains et rétentions en nutriments, nous avons constaté que les truites nourries avec l'aliment PAP présentaient un gain et une rétention protéiques plus faibles que celles nourries avec l'aliment CTL à base de farine de poissons. De plus, l'ajout de levures dans l'aliment PAP a permis de rétablir un gain et une rétention protéiques similaires à ceux des poissons nourris avec l'aliment CTL. Une amélioration de la rétention protéique a déjà été observée chez la perche chinoise (*Siniperca chuatsi*) nourrie avec un régime supplémenté en nucléotides (Liu et al., 2020) et chez le bar Européen nourri avec un aliment supplémenté en levure (Oliva-Teles and Gonçalves, 2001). L'amélioration de ce paramètre pourrait donc être expliquée par la richesse en nucléotides de l'extrait de levure utilisé (**Tableau 12, p. 104**). De plus, la digestibilité des protéines était inchangée chez les poissons nourris avec le régime PAP+YE.

Des bouleversements métaboliques associés à une mauvaise utilisation de l'aliment peuvent également être rencontrés chez les poissons nourris avec un aliment composé d'ingrédients végétaux et de coproduits d'origine animale. Ces bouleversements se traduisent par un engraissement de la chair, du foie et de la partie péri-viscérale (De Francesco et al., 2007; Hu et al., 2013; Kaushik et al., 2004). Dans cette étude, les compositions corporelles étaient identiques quel que soit le régime. Les indices hépato- et viscérosomatiques n'ont pas non plus été affectés par la composition des régimes PAP et PAP+YE (**Figure 26E, p. 207**). Quelques analyses complémentaires auraient permis d'appuyer ces résultats. Il aurait par exemple été intéressant de compléter les données par une mesure des teneurs en lipides dans le foie. Il aurait également été judicieux de réaliser une analyse histologique du foie afin

d'évaluer la présence de gouttelettes lipidiques qui est un des symptômes rencontrés chez les animaux souffrant de stéatose hépatique (Hu et al., 2013).

En conclusion, l'augmentation de la croissance chez les truites nourries avec le régime PAP+YE n'a pu être corrélée à la digestibilité des nutriments contenus dans l'aliment, ni à une réduction de la prise alimentaire. En termes de métabolisation de l'aliment, l'efficacité alimentaire n'était pas significativement différente entre les régimes bien qu'une tendance à la hausse ait été observée chez les truites nourries avec le régime supplémenté en extrait de levure. En revanche, ces poissons présentaient de meilleurs gain et rétention protéiques qui pourraient expliquer les performances observées. Chez les poissons nourris avec le régime PAP non supplémenté, les causes de la diminution de la croissance pourront être explorées par le biais d'analyses complémentaires au niveau du foie (dosage des lipides et analyse histologique).

c. La santé de l'intestin reflète-t-elle les phénotypes observés ?

Le retard de croissance aurait également pu être expliqué par une altération de la muqueuse intestinale. A notre connaissance, les coproduits d'origine animale ne provoquent pas d'inflammation du tube digestif. Néanmoins, les régimes expérimentaux étaient majoritairement composés d'ingrédients végétaux et notamment de farine de soja connue pour induire des entérites chez les salmonidés (G Baeverfjord and Kroghdahl, 1996). Des teneurs plus élevées en farine de soja auraient ainsi pu être délétères pour la santé de la muqueuse intestinale et expliquer les baisses de croissance. Cependant, cette hypothèse peut être écartée car les régimes à base de végétaux et de coproduits animaux comportaient moins de soja que le régime CTL à base de farine de poissons. L'inflammation de l'intestin se traduit par exemple, par un écrasement des villosités intestinales et par une augmentation du nombre de cellules à mucus (Hansen et al., 2007; Kroghdahl et al., 2003; Olsen et al., 2007). L'absence de ces signes d'inflammations de la muqueuse intestinale pour l'ensemble des régimes est donc logique.

En revanche, les poissons nourris avec le régime supplémenté en extrait de levure présentaient une augmentation de la taille des villosités intestinales dans les parties proximale et distale de l'intestin, suggérant une augmentation de la capacité d'absorption des nutriments (**Figure 26F, p. 207**). Ces résultats suggèrent que l'extrait de levure a un effet plutôt bénéfique pour la muqueuse intestinale de la truite. La tolérance vis-à-vis du produit avait également été démontrée lors des essais préliminaires réalisés *in vitro* sur une culture d'entérocytes de truite arc-en-ciel. En effet, l'utilisation de levure dans le milieu de culture des entérocytes avait stimulé la prolifération cellulaire (**Figure 24, p. 124**). Ces effets pourraient être liés à la richesse en nucléotides de l'extrait de levure, puisque ces derniers sont

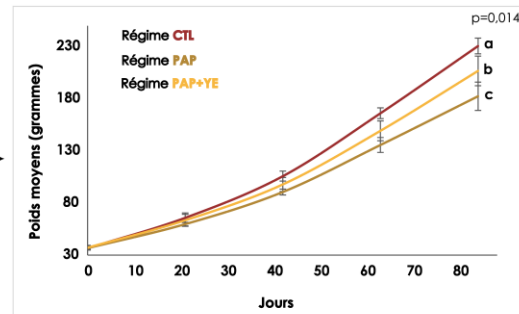
étroitement impliqués dans la modulation de la morphologie intestinale et induisent une augmentation de la taille des villosités chez les poissons (Burrells et al., 2001a; Cheng et al., 2011; Hossain et al., 2016). En somme, ces résultats suggèrent également que l'inclusion d'extrait de levure dans l'aliment peut augmenter la surface d'absorption des nutriments au niveau intestinale, ce qui pourrait expliquer les bénéfices constatés en termes de croissance.

B) Lien avec la digestibilité ?

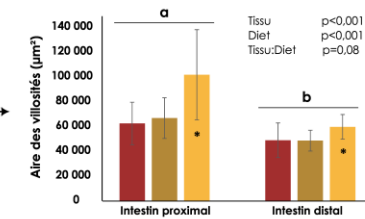
CDA (%)	CTL	PAP	PAP+YE	p-value
Matière sèche	81,5 ± 0,2 ^c	84,6 ± 0,2 ^a	82,9 ± 0,2 ^b	<0,001
Protéines	90,7 ± 0,4 ^b	91,6 ± 0,3 ^a	91,1 ± 0,4 ^{ab}	0,04
Lipides	93,8 ± 1,9	94,5 ± 0,5	93,6 ± 0,1	0,56
Minéraux	43,8 ± 1,4	51,8 ± 0,9	44,2 ± 1,2	0,08
Amidon	93,8 ± 0,6	95,3 ± 0,6	95,2 ± 0,8	0,08
Energie	87,5 ± 0,6 ^b	88,9 ± 0,4 ^a	87,5 ± 0,6 ^b	0,03

➔ Coefficients de digestibilité élevés

A) Croissance en réponse aux aliments expérimentaux

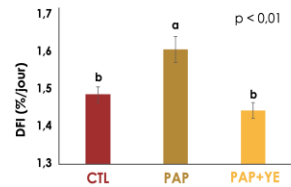


F) Lien avec une modulation de la structure de la muqueuse intestinale ?



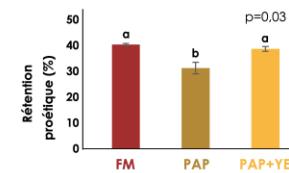
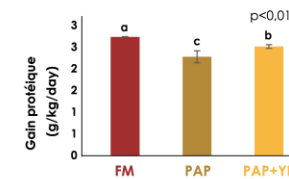
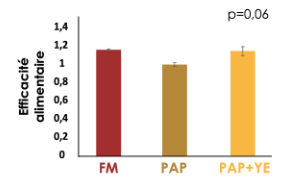
➔ Augmentation de la taille des villosités intestinales dans le groupe PAP+YE: amélioration de l'absorption des nutriments ?

C) Lien avec la prise alimentaire ?



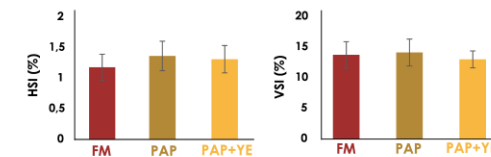
➔ Consommation plus élevée dans le groupe PAP: effet compensatoire ?

D) Lien avec l'utilisation des nutriments ?



➔ Amélioration du gain et de la rétention protéiques dans le groupe PAP+YE: synthèse de novo ?

E) Lien avec un dérèglement métabolique ?



Composition corporelle	CTL	PAP	PAP+YE	
Matière sèche (MS)	34,1 ± 0,2	34,6 ± 1,7	34,5 ± 1,3	0,73
Protéines (%MS)	46,1 ± 0,3	42,4 ± 2,2	44,0 ± 1,8	0,09
Lipides (%MS)	51,3 ± 0,7	57,0 ± 7,3	55,1 ± 2,5	0,11
Energie (%MS)	30,3 ± 0,2	30,7 ± 0,4	30,4 ± 0,5	0,40
Cendres (%MS)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,3	5,8 ± 0,3	

➔ Pas de signe d'engraissement du foie, des viscères ou du muscle

Figure 26 Résumé des principaux résultats zootechniques et de leurs liens potentiels avec les performances de croissance obtenues à long terme.

2. La supplémentation en extrait de levure amène des certitudes quant aux liens entre la nutrition et l'immunité chez la truite arc-en-ciel

Un aliment aquacole doit couvrir les besoins nutritionnels des poissons et également promouvoir leur santé. La synthèse bibliographique de ce manuscrit (p. 49) met en exergue les liens existants entre la nutrition, l'immunité, la santé et les performances de croissance des poissons d'élevage et souligne l'intérêt d'utiliser des additifs fonctionnels en alimentation aquacole (p. 74).

Comme évoqué dans la partie précédente, les baisses de croissance observées chez les truites nourries avec le régime PAP n'ont pu être expliquées par une inflammation de la muqueuse intestinale. En revanche, l'amélioration de la croissance chez les poissons nourris avec le régime supplémenté en extrait de levure pourrait potentiellement être expliquée par l'augmentation de la surface d'absorption au niveau de l'intestin, associée à une augmentation de la taille des villosités. Ces résultats suggèrent donc que l'extrait de levure pourrait être impliqué dans l'amélioration des performances de croissance. Afin d'approfondir et de déchiffrer les mécanismes potentiellement responsables des phénotypes observés, il nous a paru pertinent d'évaluer la réponse immunitaire plasmatique ainsi que d'utiliser une approche transcriptomique sans a priori sur deux tissus impliqués dans le métabolisme nutritionnel et l'immunité, le foie et l'intestin.

a. L'extrait de levure stimule les fonctions immunitaires sériques de manière modérée

De manière générale, les marqueurs immunitaires innés plasmatiques considérés lors de cette thèse n'ont pas été affectés par les régimes à base de protéines végétales et de coproduits animaux, et la supplémentation en extrait de levure n'a pas non plus stimulé les réponses immunitaires innées au niveau plasmatique. Parmi les facteurs de la réponse immunitaire étudiés, seule l'activité de la peroxydase plasmatique a été modifiée de manière significative par les régimes expérimentaux (**Figure 27A, p. 211**). Ainsi, les truites alimentées avec le régime PAP présentaient l'activité de la peroxydase plasmatique la plus faible. De plus, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature chez les poissons et les crevettes (Abu-Elala et al., 2018; Zheng et al., 2021), l'activité de la peroxydase plasmatique n'a été que modérément stimulée par la supplémentation en extrait de levure. En effet, les poissons nourris avec le régime PAP+YE présentaient une activité de la peroxydase intermédiaire à celles des groupes CTL et PAP.

La peroxydase est une enzyme antioxydante impliquée dans la décomposition des peroxydes toxiques lors d'un stress oxydant. Cette enzyme intervient donc principalement lors d'un stress. Son activité étant réduite chez les poissons nourris avec le régime PAP, ces résultats laissent à penser que le régime PAP induit une baisse des capacités antioxydantes. Certains acides aminés, tels que le glutamate et la glutamine, et certains minéraux, tels que le sélénium, contribuent à la synthèse et au bon fonctionnement de la peroxydase (Andersen et al., 2015; Khan et al., 2017). Des carences sont donc susceptibles de nuire aux fonctions antioxydantes. Les régimes expérimentaux ont tous été formulés de façon à couvrir correctement les besoins nutritionnels en acides aminés et en minéraux. Néanmoins, il est possible que les régimes ne soient pas équilibrés les uns par rapports aux autres en termes d'acides aminés, ce qui expliquerait que les poissons nourris avec l'aliment CTL présentent un niveau d'activité de peroxydase plus élevé que les autres régimes. Ainsi, la baisse significative de l'activité de la peroxydase chez les poissons nourris avec l'aliment PAP pourrait potentiellement être expliquée par un déficit en glutamate et en glutamine. En effet, les régimes à base de coproduits animaux présentent souvent un déséquilibre en acides aminés. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de confirmer cette hypothèse car les profils en acides aminés des aliments expérimentaux n'ont pas été analysés. Une logique similaire pourrait s'appliquer aux minéraux. Afin d'apporter aux truites l'ensemble des minéraux qui lui sont nécessaires, un mélange minéral a été incorporé dans chaque régime à hauteur de 1 %. Ce mélange contenait du sélénium sous forme de sélénite de sodium. Cependant, la farine de poisson est une source importante de sélénium, il est donc possible que les apports en sélénium aient été très différents entre les régimes alimentaires. Ces différences d'apports en acides aminés et sélénium pourraient donc être à l'origine de la baisse de l'activité peroxydase des poissons nourris avec l'aliment PAP mais les résultats doivent tout de même être pris avec précaution car la variabilité intragroupe était très élevée.

L'addition d'extrait de levure a en revanche stimulé un facteur plasmatique impliqué dans les fonctions immunitaires adaptatives. En effet, les poissons nourris avec le régime PAP+YE présentaient des niveaux totaux d'immunoglobulines M (IgM) significativement plus élevés que les truites nourries avec le régime CTL et PAP, dont les niveaux d'IgM étaient identiques (**Figure 27B, p. 211**). Les IgM sont impliquées dans l'activation de la voie du complément et dans l'induction de la phagocytose lors d'une infection pathogénique (Abós et al., 2022; Kaattari, 1992). Bien qu'aucun effet de la supplémentation en extrait de levure n'ait été observé sur l'activité plasmatique de la voie du complément, ces résultats suggèrent tout de même que l'utilisation de ce produit levurien dans un régime aquacole pourrait être susceptible de renforcer les défenses acquises de lutte contre les infections pathogènes. Cette hypothèse pourra par exemple être vérifiée par le biais d'un challenge pathogène *in vivo* ou par la mesure de l'activité phagocytaire des leucocytes *in vitro*. Chez les téléostéens, les immunoglobulines

sont produites et sécrétées par les lymphocytes B. Chez certaines espèces de poissons, des régimes enrichis en nucléotides et en petits peptides stimulent la prolifération des leucocytes sanguins ainsi que la production d'immunoglobulines (Low et al., 2003; Reda et al., 2018). Dans le cadre de cette thèse, il était prévu de réaliser une identification et un comptage des différentes sous-populations de leucocytes sanguins en utilisant des colorations s'appuyant sur des techniques d'histologie, mais les lames ont malheureusement été perdues au cours du transport vers le Portugal. Ces comptages auraient également pu être mis en place au niveau tissulaire en utilisant des techniques d'immunohistochimie, en visant par exemple l'intestin où l'on retrouve de nombreuses cellules immunitaires associées au GALT.

Le séquençage des peptides de l'extrait de levure a permis de mettre en évidence un total de 9 785 peptides. Une recherche exacte de peptides potentiellement bioactifs dans le produit a été réalisée à partir d'une liste de séquences bioactives, construite avec la base de données BIOPEP et la littérature. Cette recherche exacte a permis d'identifier 62 séquences bioactives dans l'extrait de levure. Parmi ces séquences bioactives, la plupart était associées à des fonctions *ACE inhibitor* et antioxydantes (54 séquences en tout) et moins à des fonctions anti-inflammatoires et *DPP IV inhibitor* (9 séquences en tout). Pour l'instant, ces résultats restent discutables car la recherche exacte de peptides bioactifs a été réalisée à partir d'une sélection de peptides appartenant à des fonctions d'intérêt (fonctions anti-thrombotiques, immunomodulantes, immunostimulantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antibactériennes et antioxydantes). Le peu de peptides bioactifs identifiés dans l'extrait de levure semble donc être associé à la méthode utilisée ainsi qu'à l'occurrence de certaines fonctions dans la liste, et ne reflète donc pas la diversité potentielle des peptides bioactifs de l'extrait de levure et de leurs activités. De plus, les séquences initialement identifiées n'étaient pas toutes propres à la souche *Saccharomyces cerevisiae* mais étaient aussi issus d'autres organismes. Ces résultats préliminaires montrent toutefois que l'extrait de levure utilisé dans le cadre de la thèse comporte des peptides potentiellement bioactifs. La question de savoir si ces peptides bioactifs ont stimulé la production d'immunoglobuline plasmatique reste en suspens car nous n'avons pas assez d'éléments pour appuyer cette hypothèse. Ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives quant à la recherche des peptides bioactifs dans l'extrait de levure. Dans le futur, Phileo by Lesaffre réalisera une recherche « non exacte » de séquences en s'appuyant sur deux bases données, BIOPEP (Iwaniak et al., 2016) et PEP Lab (<http://www.pep-lab.info/browse>), et en se focalisant spécifiquement sur la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Cette analyse nécessitera une extraction de jeux de données conséquents ainsi qu'une analyse bio-statistique, qui permettront potentiellement d'attribuer des activités biologiques aux peptides de l'extrait de levure et d'expliquer les phénotypes observés.

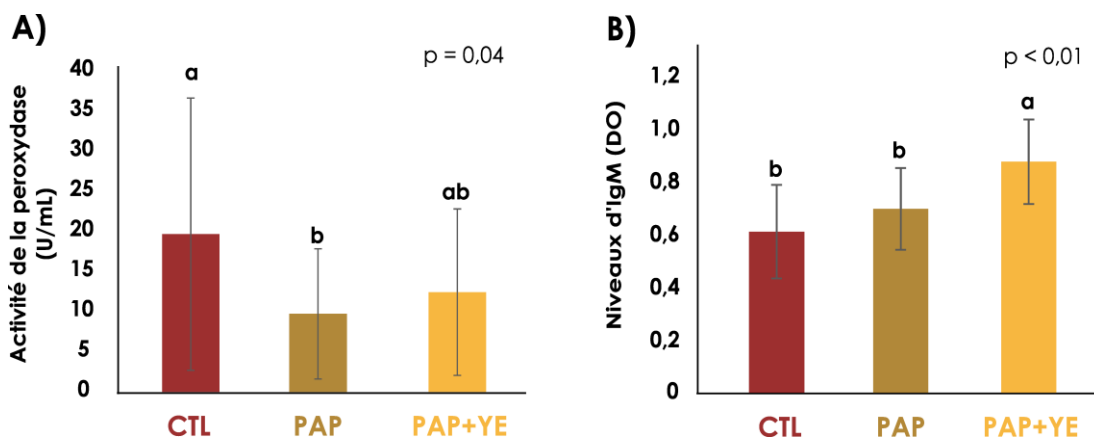


Figure 27 Activité de la peroxydase et niveaux d'immunoglobulines M (IgM) dans le plasma sanguin des truites arc-en-ciel à la fin de l'essai de croissance.

b. L'extrait de levure module l'expression de transcrits impliqués dans les fonctions immunitaires et la réponse au stress

L'intérêt de la transcriptomique en nutrition aquacole

La génomique est un outil puissant dans l'interprétation des phénomènes biologiques et permet de répondre à une large diversité de problématiques de recherche. En aquaculture, les études génomiques permettent d'apporter des éléments clés quant à l'identification de l'influence de la nutrition sur la physiologie, le métabolisme et l'immunité des poissons d'élevage (Martin and Król, 2017b; Porter et al., 2022). La génomique rassemble des techniques ayant évoluées grâce aux avancées technologiques mais également grâce aux séquençages de génomes complets d'espèces aquacoles à haute valeur économique telles que le saumon (Lien et al., 2016), la truite arc-en-ciel (Berthelot et al., 2014), la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (Star et al., 2011), la carpe commune (Xu et al., 2014), le bar Européen (Tine et al., 2014), le tilapia du Nil (Brawand et al., 2014) ou encore la barbus de rivière (Liu et al., 2016).

Les principales techniques omiques utilisées en aquaculture sont les puces à ADN (« *microarray* » en anglais) et le séquençage à haut débit (RNA-seq), qui permettent l'analyse simultanée de centaines voire de milliers de transcrits. Le *microarray* a été initialement utilisé chez les poissons à partir des années 1990. Il permet de mesurer l'expression de gènes spécifiques et se base sur une technique d'hybridation. Cette technique reste néanmoins limitante dans le cadre de l'identification de

gènes dupliqués et présente souvent de fortes variabilités lorsque les gènes sont faiblement exprimés. A l'inverse, la technologie RNA-seq est une approche sans a priori puisqu'elle séquence l'intégralité du transcriptome et ne nécessite pas la sélection préalable de gènes cibles. Cette technique est néanmoins coûteuse et nécessite des installations et des ressources informatiques puissantes (Martin and Król, 2017b).

Afin d'identifier les mécanismes sous-jacents aux phénotypes observés, le séquençage à haut débit nous paraissait donc être un outil pertinent puisque cette technique ne nous limitait pas à un « parti pris » sur le choix de voies cibles à explorer. L'analyse transcriptomique a été réalisée sur le foie et l'intestin distal, deux tissus que nous considérons stratégiques pour l'étude des effets des levures sur la nutrition et la santé de la truite. En plus de séquencer les ARNs des deux tissus, nous avons également fait le choix de séquencer les microARNs. Les microARNs sont de petits ARNs non codants (19 à 25 nucléotides) qui répriment l'expression d'un gène en se fixant sur un ARN messager cible, conduisant à l'inhibition de sa traduction (appariement imparfait) ou à sa dégradation (appariement parfait). Chez les poissons, les microARNs sont impliqués dans la plupart des fonctions biologiques (développement embryonnaire, osmorégulation, différenciation des cellules, régulation de la croissance, immunité ...) et agissent au niveau post-transcriptionnel (Bizuayehu and Babiak, 2014; Rasal et al., 2016).

La réponse transcriptomique de deux tissus clés impliqués dans la physiologie nutritionnelle et l'immunité

Nos analyses transcriptomiques ont mis en évidence très peu de gènes différentiellement exprimés entre les régimes dans les tissus considérés : 14 transcrits dans le foie et 28 dans l'intestin distal (**Figure 28, p. 216**). D'autres analyses transcriptomiques conduites au laboratoire avaient déjà mis en évidence un impact modéré des régimes à base de plantes sur l'expression des gènes du foie et de l'intestin. La comparaison d'un régime avec farine et huile de poissons et d'un régime strictement végétal avait conduit à l'identification d'environ 140 gènes différentiellement exprimés dans l'intestin et d'une cinquantaine dans le foie (Lazzarotto et al., 2018). Ces analyses par microarray avaient été conduites sur des poissons beaucoup plus petits (environ 10 g). De même, chez des truites plus grandes (environ 1 kg), le remplacement de la farine de poissons par des protéines végétales s'était accompagné d'une régulation de l'expression de seulement 75 gènes dans le foie (Panserat et al., 2008). En comparaison, le confinement et la manipulation affecte l'expression de plus de 300 gènes dans le foie de la truite arc-en-ciel (Liu et al., 2014). Chez le saumon, les effets des protéines végétales peuvent être

beaucoup plus importants que chez la truite. En effet, une étude relative au remplacement partiel (50 %) de la farine de poissons par des protéines végétales chez le saumon Atlantique indique une modification de l'expression de plus de 1200 gènes dans l'intestin et 220 gènes dans le foie (Tacchi et al., 2011). La plus forte sensibilité de cette espèce aux protéines végétales et en particulier au soja pourrait expliquer cette différence avec la truite (Refstie et al., 2000). En effet, parmi les gènes identifiés comme différentiellement exprimés dans l'intestin de saumon, de nombreux présentaient un lien avec le développement de l'entérite.

Au niveau hépatique, la plupart des gènes qui étaient différentiellement exprimés étaient associés au groupe nourri avec le régime PAP. L'étude démontre que la supplémentation en extrait de levure dans l'aliment a restauré un profil transcriptomique similaire à celui du groupe CTL, car aucun gène n'était différentiellement exprimé entre les poissons nourris avec l'aliment PAP+YE et ceux nourris avec le régime CTL (**Figure 28A, p. 216**). Ces résultats semblent être cohérents avec l'amélioration de la croissance observée chez les truites nourries avec le régime PAP+YE. Dans le foie, l'assignement des transcrits à leurs fonctions putatives a permis de mettre en évidence que très peu de transcrits étaient impliqués dans les fonctions métaboliques. En effet, seul l'expression du transcrit *znt1*, impliqué dans le transport du zinc, était modulé en réponse au régime PAP+YE comparé au groupe PAP. Bien qu'une amélioration du gain et de la rétention protéique ait été observée chez les poissons nourris avec le régime supplémentation en extrait de levure, l'analyse des transcrits semblent confirmer que la restauration de la croissance n'était pas nécessairement associée à une modulation des fonctions métaboliques, du moins au niveau hépatique, car des modifications du métabolisme musculaire ne sont pas à exclure. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que l'analyse du transcriptome a été réalisée sur des tissus prélevés 24 heures après le dernier repas. Ces résultats ne sont donc pas représentatifs des effets postprandiaux qui auraient pu être observés 6 heures après le dernier repas, en particulier au niveau du métabolisme.

Il est tout de même intéressant de noter que 9 des 14 gènes différentiellement exprimés au niveau hépatique étaient associés à des fonctions immunitaires et inflammatoires (*hpx*, *prg4*, *csgalnact2*, *α2m*, *foxa2* et *c3-3*), de protection cellulaire (*por* et *miox*) et de coagulation (*serpina10*). De plus, l'ensemble de ces gènes était induit chez les poissons nourris avec le régime PAP comparé au groupe CTL. Ces résultats suggèrent qu'un régime à base de protéines végétales et de coproduits d'origine animale est susceptible d'induire une réponse immunitaire et inflammatoire même modérée au niveau transcriptionnel dans le foie.

Sur les 28 gènes différentiellement exprimés dans l'intestin distal (**Figure 28B, p. 216**), 7 étaient associés aux fonctions immunitaires et inflammatoires (*serping1*, *apoa2*, *cd3d*, *mapkbp1*, *c15orf48*, *fut8*

et *c3*), 3 aux mécanismes de lutte contre les pathogènes (*ch25h*, *hrh1* et *mfap4*), 2 à la coagulation et à la cicatrisation (*fbg* et *cd9*) et 2 au stress du réticulum endoplasmique (*selenos* et *leg1*). Les fonctions immunitaires, inflammatoires et antipathogènes étaient particulièrement modulées dans l'intestin des poissons nourris avec le régime supplémenté en extrait de levure, suggérant que le produit a particulièrement ciblé ces fonctions au niveau de la muqueuse intestinale. La question de savoir si la modulation de ces gènes intestinaux a été bénéfique pour la santé et l'immunité des truites reste à explorer à travers un challenge pathogène, par exemple. Concernant les gènes impliqués dans la coagulation et la cicatrisation, les poissons nourris avec le régime PAP ont montré une régulation à la baisse des marqueurs de coagulation *fbg* et *cd9*, pouvant suggérer une réduction des capacités de coagulation et de cicatrisation chez ces animaux. L'ajout de 3 % d'extrait de levure semble néanmoins avoir restauré ces capacités, comme l'indique la surexpression intestinale de *fbg* chez les truites nourries avec le régime PAP+YE. De tous les gènes différentiellement exprimés, *selenos* était le gène présentant les plus grosses variations d'expression en réponse aux régimes expérimentaux. Son expression était très prononcée dans l'intestin en réponse aux aliments PAP et PAP+YE. La sélénoprotéine S est une protéine du réticulum endoplasmique qui participe à la réduction du stress oxydatif et du stress du réticulum endoplasmique. La question de savoir si les régimes à base de PAP ont induit un stress oxydant ou un stress du réticulum endoplasmique reste à étudier, car l'analyse transcriptomique n'a révélé qu'un seul autre gène différentiellement exprimé impliqué dans cette voie, à savoir *leg1*. Les 14 autres gènes n'ont pu être assignés à des voies précises ou étaient associés à des fonctions métaboliques (*aldh3a2*, *slc39a4*, *sec16b*, *kbtbd2* et *slc39a*). Concernant les gènes assignés de manière putative aux fonctions métaboliques, ceux-ci étaient plus particulièrement modulés chez les truites nourries avec l'aliment PAP+YE comparé au groupe CTL (4 gènes différentiellement exprimés). Au même titre que les fonctions immunitaires, il est difficile de conclure quant aux effets de la supplémentation en extrait de levure sur les fonctions métaboliques. Des études mécanistiques et des dosages de métabolites plasmatiques pourrait éventuellement permettre d'éclaircir les résultats obtenus.

L'analyse transcriptomique des petits ARNs non codants s'est avérée décevante et ne nous a pas permis de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des phénotypes de croissance observés. En effet, dans les conditions de l'étude, seulement 4 microARNs étaient modulés en réponse aux régimes dans le foie et aucun dans l'intestin distal (**Figure 29, p. 216**). Le miR-217-5p était sous-exprimé chez les poissons nourris avec le régime PAP+YE comparé au groupe PAP. Chez les mammifères, ce microARN est potentiellement impliqué dans la régulation des mécanismes inflammatoires (Shamran et al., 2017). Néanmoins, un microARN peut cibler une multitude de gènes et le miR-217-5p n'est pas nécessairement impliqués dans la répression de gènes inflammatoires chez la truite arc-en-ciel.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus suite aux séquençages des ARNs et des microARNs expliquent difficilement les phénotypes de croissance observés et ne permettent pas de conclure quant aux mécanismes à l'origine des bénéfices nutritionnels de la supplémentation en extrait de levure. Les retards de croissance observés chez les poissons nourris avec le régime PAP et l'amélioration significative des performances avec la supplémentation en extrait de levure n'ont pu être expliqués par la modulation des voies mises en évidence dans les analyses transcriptomiques. De plus, le peu de gènes et de microARNs différenciellement exprimés semblent principalement être associés à l'échantillonnage qui a été réalisé 24 heures après le dernier repas. Le faible nombre de transcrits mis en évidence soulève également la question du choix des tissus à analyser dans ce type d'étude. Nous restons convaincus que le choix du foie et de l'intestin était pertinent dans le cadre de cette thèse puisque le foie représente le principal carrefour métabolique, et l'intestin est à la fois impliqué dans la digestion et l'assimilation des nutriments mais aussi dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Néanmoins, il aurait peut-être été judicieux de considérer d'autres tissus notamment le muscle pour mieux comprendre les phénotypes de croissance, mais aussi les tissus lymphoïdes tels que le rein, la rate ou encore le thymus dans la mesure où la plupart des gènes différenciellement exprimés dans le foie et l'intestin présentaient un lien avec l'immunité ou la réponse inflammatoire. Leur analyse aurait potentiellement pu apporter des éléments complémentaires quant aux effets immunostimulants de la supplémentation en extrait de levure dans l'aliment. De plus, bien qu'un faible nombre de peptides potentiellement bioactifs ait été identifié, nous avons quand même mis en évidence quelques séquences dont les fonctions seraient anti-inflammatoires. Ainsi, les analyses futures conduites par Phileo by Lesaffre nous apporteront d'autres éléments d'explication concernant la modulation spécifique des gènes mis en évidence et associés aux fonctions immunitaires et inflammatoires.

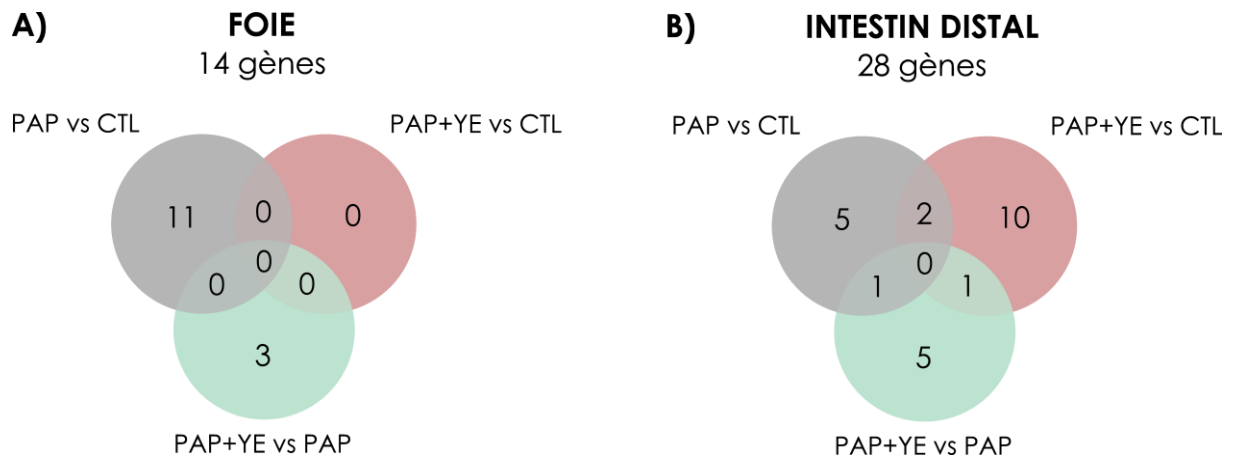


Figure 28 Diagrammes de Venn résumant les gènes différemment exprimés dans le foie (A) et dans l'intestin distal (B) suite au séquençage.

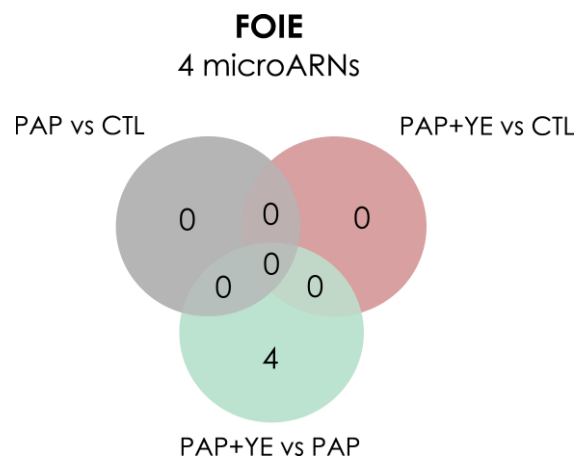


Figure 29 Diagramme de Venn résumant les microARNs différemment exprimés dans le foie suite au séquençage.

PARTIE 2

Les effets observés à long-terme résultent-ils d'une réponse précoce des truites aux aliments expérimentaux ?

Les performances des nouveaux aliments ou les avantages des additifs alimentaires sont souvent examinés sur le long terme afin d'évaluer les effets sur la croissance sans nécessairement analyser les réponses physiologiques précoces des poissons. Suite aux résultats obtenus dans l'essai de croissance, l'hypothèse qu'une réponse précoce des truites aux aliments expérimentaux pouvait être à l'origine des phénotypes observés à long terme a été proposée. Les effets précoces d'une supplémentation en extrait de levure ont donc été évalués sur des truites naïves aux aliments expérimentaux au cours d'une cinétique de 8 jours.

1. Les réponses de long terme ne résultent pas d'une réponse précoce aux aliments expérimentaux

Chez les salmonidés et particulièrement chez le saumon Atlantique, les effets de l'aliment peuvent être observés très précocement. L'hypothèse du deuxième axe de la thèse s'est donc construite autour d'une étude de Sahlmann et al. conduite sur le saumon Atlantique (Sahlmann et al., 2013). Dans cette étude, un régime à base de farine de soja a impacté la structure de l'intestin et la régulation de gènes impliqués dans l'immunité, la détoxification, la réparation cellulaire et le métabolisme, dès les premiers jours d'alimentation. Dans notre expérience, les réponses précoces aux aliments ont été déterminées à travers la quantification des marqueurs plasmatiques immunitaires et de l'évaluation de la structure de l'intestin. Nous avons également mesuré l'expression de gènes impliqués dans les fonctions immunitaires et inflammatoires, la structure de l'intestin, la coagulation et la réponse au stress. Certains de ces gènes correspondaient à ceux que nous avons mis en évidence par le séquençage à haut débit comme différentiellement exprimés dans l'essai de croissance.

Contrairement à ce qui a été observé chez les saumons, les régimes expérimentaux testés sur la truite arc-en-ciel n'ont pas présenté d'effets précoces sur la réponse immunitaire systémique ni la structure de l'intestin (**Figure 30, p. 222**). Les gènes dont l'expression avait été modifiée à long terme ainsi que les gènes cibles sélectionnés pour leur implication dans les réponses immunitaires et inflammatoires, et la structure intestinale, n'étaient pas non plus différentiellement exprimés en

réponse aux aliments à court terme. L'absence d'effets précoces pourrait être expliquée par la différence de sensibilité entre la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique, ce dernier étant plus sensible aux régimes sans farine de poissons. Dans ce cas, les résultats obtenus chez la truite suggèrent que les effets constatés à long terme sont de nature chronique plutôt qu'aigue, ce qui suggère une adaptation de long terme plutôt qu'une réaction précoce aux nouveaux aliments. Ainsi, la diminution des performances de croissance associée au régime PAP, l'amélioration de ce régime avec l'ajout d'extrait de levure et les changements dans le profil transcriptomique hépatique et intestinal n'étaient pas liés à une réaction précoce des poissons, mais davantage à une adaptation à long terme.

2. La physiologie intestinale et hépatique est davantage influencée par le jeûne de courte durée ayant précédé la réalimentation

En revanche, lors de cet essai de court terme, nous avons constaté que le jeûne de courte durée suivi d'une réalimentation avait un impact significatif sur la structure de la muqueuse intestinale ainsi que sur l'expression de gènes cibles au niveau hépatique et intestinal dont certains avaient été identifiés comme différentiellement exprimés à long terme, grâce au séquençage haut débit.

En effet, le passage de la période de jeûne à une réalimentation a entraîné une augmentation significative de la surface des villosités intestinales, une augmentation de l'expression du gène codant pour le marqueur de prolifération cellulaire *pcna* ainsi qu'une diminution significative de la densité de cellules à mucus dans la partie proximale de l'intestin. Ces résultats sont en accord avec les changements structuraux observés au niveau intestinal chez d'autres espèces de poissons en réponse à une période de jeûne. En fonction de la durée du jeûne, ces changements peuvent en effet se traduire par une atrophie du tube digestif, une diminution de la longueur et de la masse de l'intestin (Hall and Bellwood, 1995; Zhou et al., 2022), ainsi que d'une diminution de la surface (Rios et al., 2004) de la muqueuse et de la densité des cellules à mucus (Khojasteh, 2012; Zeng et al., 2012). Le jeûne est également susceptible de moduler l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion des entérocytes et par conséquent entraîner une perte de contact entre les cellules intestinales, susceptible de favoriser l'entrée de pathogènes. Dans notre étude, deux protéines de jonctions serrées étaient sous-exprimées en réponse au jeûne et leurs niveaux d'expression peinaient à augmenter en fonction de la partie de l'intestin considérée. Ceci suggère que les truites arc-en-ciel peuvent être sensibles à l'entrée d'un pathogène les jours suivants la réalimentation.

Bien qu'aucune preuve évidente d'inflammation systémique ou tissulaire n'ait été observée, le jeûne suivi d'une réalimentation s'est traduit par une modulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les fonctions inflammatoires, immunitaires, de réponse aux pathogènes, de stress cellulaire et de coagulation. Dans le foie, les expressions des gènes codant pour la molécule C3 du complément, la protéine de phase aigüe α -2-macroglobuline et la protéine PRG4 impliquée dans la stimulation des macrophages chez le rat (Laskin et al., 1991), étaient effectivement modulées en réponse au jeûne suivi d'une réalimentation. Néanmoins, dans l'intestin, la plupart des gènes mesurés et associés aux fonctions immunitaires et inflammatoires n'étaient pas exprimés ou trop faiblement exprimés pour être exploités. Nous avons cependant enregistré une expression élevée de *ch25h* en lien avec le jeûne dans l'intestin distal. Ce gène code pour une protéine qui participe à la production de 25 hydroxy-cholestérol, une molécule impliquée dans les pathologies virales et dont les effets peuvent être à la fois proinflammatoires et anti-inflammatoires (Zhao et al., 2020). La surexpression de ce gène après 4 jours de jeûne, ne semble pas liée à la mise en place d'une réponse inflammatoire comme le confirment les analyses histologiques et l'absence d'induction par le jeûne de l'expression des cytokines *il-1 β* et *il-6*. En revanche, le jeûne s'accompagne d'une sous-expression d'*il-1 β* dans l'intestin distal ce qui laisserait supposer un effet anti-inflammatoire lié à la surexpression du gène *ch25h* dans ce tissu. En effet, des études démontrent que le 25 hydroxy-cholestérol inhiberait la production d'*il-1 β* et l'activité de l'inflammasome (Reboldi et al., 2014; Simon, 2014). Un jeûne de courte durée pourrait donc sur certains aspects, limiter les réactions inflammatoires, d'où sa pratique courante en élevage en cas d'épisode infectieux. Bien que *cd9* ait été influencé par le jeûne, les expressions de la *serpina10* et de *fbg* étaient trop faibles pour être analysées, suggérant une influence modérée du jeûne sur les fonctions de coagulation.

Le jeûne de courte durée pourrait en revanche avoir des effets négatifs sur les capacités de protection des poissons contre le stress cellulaire et en particulier le stress du réticulum endoplasmique. En effet, la sélénoprotéine S qui participe à l'élimination des protéines défectueuses du réticulum endoplasmique (RE) et dont l'expression était fortement régulée par les régimes alimentaires dans l'essai de croissance, a aussi été influencée par le passage du jeûne à la réalimentation. En effet, son expression est fortement réprimée chez les poissons à jeun, ce qui suggère l'initiation d'un stress du réticulum endoplasmique par le jeûne de courte durée ou la perte des capacités de lutte contre ce stress. La surexpression du gène *miox* chez les poissons à jeun renforce cette hypothèse. Il a été démontré qu'une surexpression de ce gène favorise la production de ROS et par conséquent le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique (Tominaga et al., 2019).

De manière générale, ces résultats indiquent que l'application d'un jeûne court a des conséquences sur la régulation de gènes impliqués dans les fonctions immunitaires, inflammatoires, antipathogènes, de réponses au stress cellulaire et de coagulation. De plus, la réalimentation semble rétablir ces mécanismes de façon plus ou moins rapide. Ceci est globalement en accord avec d'autres études même si la plupart d'entre elles reposaient sur un jeûne de plusieurs semaines donc plus long, et affectaient plus drastiquement les fonctions étudiées dans le cadre de notre étude.

Chez les poissons, les périodes de jeûne influencent également les paramètres plasmatiques de l'immunité. Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas mis en évidence d'impact du jeûne sur l'activité du lysozyme, de l'antiprotéase, de la peroxydase et de la voie alternative du complément au niveau plasmatique. Les effets du jeûne sur la réponse immunitaire plasmatique varient en fonction de la durée de la privation alimentaire, du marqueur considéré et de l'espèce étudiée. Dans notre essai, l'absence d'effet sur les marqueurs immunitaires plasmatiques en réponse à la période de jeûne suggère que la durée de la privation alimentaire était potentiellement trop courte pour induire une réponse immunitaire sérique chez la truite arc-en-ciel. Ces résultats sont rassurants quant à l'application de période courte de jeûne dans un contexte d'élevage. En accord avec l'impact modéré du jeûne sur l'expression de gènes impliqués dans l'immunité et l'inflammation, nos résultats laissent à penser que l'application d'un jeûne court de 4 jours n'est pas susceptible d'altérer les défenses immunitaires plasmatiques chez la truite arc-en-ciel. Au-delà, les fonctions immunitaires plasmatiques pourraient néanmoins être sévèrement altérées comme généralement observé chez la plupart des espèces aquacoles qui présentent une répression des fonctions immunitaires plasmatiques à partir de quelques jours de privation alimentaire (Eslamloo et al., 2017; Li et al., 2019). En élevage, le jeûne est couramment appliqué pour prévenir les pathologies et permet d'améliorer la survie des poissons. Dans ce contexte, il est donc important de veiller à ne pas appliquer de périodes de jeûne trop longues pour ne pas induire d'immunosuppression. A l'inverse, il est judicieux d'appliquer un jeûne si les poissons subissent une attaque pathogène. En effet, la privation alimentaire permet d'une part, de réorienter l'énergie utilisée dans la digestion au profit des fonctions immunitaires et d'autre part, de limiter la disponibilité en nutriments nécessaire à la croissance et à la survie des pathogènes.

Globalement, les résultats obtenus au cours de cette expérience de court terme montrent que le jeûne, même de courte durée, a des conséquences importantes sur la physiologie hépatique et intestinale de la truite (**Figure 30, p. 222**). En termes de réponse transcriptomique, ces effets restent variables et concernent aussi bien les fonctions inflammatoires, structurelles, antioxydantes que la réponse au stress du réticulum endoplasmique. En termes de conséquences sur la structure de la muqueuse intestinale, l'augmentation de la taille des villosités suite à la réalimentation semble être

bénéfique pour la réabsorption des nutriments mais la réponse tardive des protéines de jonctions serrées en réponse à la réalimentation peut sensibiliser les truites à l'entrée de pathogènes.

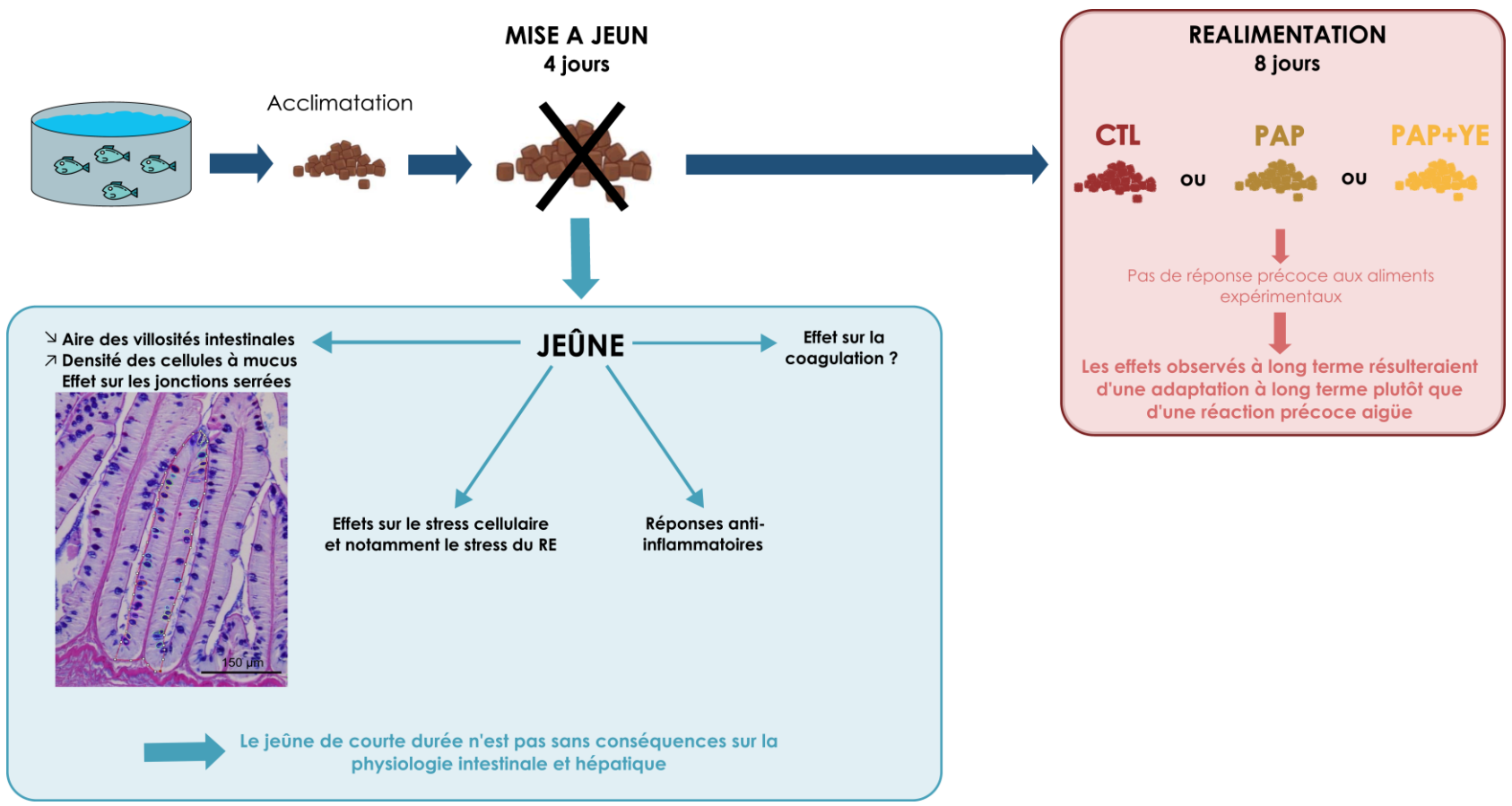


Figure 30 Résumé schématique des conséquences d'un jeûne court suivi d'une réalimentation.

PARTIE 3

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse a permis de montrer que la supplémentation en extrait de levure améliorait la valeur nutritionnelle et l'efficacité d'un régime sans farine de poissons composé de protéines végétales et de coproduits animaux. D'un point de vue zootechnique, l'amélioration des performances de croissance observée chez les truites nourries avec le régime PAP+YE n'a pu être corrélée avec la digestibilité et la consommation des aliments expérimentaux mais pourrait être liée à l'efficacité alimentaire et l'utilisation métabolique des nutriments, en particulier des protéines. En effet, les bénéfices de la supplémentation en extrait de levure sur la croissance sont associés à une augmentation de la surface d'absorption des nutriments au niveau intestinal traduite par une augmentation de la taille des villosités, mais également à une amélioration de l'utilisation de la fraction protéique de l'aliment se traduisant par un gain et une rétention protéiques plus élevés par rapport aux truites nourries avec le régime PAP.

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces phénotypes ont été recherchés dans deux tissus clés de la physiologie de la nutrition, l'intestin et le foie.

- ❖ Sur la base des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, il aurait été pertinent d'**inclure le muscle dans notre étude** pour mieux comprendre l'origine des variations de rétention protéique entre les régimes expérimentaux.

L'essai de long terme a également permis de mettre en évidence que la supplémentation en extrait de levure modulait l'immunité adaptative au niveau sérique ainsi que l'expression de gènes impliqués dans les fonctions immunitaires et inflammatoires, les mécanismes de protection cellulaire, les défenses contre les pathogènes ainsi que les fonctions de coagulation et de cicatrisation. Dans l'ensemble, ces réponses n'ont pu expliquer la baisse de croissance observée chez les truites nourries avec le régime PAP ni l'amélioration des performances lors de l'ajout de 3 % de l'extrait de levure dans le régime à base de protéines végétales et de coproduits animaux. Toutefois, il semble que cette supplémentation ait un effet bénéfique sur la robustesse de la truite, ce qui pourrait *in fine* favoriser la croissance. Cependant, il reste à prouver l'hypothèse d'un effet positif de l'extrait de levure sur la robustesse de la truite.

- ❖ Pour cela, il serait pertinent de **mettre en place un challenge pathogène à l'issue d'une période d'alimentation**, afin de mesurer l'impact des régimes et de la supplémentation en extrait de levure sur la survie de la truite mais également sur la réponse immunitaire. Le **challenge infectieux** pourrait être **bactérien ou viral**. *Flavobacterium psychrophilum*, une bactérie pathogène pour les salmonidés et responsable de la flavobactériose d'eau froide, s'affiche comme un excellent candidat pour une infection bactérienne. En effet, chez la truite arc-en-ciel, cette bactérie provoque une septicémie hémorragique chez les alevins et peut conduire à des taux de mortalités allant jusqu'à 70 % ainsi que des pertes économiques considérables pour un éleveur. Pour l'infection virale, nous pourrions choisir le virus de la septicémie hémorragique virale SHV (ou VHS en anglais, pour « *Viral Hemorrhagic Septicemia* ») qui représente une autre cause majeure de la mortalité de la truite arc-en-ciel dans les élevages. Ces infections seraient réalisables au sein de l'IERP, l'unité expérimentale d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et des Poissons d'INRAE à Jouy en Josas.

Initialement, la supplémentation en extrait de levure de 3 % a été choisie car cette dose avait déjà été montrée bénéfique pour les performances de croissance, la digestibilité et la santé de crevettes dans un essai conduit par Phileo by Lesaffre. En nutrition aquacole, il est conseillé d'introduire les additifs fonctionnels en de petites quantités (< 10 % de l'aliment en fonction du produit) pour éviter de surstimuler les fonctions immunitaires et de réprimer la croissance des animaux. L'utilisation de petites quantités d'additifs fonctionnels est également liée au caractère onéreux de ces produits. Dans le cadre de la mise en place d'aliments alternatifs en aquaculture, il est donc primordial de considérer l'aspect économique des nouveaux régimes puisque ces paramètres concernent directement les éleveurs. En 2020, le prix des matières premières et de l'extrait de levure utilisés dans la formulation des aliments expérimentaux permettait de produire un aliment dont le coût de production ne dépassait pas celui d'un aliment de type commercial (0,85 €/kg d'aliment pour le régime CTL et PAP+YE). Toutefois, l'aliment PAP+YE ne permettait pas d'atteindre les performances observées pour le régime classique à base de farines et d'huile de poisson.

- ❖ Dans le cadre de l'utilisation de l'aliment PAP+YE par une entreprise aquacole, il aurait donc également été intéressant **d'interroger les pisciculteurs** quant à la faisabilité d'utiliser un aliment composé de coproduits animaux en termes d'**acceptabilité par le consommateur**. En effet, l'acceptabilité sociale est également à prendre en compte puisque l'utilisation de coproduits d'origine animale est aujourd'hui encore controversée en Europe.

- ❖ Sachant que les régimes à base de nouveaux ingrédients peuvent affecter la qualité nutritionnelle et gustative de la chair des poissons (Brinker and Reiter, 2011; De Francesco et al., 2007; Valente et al., 2016), il aurait été également intéressant de réaliser une **étude sensorielle** sur les truites nourries avec l'aliment PAP+YE.
- ❖ Il aurait aussi été pertinent d'interroger les pisciculteurs quant à la **viabilité économique** de l'utilisation de ce type d'aliment, puisque les différences de croissance obtenues reposent sur des analyses statistiques et ne reflètent pas nécessairement la réalité industrielle.

Si les levures sont utilisées en tant qu'additifs fonctionnels pour stimuler la robustesse de la truite, alors une alimentation précoce de courte durée pourrait être suffisante. La supplémentation alimentaire en extrait de levure aurait alors un impact économique moindre. L'idée sous-jacente à cette alimentation précoce est de stimuler les défenses immunitaires innées de la truite et plus précisément l'immunité entraînée. Il s'agit d'un mécanisme physiologique qui permet au système immunitaire inné, à la suite d'une première stimulation, de développer une réponse accrue, plus rapide et potentiellement plus efficace lors d'une infection pathogène ultérieure. A la différence de l'immunité adaptative, dont la mémoire repose sur la reconnaissance d'antigènes par des anticorps spécifiques, l'immunité entraînée s'appuie sur une augmentation des capacités des cellules immunitaires innées comme les macrophages et les cellules NK (pour Natural Killer en anglais). Cette augmentation des capacités immunitaires repose sur une reprogrammation épigénétique associée à des modifications métaboliques (méthylation de l'ADN). L'immunité entraînée peut être induite par différents stimulus : des β -glucanes, des lipopolysaccharides (LPS) ou des vaccins (Netea et al., 2020). De par leur richesse en polysaccharides, les levures s'affichent comme des candidats prometteurs pour induire l'immunité entraînée par voie alimentaire (Cortes-Perez et al., 2021). L'immunité entraînée est moins étudiée chez les poissons que chez les mammifères mais des études suggèrent son existence chez les poissons, dont la carpe (Petit et al., 2019).

- ❖ Dans ce contexte, il serait donc intéressant d'explorer la **possibilité d'induire une immunité entraînée** chez les alevins de truite par programmation précoce lors des premiers repas. Une telle pratique pourrait améliorer sa robustesse et sa résistance aux agents pathogènes comme cela a déjà été montré avec l'administration de β -glucanes chez les larves de poissons (Zhang et al., 2019).
- ❖ Un **aliment supplémenté** en extrait de levure pourrait aussi être **utilisé ponctuellement** au cours du cycle de production de la truite afin de stimuler le système immunitaire en prévision ou au cours d'épizooties (Petit et al., 2007).

Ces travaux de thèse ont également confirmé que les effets observés à long terme n'étaient pas liés à une réponse précoce des truites aux aliments expérimentaux, mais plutôt à une adaptation de long terme. Bien qu'un faible nombre de séquences bioactives ait été identifié dans l'extrait de levure, nous ne pouvons aujourd'hui pas exclure les potentiels implications des peptides contenus dans le produit sur les phénotypes observés. La méthode d'identification des peptides bioactifs mise en place n'était pas totalement développée mais les résultats obtenus nous ont permis d'affiner les techniques de recherche qui seront appliquées par Phileo by Lesaffre dans l'extrait de levure utilisé dans le cadre de cette thèse, mais également sur d'autres produits commercialisés par l'entreprise.

- ❖ Une fois que les **peptides bioactifs** seront identifiés, nous pourrions envisager de les extraire de l'extrait de levure ou de les synthétiser, puis tester certains d'entre eux en **culture cellulaire** sur la lignée d'entérocytes RTGUT-GC et évaluer leurs effets sur la prolifération cellulaire.
- ❖ Nous pourrions également incorporer ces peptides dans des aliments expérimentaux et tester leurs effets sur la croissance de truites au cours d'un **essai *in vivo***. Au terme de cet essai, il serait pertinent d'estimer les effets des peptides sur la **myogenèse** par le biais de techniques histologiques, par exemple, ou encore d'évaluer les effets des peptides sur la **réponse transcriptomique du muscle**.

La cinétique de court terme a montré que le jeûne n'était pas sans conséquences sur la physiologie intestinale et hépatique alors qu'il est régulièrement pratiqué en élevage en prévision d'une manipulation, d'un transport ou d'un traitement médicamenteux. Les résultats que nous avons obtenus laissent entrevoir des effets très variables, à la fois bénéfiques ou préjudiciables, d'un jeûne de courte durée chez la truite arc-en-ciel.

- ❖ Une exploration plus approfondie de ce type de jeûne court sur la physiologie de la truite, les **performances de production** mais aussi le **comportement**, serait pertinente dans un contexte d'élevage de plus en plus fluctuant et stressant.
- ❖ Cette étude de court-terme ouvre aussi des perspectives sur l'utilité d'identifier les mécanismes physiologiques régulés par la privation alimentaire chez la truite arc-en-ciel. A l'issue d'une période de jeûne plus ou moins longue, il serait par exemple pertinent de réaliser un **séquençage des ARNs** de tissus impliqués dans les réponses immunitaires dans l'optique de **mettre en évidence d'autres voies potentiellement influencées par le jeûne**.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aas, T.S., Åsgård, T., Ytrestøyl, T., 2022. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2020. *Aquaculture Reports* 26, 101316. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101316>
- Aas, T.S., Ytrestøyl, T., Åsgård, T., 2019. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports* 15, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100216>
- Abdel-Warith, A.A., Russell, P.M., Davies, S.J., 2001. Inclusion of a commercial poultry by-product meal as a protein replacement of fish meal in practical diets for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Research* 32, 296–305. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00053.x>
- Abós, B., Bailey, C., Tafalla, C., 2022. Adaptive Immunity, in: Buchmann, K., Secombes, C.J. (Eds.), *Principles of Fish Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 105–140. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1_3
- Abu-Elala, N.M., Younis, N.A., AbuBakr, H.O., Ragaa, N.M., Borges, L.L., Bonato, M.A., 2018. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 44, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.11.001>
- Agboola, J.O., Øverland, M., Skrede, A., Hansen, J.Ø., 2021. Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. *Reviews in Aquaculture* 13, 949–970. <https://doi.org/10.1111/raq.12507>
- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26, 499–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology* 37, 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H., Zhang, L., 2006. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 260, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.043>
- Alagawany, M., Farag, M.R., Abdelnour, S.A., Elnesr, S.S., 2021. A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Reviews in Aquaculture* 13, 632–641. <https://doi.org/10.1111/raq.12490>
- Alejo, A., Tafalla, C., 2011. Chemokines in teleost fish species. *Developmental & Comparative Immunology, Special issue on Teleost Fish Immunology* 35, 1215–1222. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.011>
- Alfred, O., 2020. *Fish Nutrition: Plant Source as an Alternative*.
- Alim, A., Song, H., Zou, T., 2020. Analysis of meaty aroma and umami taste in thermally treated yeast extract by means of sensory-guided screening. *Eur Food Res Technol* 246, 2119–2133. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03561-5>
- Amani Denj, K., Razeghi Ma, M., Akrami, R., Ghobadi, Sh., Jafarpour, S.A., Mirbeygi, S.K., 2015. Effect of Dietary Prebiotic Mannan Oligosaccharide (MOS) on Growth Performance, Intestinal Microflora, Body Composition, Haematological and Blood Serum Biochemical Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Juveniles. *J. of Fisheries and Aquatic Science* 10, 255–265. <https://doi.org/10.3923/jfas.2015.255.265>

- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B., Li, H., 2020. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions. : a review. *Aquacult Int* 28, 1017–1041. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>
- Andersen, S., Waagbø, R., Espe, M., 2015. Functional amino acids in fish nutrition, health and welfare. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 8, 143–169.
- Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S., 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research* 41, 61–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02304.x>
- Ansari, F.A., Guldhe, A., Gupta, S.K., Rawat, I., Bux, F., 2021. Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environ Sci Pollut Res* 28, 43234–43257. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14989-x>
- Anses, 2013. Que sont les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST)? [WWW Document]. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. URL <https://www.anses.fr/fr/content/que-sont-les-enc%C3%A9phalopathies-spongiformes-transmissibles-est> (accessed 3.18.23).
- Aragão, C., Gonçalves, A.T., Costas, B., Azeredo, R., Xavier, M.J., Engrola, S., 2022. Alternative Proteins for Fish Diets: Implications beyond Growth. *Animals* 12, 1211. <https://doi.org/10.3390/ani12091211>
- Ayadi, F.Y., Rosentrater, K.A., Muthukumar, K., 2012. Alternative Protein Sources for Aquaculture Feeds. *J. of Aquaculture Feed Science and Nutrition* 4, 1–26. <https://doi.org/10.3923/joafsnu.2012.1.26>
- Baeverfjord, G., Krogdahl, A., 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases* 19, 375–387. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1996.d01-92.x>
- Bakke, A.M., Glover, C., Krogdahl, Å., 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients, in: *Fish Physiology*. Elsevier, pp. 57–110. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03002-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03002-5)
- Baldo, B.A., Fletcher, T.C., 1973. C-reactive Protein-like Precipitins in Plaice. *Nature* 246, 145–146. <https://doi.org/10.1038/246145a0>
- Bandara, T., 2018. Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES* 6, 3087.
- Bar, N., 2014. Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71, 1447–1458. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0175>
- Barnett, J.A., Barnett, L., 2011. *Yeast research: a historical overview*. ASM Press, Washington, DC.
- Baumgarner, B.L., Bharadwaj, A.S., Inerowicz, D., Goodman, A.S., Brown, P.B., 2013. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal epithelia: Physiological acclimation to short-term starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 8, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2012.11.001>
- Bayne, C.J., Gerwick, L., 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 725–743. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00033-7)
- Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., 2006. Production of Food Grade Yeasts. *Food Technology & Biotechnology* 44, 407–415.
- Bell, J.G., Dick, J.R., McVicar, A.H., Sargent, J.R., Thompson, K.D., 1993. 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, 665–673. [https://doi.org/10.1016/0952-3278\(93\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0952-3278(93)90075-8)
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J.-M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G.H., Boussaha, M., Quillet, E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volff, J.-N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Crollius, H.R., Guiguen, Y., 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Berto, R. da S., Pereira, G. do V., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., Fracalossi, D.M., 2016. Yeast extract on growth, nutrient utilization and haemato-immunological responses of Nile tilapia. *Aquaculture Research* 47, 2650–2660. <https://doi.org/10.1111/are.12715>
- Bharadwaj, A.S., Brignon, W.R., Gould, N.L., Brown, P.B., Wu, Y.V., 2002. Evaluation of Meat and Bone Meal in Practical Diets Fed to Juvenile Hybrid Striped Bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33, 448–457. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00024.x>
- Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kono, T., Shimokawa, H., Itami, T., Sakai, M., 2012. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* 366–367, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.001>
- Bizuayehu, T.T., Babiak, I., 2014. MicroRNA in Teleost Fish. *Genome Biology and Evolution* 6, 1911–1937. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu151>
- Bjerkås, E., Sveier, H., 2004. The influence of nutritional and environmental factors on osmoregulation and cataracts in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture* 235, 101–122. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.005>
- Bjørngen, H., Li, Y., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Koppang, E.O., 2020. Anatomy, immunology, digestive physiology and microbiota of the salmonid intestine: Knowns and unknowns under the impact of an expanding industrialized production. *Fish & Shellfish Immunology* 107, 172–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.032>
- Black, D., Skinner, E.R., 1986. Features of the lipid transport system of fish as demonstrated by studies on starvation in the rainbow trout. *J Comp Physiol B* 156, 497–502. <https://doi.org/10.1007/BF00691035>
- Boltana, S., Boshra, H., Tort, L., 2013. Immune system and immune responses in rainbow trout. *Trout: From Physiology to Conservation* 371–411.
- Bonaldo, A., Di Marco, P., Petochi, T., Marino, G., Parma, L., Fontanillas, R., Koppe, W., Mongile, F., Finioia, M. g., Gatta, P. p., 2015. Feeding turbot juveniles *Psetta maxima* L. with increasing dietary plant protein levels affects growth performance and fish welfare. *Aquaculture Nutrition* 21, 401–413. <https://doi.org/10.1111/anu.12170>
- Bonaldo, A., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Badiani, A., Gatta, P.P., 2011. Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (*Psetta maxima*) juveniles. *Aquaculture* 318, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.003>
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology, Reviews in Fish Immunology* 20, 239–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.04.004>
- Bourdon, D., Aumaître, A., 1990. Low-glucosinolate rapeseeds and rapeseed meals: effect of technological treatments on chemical composition, digestible energy content and feeding value

- for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 30, 175–191. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(90\)90014-Y](https://doi.org/10.1016/0377-8401(90)90014-Y)
- Bowden, T.J., 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>
- Bratosin, B.C., Darjan, S., Vodnar, D.C., 2021. Single Cell Protein: A Potential Substitute in Human and Animal Nutrition. *Sustainability* 13, 9284. <https://doi.org/10.3390/su13169284>
- Brawand, D., Wagner, C.E., Li, Y.I., Malinsky, M., Keller, I., Fan, S., Simakov, O., Ng, A.Y., Lim, Z.W., Bezault, E., Turner-Maier, J., Johnson, J., Alcazar, R., Noh, H.J., Russell, P., Aken, B., Alföldi, J., Amemiya, C., Azzouzi, N., Baroiller, J.-F., Barloy-Hubler, F., Berlin, A., Bloomquist, R., Carleton, K.L., Conte, M.A., D’Cotta, H., Eshel, O., Gaffney, L., Galibert, F., Gante, H.F., Gnerre, S., Greuter, L., Guyon, R., Haddad, N.S., Haerty, W., Harris, R.M., Hofmann, H.A., Hourlier, T., Hulata, G., Jaffe, D.B., Lara, M., Lee, A.P., MacCallum, I., Mwaiko, S., Nikaido, M., Nishihara, H., Ozouf-Costaz, C., Penman, D.J., Przybylski, D., Rakotomanga, M., Renn, S.C.P., Ribeiro, F.J., Ron, M., Salzburger, W., Sanchez-Pulido, L., Santos, M.E., Searle, S., Sharpe, T., Swofford, R., Tan, F.J., Williams, L., Young, S., Yin, S., Okada, N., Kocher, T.D., Miska, E.A., Lander, E.S., Venkatesh, B., Fernald, R.D., Meyer, A., Ponting, C.P., Streelman, J.T., Lindblad-Toh, K., Seehausen, O., Di Palma, F., 2014. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* 513, 375–381. <https://doi.org/10.1038/nature13726>
- Breves, J.P., Popp, E.E., Rothenberg, E.F., Rosenstein, C.W., Maffett, K.M., Guertin, R.R., 2020. Osmoregulatory actions of prolactin in the gastrointestinal tract of fishes. *General and Comparative Endocrinology* 298, 113589. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2020.113589>
- Brinker, A., Reiter, R., 2011. Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed, Part I: Effects on feed utilization and fish quality. *Aquaculture* 310, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.041>
- Buchmann, K., Secombes, C.J. (Eds.), 2022. *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1>
- Bucke, D., 1971. The anatomy and histology of the alimentary tract of the carnivorous fish the pike *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology* 3, 421–431. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1971.tb05914.x>
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M., 2001. Effects of Elevated Dietary Arginine on Resistance of Channel Catfish to Exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 194–201. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2001\)013<0194:EOEDAO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2001)013<0194:EOEDAO>2.0.CO;2)
- Burdick Sanchez, N.C., Broadway, P.R., Carroll, J.A., 2021. Influence of Yeast Products on Modulating Metabolism and Immunity in Cattle and Swine. *Animals* 11, 371. <https://doi.org/10.3390/ani11020371>
- Bureau, D., 2006. Rendered products in fish aquaculture feeds. *Essential Rendering: All About the Animal By-products Industry*.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 180, 345–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00210-0)
- Burel, C., Boujard, T., Corraze, G., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Mol, K.A., Van Der Geyten, S., Kühn, E.R., 1998. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture* 163, 325–345. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00241-5)

- Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Geyten, S. van D., Mol, K.A., Kühn, E.R., Quinsac, A., Krouti, M., Ribailier, D., 2000. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*) : growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 188, 363.
- Burel, C., Kaushik, S., 2008. Use of rapeseed/canola in diets of aquaculture species. pp. 343–408. https://doi.org/10.1300/5892_13
- Burrells, C., Williams, P.D., Forno, P., 2001a. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 1. Effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture* 199, 159–169. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00577-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00577-4)
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Wadsworth, S.L., 2001b. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 199, 171–184. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00576-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00576-2)
- Burridge, P.W., Woods, R.A., Henderson, J.F., 1976. Utilization of dietary nucleic acid purines for nucleotide and nucleic acid synthesis in the mouse. *Can. J. Biochem.* 54, 500–506. <https://doi.org/10.1139/o76-072>
- Byrd, K.A., Thilsted, S.H., Fiorella, K.J., 2021. Fish nutrient composition: a review of global data from poorly assessed inland and marine species. *Public Health Nutrition* 24, 476–486. <https://doi.org/10.1017/S1368980020003857>
- Cabral, E.M., Fernandes, T.J.R., Campos, S.D., Castro-Cunha, M., Oliveira, M.B.P.P., Cunha, L.M., Valente, L.M.P., 2013. Replacement of fish meal by plant protein sources up to 75% induces good growth performance without affecting flesh quality in on-growing Senegalese sole. *Aquaculture* 380–383, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.006>
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 3rd Fish and Shellfish Larviculture Symposium 227, 245–258. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Cain, K., Swan, C., 2010. Barrier function and immunology, in: *Fish Physiology*. Elsevier, pp. 111–134. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03003-7](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03003-7)
- Campos, I., Matos, E., Valente, L.M.P., 2019. Ability of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) to digest rendered animal fats from fish, poultry and mammals. *Aquaculture Nutrition* 25, 729–736. <https://doi.org/10.1111/anu.12902>
- Campos, I., Pinheiro Valente, L.M., Matos, E., Marques, P., Freire, F., 2020. Life-cycle assessment of animal feed ingredients: Poultry fat, poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal. *Journal of Cleaner Production* 252, 119845. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119845>
- Cao, J., Xu, H., Yu, Y., Xu, Z., 2023. Regulatory roles of cytokines in T and B lymphocytes-mediated immunity in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 144, 104621. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104621>
- Caruso, G., Denaro, M.G., Caruso, R., Mancari, F., Genovese, L., Maricchiolo, G., 2011. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Marine Environmental Research* 72, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.04.005>
- Caruso, G., Maricchiolo, G., Micale, V., Genovese, L., Caruso, R., Denaro, M.G., 2010. Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. *Fish Physiol Biochem* 36, 71–83. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9290-6>

- Carver, J.D., 1994. Dietary Nucleotides: Cellular Immune, Intestinal and Hepatic System Effects. *The Journal of Nutrition* 124, 144S-148S. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_1.144S
- Castro, R., Zarra, I., Lamas, J., 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture* 229, 67–78. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00401-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00401-0)
- Chakraborty, P., Mallik, A., Sarang, N., Lingam, S., 2019. A review on alternative plant protein sources available for future sustainable aqua feed production 1399–1404.
- Chang, C.-S., Huang, S.-L., Chen, S., Chen, S.-N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 35, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.004>
- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* 1, 3–9. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>
- Chauhan, A., Singh, R., 2019. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis* 77, 99–113. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0580-1>
- Chen, H., Luo, D., 2023. Application of haematology parameters for health management in fish farms. *Reviews in Aquaculture* 15, 704–737. <https://doi.org/10.1111/raq.12753>
- Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin, D.M., 2011. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish Shellfish Immunol* 30, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.019>
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Usry, J.L., 2003. Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. *Aquaculture* 218, 553–565. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00502-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00502-1)
- Cho, J.H., Kim, I.H., 2011. Fish meal – nutritive value. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95, 685–692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Choubert, G., De la Noüe, J., Luquet, P., 1982. Digestibility in fish: Improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture* 29, 185–189. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90048-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90048-5)
- Coll, M., Libralato, S., Pitcher, T.J., Solidoro, C., Tudela, S., 2013. Sustainability implications of honouring the Code of Conduct for Responsible Fisheries. *Global Environmental Change* 23, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.10.017>
- Collins, S.A., Øverland, M., Skrede, A., Drew, M.D., 2013. Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture* 400–401, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.006>
- Cortes-Perez, N.G., de Moreno de LeBlanc, A., Gomez-Gutierrez, J.G., LeBlanc, J.G., Bermúdez-Humarán, L.G., 2021. Probiotics and Trained Immunity. *Biomolecules* 11, 1402. <https://doi.org/10.3390/biom11101402>
- Couto, A., Peres, H., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2016. Screening of nutrient digestibility, glycaemic response and gut morphology alterations in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed whole cereal meals. *Aquaculture* 450, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.006>
- Craig, S., Helfrich, L., 2002. *Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding*. Virginia Cooperation Extension.

- Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., Newsholme, P., 2018. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients* 10, 1564. <https://doi.org/10.3390/nu10111564>
- Dabrowski, K., Hassard, S., Quinn, J., Pitcher, T., Flinn, A., 1980. Effect of Geotrichum-Candidum Protein Substitution in Pelleted Fish Feed on the Growth of Rainbow-Trout (*salmo-Gairdneri* Rich) and on Utilization of the Diet. *Aquaculture* 21, 213–232. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90132-5)
- Dalla Valle, A.Z., Iriti, M., Faoro, F., Berti, C., Ciappellano, S., 2008. In vivo prion protein intestinal uptake in fish. *APMIS* 116, 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.00863.x>
- Dalmo, R.A., Børgwald, J., 2022. Innate Immunity, in: Buchmann, K., Secombes, C.J. (Eds.), *Principles of Fish Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 31–103. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1_2
- Damsgard, B., Sorum, U., Ugelstad, I., Eliassen, R.A., Mortensen, A., 2004. Effects of feeding regime on susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to cold water vibriosis. *Aquaculture* 239, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.037>
- Dancey, C., Attree, E., Brown, K., 2006. Nucleotide supplementation: a randomised double-blind placebo controlled trial of IntestAidIB in people with Irritable Bowel Syndrome [ISRCTN67764449]. *Nutr J* 5, 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-5-16>
- Dang, Y., Sun, Y., Zhou, Y., Men, X., Wang, B., Li, B., Ren, Y., 2022. Effects of probiotics on growth, the toll-like receptor mediated immune response and susceptibility to *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 561, 738668. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738668>
- Daniel, N., 2018. A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*.
- Davey, G.C., Caldach-Giner, J.A., Houeix, B., Talbot, A., Sitjà-Bobadilla, A., Prunet, P., Pérez-Sánchez, J., Cairns, M.T., 2011. Molecular profiling of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) response to chronic exposure to the myxosporean parasite *Enteromyxum leei*. *Molecular Immunology* 48, 2102–2112. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.07.003>
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Esteban, M.Á., 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Rev Aquacult* 10, 950–974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- De Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., GÓMEZ-RÉQUENI, P., Médale, F., Kaushik, S. j., Mecatti, M., Poli, B. m., 2007. Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. *Aquaculture Nutrition* 13, 361–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00485.x>
- Debnath, S., Roy, S., Saikia, S., 2021. Absorption of Macronutrients in Teleost. pp. 62–68. <https://doi.org/10.9734/bpi/castr/v6/2461F>
- Debnath, S., Saikia, S.K., 2021. Absorption of protein in teleosts: a review. *Fish Physiol Biochem* 47, 313–326. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00913-6>
- Desai, A.R., Links, M.G., Collins, S.A., Mansfield, G.S., Drew, M.D., Van Kessel, A.G., Hill, J.E., 2012. Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350–353, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.005>
- Dhull, S., Kidwai, M., Noor, R., Chawla, P., Rose, P., 2021. A review of nutritional profile and processing of faba bean (*Vicia faba* L.). *Legume Science* 4. <https://doi.org/10.1002/leg3.129>
- Di Luzio, N.R., 1985. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin Immunopathol* 8, 387–400. <https://doi.org/10.1007/BF01857392>

- Drew, M.D., Borgeson, T.L., Thiessen, D.L., 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Animal Feed Science and Technology, Nutrition Technologies in Animal Feed Science and Technology* 138, 118–136. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.019>
- El-Haroun, E.R., Bureau, D.P., 2007. Comparison of the bioavailability of lysine in blood meals of various origins to that of l-lysine HCL for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 262, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.032>
- El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A.O., Dhama, K., Abdel-Latif, H.M.R., 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology* 117, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>
- Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Esteban, M.A., Ringø, E., 2021. Herbal Immunomodulators in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 29, 33–57. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1779651>
- Encarnaç o, P., 2016. 5 - Functional feed additives in aquaculture feeds, in: Nates, S.F. (Ed.), *Aquafeed Formulation*. Academic Press, San Diego, pp. 217–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1>
- Eslamloo, K., Morshedi, V., Azodi, M., Akhavan, S.R., 2017. Effect of starvation on some immunological and biochemical parameters in tinfoil barb (*Barbonymus schwanenfeldii*). *Journal of Applied Animal Research* 45, 173–178. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1124329>
- Espe, M., Lemme, A., Petri, A., El-Mowafi, A., 2006. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture* 255, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.030>
- Espe, M., Rathore, R.M., Du, Z.-Y., Liaset, B., El-Mowafi, A., 2010. Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18:1 to 18:0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Amino Acids* 39, 449–460. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0461-2>
- Esteban, M. ., Espinosa-Ruíz, C., Albaladejo-Riad, N., 2020. Feed Deprivation effects on Bactericidal and Immunological activity of Blood and skin mucus, and on blood Chemistry of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3906149>
- FAO, 2022a. FishStatJ [WWW Document]. In: Division des pêches et de l’aquaculture de la FAO [en ligne]. URL www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/fr
- FAO, 2022b. Résumé de L’ tat de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde. FAO; IFAD; WHO; WFP; UNICEF; <https://doi.org/10.4060/cc0640fr>
- FAO, 2022c. La situation mondiale des pêches et de l’aquaculture 2022. Vers une transformation bleue. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461fr>
- Fekadu Gemedo, H., 2014. Antinutritional Factors in Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. *IJNFS* 3, 284. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140304.18>
- Feng, G., Shi, X., Huang, X., Zhuang, P., 2011. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses after Long-term Fasting in Blood of Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Procedia Environmental Sciences, 2011 International Conference on Environment Science and Biotechnology (ICESB 2011)* 8, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.074>
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.
- Fornshell, G., 2002. Rainbow Trout — Challenges and Solutions. *Reviews in Fisheries Science* 10, 545–557. <https://doi.org/10.1080/20026491051785>

- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 88, 587–605. <https://doi.org/10.1079/BJN2002725>
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Froehlich, H.E., Jacobsen, N.S., Essington, T.E., Clavelle, T., Halpern, B.S., 2018. Avoiding the ecological limits of forage fish for fed aquaculture. *Nat Sustain* 1, 298–303. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0077-1>
- Galkanda-Arachchige, H.S.C., Wilson, A.E., Davis, D.A., 2020. Success of fishmeal replacement through poultry by-product meal in aquaculture feed formulations: a meta-analysis. *Reviews in Aquaculture* 12, 1624–1636. <https://doi.org/10.1111/raq.12401>
- Gamboa-Delgado, J., Márquez-Reyes, J.M., 2018. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture* 10, 224–246. <https://doi.org/10.1111/raq.12157>
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *Journal of Experimental Medicine* 197, 1107–1117. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>
- Gatlin III, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38, 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- George, S., Larsson, G., Olsson, K., Enfors, S.-O., 1998. Comparison of the Baker's yeast process performance in laboratory and production scale. *Bioprocess Engineering* 18, 135–142. <https://doi.org/10.1007/PL00008979>
- Gerwick, L., Corley-Smith, G., Bayne, C.J., 2007. Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.04.003>
- Gibson T. Gaylord, Frederick T. Barrows, Kenneth G. Overturf, Kenshun Liu, Gongshe Hu, 2010. An Overview of Progress toward developing and all Plant-based Diet for Rainbow Trout. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 31, 9–14.
- Glencross, B.D., 2020. A feed is still only as good as its ingredients: An update on the nutritional research strategies for the optimal evaluation of ingredients for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 26, 1871–1883. <https://doi.org/10.1111/anu.13138>
- Glencross, B.D., Baily, J., Berntssen, M.H.G., Hardy, R., MacKenzie, S., Tocher, D.R., 2020a. Risk assessment of the use of alternative animal and plant raw material resources in aquaculture feeds. *Reviews in Aquaculture* 12, 703–758. <https://doi.org/10.1111/raq.12347>
- Glencross, B.D., Huyben, D., Schrama, J.W., 2020b. The Application of Single-Cell Ingredients in Aquaculture Feeds—A Review. *Fishes* 5, 22. <https://doi.org/10.3390/fishes5030022>
- Gomes, E.F., Rema, P., Kaushik, S.J., 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177–186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6)

- Guimarães, I. g., Pezzato, L. e., Barros, M. m., 2008. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 14, 396–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00540.x>
- Gültepe, N., Salnur, S., Hoşsu, B., Hisar, O., 2011. Dietary supplementation with Mannan oligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition* 17, 482–487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00824.x>
- Günzel, D., Yu, A.S.L., 2013. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews* 93, 525–569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Hai, N.V., 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119, 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Hajra, A., Mazumder, A., Ganguly, D., Mohanty, B., Sharma, A., 2013. ANTINUTRITIONAL FACTORS IN PLANT ORIGIN FISH FEED INGREDIENTS: THE PROBLEMS AND PROBABLE REMEDIES. pp. 193–202.
- Hall, K.C., Bellwood, D.R., 1995. Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. *Journal of Fish Biology* 47, 438–454. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01913.x>
- Hansen, A.-C., Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Koppe, W., Hemre, G.-I., 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I — Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272, 599–611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.034>
- Hansen, A.M., Caspi, R.R., 2010. Glutamate joins the ranks of immunomodulators. *Nat Med* 16, 856–858. <https://doi.org/10.1038/nm0810-856>
- Hansen, J.Ø., Lagos, L., Lei, P., Revenco-Urzuá, F.E., Morales-Lange, B., Hansen, L.D., Schiavone, M., Mydland, L.T., Arntzen, M.Ø., Mercado, L., Benicio, R.T., Øverland, M., 2021. Down-stream processing of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) – Effect on nutrient digestibility and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 530, 735707. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735707>
- Hardy, R. (Ed.), 2021. *Fish nutrition*, 4th ed. Elsevier, waltham.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>
- Hay, Z.L.Z., Slansky, J.E., 2022. Granzymes: The Molecular Executors of Immune-Mediated Cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 23, 1833. <https://doi.org/10.3390/ijms23031833>
- Herre, J., Gordon, S., Brown, G.D., 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular Immunology, Innate Immunity* 40, 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.007>
- Hilton, J.W., Atkinson, J.L., 1982. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *British Journal of Nutrition* 47, 597–607. <https://doi.org/10.1079/BJN19820071>
- Holland, M.C.H., Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 399–420. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0408>
- Hoole, D., Lewis, J.W., Schuwerack, P.M.M., Chakravarthy, C., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Cartwright, J.R., 2003. Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology* 126, S71–S85. <https://doi.org/10.1017/S0031182003003779>

- Hoseini, S.M., Ahmad Khan, M., Yousefi, M., Costas, B., 2020. Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future researches. *Reviews in Aquaculture* 12, 2091–2108. <https://doi.org/10.1111/raq.12424>
- Hoseini, S.M., Yousefi, M., 2019. Beneficial effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on oxytetracycline-induced stress response, immunosuppression, oxidative stress and enzymatic changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 25, 298–309. <https://doi.org/10.1111/anu.12853>
- Hossain, Md.S., Koshio, S., Kestemont, P., 2020. Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 12, 1028–1053. <https://doi.org/10.1111/raq.12370>
- Hossain, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N.M., Ono, S., Fujieda, T., 2016. Comparison of the effects of inosine and inosine monophosphate on growth, immune response, stress resistance and gut morphology of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 458, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.032>
- Hosseini Shekarabi, S.P., Shamsaie Mehrgan, M., Banavreh, A., Foroudi, F., 2021. Partial replacement of fishmeal with corn protein concentrate in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth performance, physiometabolic responses, and fillet quality. *Aquaculture Research* 52, 249–259. <https://doi.org/10.1111/are.14887>
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., Wu, G., 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J Animal Sci Biotechnol* 8, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Hu, L., Yun, B., Xue, M., Wang, J., Wu, X., Zheng, Y., Han, F., 2013. Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture* 372–375, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.025>
- Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J.M., 2019. The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth* 1, 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- Huyben, D., Nyman, A., Vidakovic, A., Passoth, V., Moccia, R., Kiessling, A., Dicksved, J., Lundh, T., 2017. Effects of dietary inclusion of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* on gut microbiota of rainbow trout. *Aquaculture* 473, 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.024>
- Huyben, D., Vidaković, A., Langeland, M., Nyman, A., Lundh, T., Kiessling, A., 2018. Effects of dietary yeast inclusion and acute stress on postprandial plasma free amino acid profiles of dorsal aorta-cannulated rainbow trout. *Aquaculture Nutrition* 24, 236–246. <https://doi.org/10.1111/anu.12551>
- Hwang, J.-H., Lee, S.-W., Rha, S.-J., Yoon, H.-S., Park, E.-S., Han, K.-H., Kim, S.-J., 2013. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquacult Int* 21, 525–538. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9586-5>
- IAFFD, 2022. The International Aquaculture Feed Formulation Database [WWW Document]. URL <https://iaffd.com> (accessed 3.23.23).
- IFFO, 2022. Update on by-product marine ingredients [WWW Document]. URL <https://www.iffocom.com/product> (accessed 3.22.23).

- Ingrosso, L., Novoa, B., Valle, A.Z.D., Cardone, F., Aranguren, R., Sbriccoli, M., Bevivino, S., Iriti, M., Liu, Q., Vetrugno, V., Lu, M., Faoro, F., Ciappellano, S., Figueras, A., Pocchiari, M., 2006. Scrapie infectivity is quickly cleared in tissues of orally-infected farmed fish. *BMC Vet Res* 2, 21. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-21>
- Irungbam, S., Devi, W., Monsang, S.J., Kamilya, D., 2021. Effect of feed deprivation on immune-haematological responses and resistance of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Indian Journal of Animal Health* 60, 193–200. <https://doi.org/10.36062/ijah.2021.spl.02721>
- Isani, G., Andreani, G., Carpenè, E., Di Molfetta, S., Eletto, D., Spisni, E., 2011. Effects of waterborne Cu exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A proteomic approach. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 1051–1058. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.09.005>
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Sieniawski, K., Starowicz, P., 2016. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Research International* 85, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.031>
- Izquierdo, M., Socorro, J.A., Arantzamendi, L., Hernandez-Cruz, M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 97–107. <https://doi.org/10.1023/A:1007810506259>
- Jach, M.E., Serefko, A., Ziąja, M., Kieliszek, M., 2022. Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. *Metabolites* 12, 63. <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>
- Jacques, K.A., Lyons, T.P., Kelsall, D.R., 2003. *The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*, 4th ed. ed. Nottingham University Press, Nottingham.
- Jannathulla, R., Rajaram, V., Kalanjiam, R., Ambasankar, K., Muralidhar, M., Dayal, J.S., 2019. Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquaculture Research* 50, 3493–3506. <https://doi.org/10.1111/are.14324>
- Jannathulla, R., Sravanthi, O., Moomeen, S., Gopikrishna, G., Dayal, J.S., 2021. Microbial products in terms of isolates, whole-cell biomass, and live organisms as aquafeed ingredients: production, nutritional values, and market potential—a review. *Aquacult Int* 29, 623–650. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00644-2>
- Jarmołowicz, S., Zakęś, Z., Siwicki, A., Terech-Majewska, E., Kowalska, A., Partyka, K., Hopko, M., 2013. Immunomodulatory effect of dietary brewer's yeast extract in *Sander lucioperca* juveniles against the challenge of *Aeromonas salmonicida*. *Aquacult Int* 21, 939–945. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9546-0>
- Jensen, L.E., Hiney, M.P., Shields, D.C., Uhlar, C.M., Lindsay, A.J., Whitehead, A.S., 1997. Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *The Journal of Immunology* 158, 384–392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.158.1.384>
- Jensen, L.E., Petersen, T.E., Thiel, S., Jensenius, J.C., 1995. Isolation of a pentraxin-like protein from rainbow trout serum. *Developmental & Comparative Immunology* 19, 305–314. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(95\)00010-Q](https://doi.org/10.1016/0145-305X(95)00010-Q)
- Ji, L., Sun, G., Li, X., Liu, Y., 2020. Comparative transcriptome analysis reveals the mechanism of β -glucan in protecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 98, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.022>
- Johnson, E.A., Echavarri-Erasun, C., 2011. Chapter 3 - Yeast Biotechnology, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts* (Fifth Edition). Elsevier, London, pp. 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>

- Jørgensen, J.B., Lunde, H., Jensen, L., Whitehead, A.S., Robertsen, B., 2000. Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 β , IL-6 and TNF α or bacterial lipopolysaccharide. *Developmental & Comparative Immunology* 24, 553–563. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(00\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(00)00022-7)
- Jutfelt, F., 2011. Barrier function of the gut.
- Kaattari, S.L., 1992. Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 161–180. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90062-3](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90062-3)
- Kaiser, F., Harbach, H., Schulz, C., 2022. Rapeseed proteins as fishmeal alternatives: A review. *Reviews in Aquaculture* 14, 1887–1911. <https://doi.org/10.1111/raq.12678>
- Kamalam, B.S., Medale, F., Panserat, S., 2017. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture, Cutting Edge Science in Aquaculture* 2015 467, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>
- Kaushik, S.J., Covès, D., Dutto, G., Blanc, D., 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230, 391–404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)
- Kaushik, S.J., Seiliez, I., 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquaculture Research* 41, 322–332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x>
- Khan, K.U., Zuberi, A., Fernandes, J.B.K., Ullah, I., Sarwar, H., 2017. An overview of the ongoing insights in selenium research and its role in fish nutrition and fish health. *Fish Physiol Biochem* 43, 1689–1705. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0402-z>
- Khojasteh, S.M.B., 2012. The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review.
- King, R.H., Campbell, R.G., 1978. Blood meal as a source of protein for grower/finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology* 3, 191–200. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(78\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0377-8401(78)90046-9)
- Kirimi, J.G., Musalia, L.M., Magana, A., Munguti, J.M., 2016. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Diets Containing Blood Meal as a Replacement of Fish Meal. *JAS* 8, 79. <https://doi.org/10.5539/jas.v8n8p79>
- Kirimi, J.G., Musalia, L.M., Munguti, J.M., 2017. Effect Of Replacing Fish Meal With Blood Meal On Chemical Composition Of Supplement For Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *East African Agricultural and Forestry Journal* 82, 1–9. <https://doi.org/10.1080/00128325.2016.1158898>
- Kjeldahl, 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z Anal Chem* 22, 366.
- Kolosov, D., Bui, P., Chasiotis, H., Kelly, S.P., 2013. Claudins in teleost fishes. *Tissue Barriers* 1, e25391. <https://doi.org/10.4161/tisb.25391>
- Krasnov, A., Johansen, L.-H., Karlsen, C., Sveen, L., Ytteborg, E., Timmerhaus, G., Lazado, C.C., Afanasyev, S., 2021. Transcriptome Responses of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) to Viral and Bacterial Pathogens, Inflammation, and Stress. *Front. Immunol.* 12, 705601. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705601>
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M., Baeverfjord, G., 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 9, 361–371. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00264.x>

- Krogdahl, Å., Marie Bakke-McKellep, A., 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Includes papers from the International Symposium on “Ontogeny of Physiological Regulatory Mechanisms: Fitting into the Environment” - Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting, New Orleans, January, 2004 141, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.06.002>
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M., 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research* 41, 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- Krogdahl, Bakke-McKellep, Rød, Baeverfjord, 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition* 6, 77–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00129.x>
- Ks, M., Eg, J., 2021. Review on probiotics as a functional feed additive in aquaculture. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 9, 201–207. <https://doi.org/10.22271/fish.2021.v9.i4c.2528>
- Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Choudhury, D., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C., 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.001>
- Kumar, S., Sándor Zs, J., Nagy, Z., Fazekas, G., Havasi, M., Sinha, A. k., De Boeck, G., Gál, D., 2017. Potential of processed animal protein versus soybean meal to replace fish meal in practical diets for European catfish (*Silurus glanis*): growth response and liver gene expression. *Aquaculture Nutrition* 23, 1179–1189. <https://doi.org/10.1111/anu.12487>
- Labh, S., Shakya, S., 2014. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture 2, 44–47.
- Lahue, C., Madden, A., Dunn, R., Smukowski Heil, C., 2020. History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. *Frontiers in Genetics* 11.
- Lall, S.P., 2000. Nutrition and health of fish.
- Lall, S.P., Kaushik, S.J., 2021. Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals* 11, 2711. <https://doi.org/10.3390/ani11092711>
- Lapeña, D., Olsen, P.M., Arntzen, M.Ø., Kosa, G., Passoth, V., Eijsink, V.G.H., Horn, S.J., 2020. Spruce sugars and poultry hydrolysate as growth medium in repeated fed-batch fermentation processes for production of yeast biomass. *Bioprocess Biosyst Eng* 43, 723–736. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02271-x>
- Laskin, J.D., Dokidis, A., Gardner, C.R., Laskin, D.L., 1991. Changes in sulfated proteoglycan production after activation of rat liver macrophages. *Hepatology* 14, 306–312. <https://doi.org/10.1002/hep.1840140217>
- Lazzarotto, V., Corraze, G., Leprevost, A., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Médale, F., 2015. Three-Year Breeding Cycle of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed a Plant-Based Diet, Totally Free of Marine Resources: Consequences for Reproduction, Fatty Acid Composition and Progeny Survival. *PLOS ONE* 10, e0117609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117609>
- Lazzarotto, V., Médale, F., Larroquet, L., Corraze, G., 2018. Long-term dietary replacement of fishmeal and fish oil in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth, whole body fatty acids and intestinal and hepatic gene expression. *PLOS ONE* 13, e0190730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190730>

- Le Gouvello, R. (Ed.), 2017. Durabilité des aliments pour le poisson en aquaculture : Réflexions et recommandations sur les aspects technologiques, économiques, sociaux et environnementaux. IUCN International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.02.fr>
- Lee, J.-Y., Gao, Y., 2012. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society 43, 447–458. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00581.x>
- Li, C., Beck, B.H., Peatman, E., 2014. Nutritional impacts on gene expression in the surface mucosa of blue catfish (*Ictalurus furcatus*). Developmental & Comparative Immunology 44, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.12.014>
- Li, M.H., Wise, D.J., Mischke, C.C., Kumar, G., Greenway, T.E., Tiwari, A., Lucas, P.M., 2020. Reducing dietary protein concentrations and replacing fish meal with porcine meat and bone meal do not affect growth or feed conversion of pond-raised fingerling channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of the World Aquaculture Society 51, 364–372. <https://doi.org/10.1111/jwas.12653>
- Li, P., Lewis, D.H., Gatlin, D.M., 2004. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Fish & Shellfish Immunology 16, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.09.005>
- Li, T., Qi, M., Gatesoupe, F.-J., Tian, D., Jin, W., Li, J., Lin, Q., Wu, S., Li, H., 2019. Adaptation to Fasting in Crucian Carp (*Carassius auratus*): Gut Microbiota and Its Correlative Relationship with Immune Function. Microb Ecol 78, 6–19. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1275-0>
- Lien, S., Koop, B.F., Sandve, S.R., Miller, J.R., Kent, M.P., Nome, T., Hvidsten, T.R., Leong, J.S., Minkley, D.R., Zimin, A., Grammes, F., Grove, H., Gjuvsland, A., Walenz, B., Hermansen, R.A., von Schalburg, K., Rondeau, E.B., Di Genova, A., Samy, J.K.A., Olav Vik, J., Vigeland, M.D., Caler, L., Grimholt, U., Jentoft, S., Inge Våge, D., de Jong, P., Moen, T., Baranski, M., Palti, Y., Smith, D.R., Yorke, J.A., Nederbragt, A.J., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K.S., Jiang, X., Fan, D., Hu, Y., Liberles, D.A., Vidal, R., Iturra, P., Jones, S.J.M., Jonassen, I., Maass, A., Omholt, S.W., Davidson, W.S., 2016. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. Nature 533, 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature17164>
- Lieschke, G.J., Trede, N.S., 2009. Fish immunology. Current Biology 19, R678–R682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.068>
- Lim, C., Klesius, P.H., 2003. Influence of feed deprivation on hematology, macrophage chemotaxis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* challenge of channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 15, 13–20. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2003\)015<0013:IOFDOH>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2003)015<0013:IOFDOH>2.0.CO;2)
- Lim, C., Klesius, P.H., 1997. Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 157, 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00143-9)
- Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H., Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 185, 313–327. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00352-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00352-X)
- Liu, L., Fang, J., Liang, X.-F., He, S., 2020. Nucleotide promotes feed intake and protein utilization via regulating the gene expression of feeding and nitrogen metabolism in juvenile Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). Aquaculture Nutrition 26, 1702–1712. <https://doi.org/10.1111/anu.13121>

- Liu, L., Li, C., Su, B., Beck, B.H., Peatman, E., 2013. Short-Term Feed Deprivation Alters Immune Status of Surface Mucosa in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). PLOS ONE 8, e74581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074581>
- Liu, S., Gao, G., Palti, Y., Cleveland, B.M., Weber, G.M., Iii, C.E.R., 2014. RNA-seq Analysis of Early Hepatic Response to Handling and Confinement Stress in Rainbow Trout. PLOS ONE 9, e88492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088492>
- Liu, Z., Liu, S., Yao, J., Bao, L., Zhang, J., Li, Y., Jiang, C., Sun, L., Wang, R., Zhang, Y., Zhou, T., Zeng, Q., Fu, Q., Gao, S., Li, N., Koren, S., Jiang, Y., Zimin, A., Xu, P., Phillippy, A.M., Geng, X., Song, L., Sun, F., Li, C., Wang, X., Chen, A., Jin, Y., Yuan, Z., Yang, Y., Tan, S., Peatman, E., Lu, J., Qin, Z., Dunham, R., Li, Z., Sonstegard, T., Feng, J., Danzmann, R.G., Schroeder, S., Scheffler, B., Duke, M.V., Ballard, L., Kucuktas, H., Kaltenboeck, L., Liu, H., Armbruster, J., Xie, Y., Kirby, M.L., Tian, Y., Flanagan, M.E., Mu, W., Waldbieser, G.C., 2016. The channel catfish genome sequence provides insights into the evolution of scale formation in teleosts. Nat Commun 7, 11757. <https://doi.org/10.1038/ncomms11757>
- Lock, E.-J., Biancarosa, I., Gasco, L., 2018. Insects as Raw Materials in Compound Feed for Aquaculture, in: Halloran, A., Flore, R., Vantomme, P., Roos, N. (Eds.), Edible Insects in Sustainable Food Systems. Springer International Publishing, Cham, pp. 263–276. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74011-9_16
- Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C., Secombes, C.J., 2003. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. Aquaculture 221, 23–40. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00022-X)
- Lu, F., Haga, Y., Satoh, S., 2015. Effects of replacing fish meal with rendered animal protein and plant protein sources on growth response, biological indices, and amino acid availability for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Sci 81, 95–105. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0818-7>
- Lund, I., Dalsgaard, J., Rasmussen, H.T., Holm, J., Jokumsen, A., 2011. Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. Aquaculture 321, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.028>
- Lund, V., Olafsen, J.A., 1999. Changes in serum concentration of a serum amyloid P-like pentraxin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during infection and inflammation. Developmental & Comparative Immunology 23, 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(98\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00038-X)
- Lund, V., Olafsen, J.A., 1998. A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. Developmental & Comparative Immunology 22, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00051-7)
- Luthada-Raswiswi, R., Mukaratirwa, S., O'Brien, G., 2021. Animal Protein Sources as a Substitute for Fishmeal in Aquaculture Diets: A Systematic Review and Meta-Analysis. Applied Sciences 11, 3854. <https://doi.org/10.3390/app11093854>
- Mahdy, M.A., Jamal, M.T., Al-Harb, M., Al-Mur, B.A., Haque, M.F., 2022. Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. J App Biol biotech 59–65. <https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100507>
- Martin, È., 2013. Étude de l'immunité intestinale de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et perspectives de modulation par des additifs alimentaires : approches cellulaires et moléculaires (These de doctorat). Université de Lorraine.

- Martin, S.A., Douglas, A., Houlihan, D.F., Secombes, C.J., 2010. Starvation alters the liver transcriptome of the innate immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Genomics 11, 418. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-418>
- Martin, S.A.M., Cash, P., Blaney, S., Houlihan, D.F., 2001. Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. Fish Physiology and Biochemistry 24, 259–270. <https://doi.org/10.1023/A:1014015530045>
- Martin, S.A.M., Król, E., 2017a. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. Developmental & Comparative Immunology, Impact of high throughput sequencing on comparative immunogenomics 75, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.024>
- Martin, S.A.M., Król, E., 2017b. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. Developmental & Comparative Immunology, Impact of high throughput sequencing on comparative immunogenomics 75, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.024>
- Martineau-Côté, D., Achouri, A., Karboune, S., L'Hocine, L., 2022. Faba Bean: An Untapped Source of Quality Plant Proteins and Bioactives. Nutrients 14, 1541. <https://doi.org/10.3390/nu14081541>
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Herмосillo, O.A., Ramírez Saad, H.C., 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. ISRN Microbiology 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Martinez-Force, E., Benitez, T., 1995. Effects of varying media, temperature, and growth rates on the intracellular concentrations of yeast amino acids. Biotechnol. Prog. 11, 386–392. <https://doi.org/10.1021/bp00034a004>
- Matassa, S., Boon, N., Pikaar, I., Verstraete, W., 2016. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. Microbial Biotechnology 9, 568–575. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12369>
- Mattila, P., Mäkinen, S., Euroala, M., Jalava, T., Pihlava, J.-M., Hellström, J., Pihlanto, A., 2018. Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. Plant Foods Hum Nutr 73, 108–115. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0660-7>
- Maynard, L.A. (Ed.), 1979. Animal nutrition, 7th ed. ed, McGraw-Hill publications in the agricultural sciences. McGraw-Hill, New York.
- Meeker, D.L. (Ed.), 2006. Essential rendering: all about the animal by-products industry. National Renderers Association : Fats and Proteins Research Foundation : Animal Protein Producers Industry, Alexandria, Va.
- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiol Biochem 39, 431–457. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5>
- Micallef, G., Cash, P., Fernandes, J.M.O., Rajan, B., Tinsley, J.W., Bickerdike, R., Martin, S.A.M., Bowman, A.S., 2017. Dietary Yeast Cell Wall Extract Alters the Proteome of the Skin Mucous Barrier in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Increased Abundance and Expression of a Calreticulin-Like Protein. PLOS ONE 12, e0169075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169075>
- Militz, T.A., Southgate, P.C., Carton, A.G., Hutson, K.S., 2013. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. Aquaculture 408–409, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.027>
- Mirzaei, M., Shavandi, A., Mirdamadi, S., Soleymanzadeh, N., Motahari, P., Mirdamadi, N., Moser, M., Subra, G., Alimoradi, H., Goriely, S., 2021. Bioactive peptides from yeast: A comparative review

- on production methods, bioactivity, structure-function relationship, and stability. *Trends in Food Science & Technology* 118, 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.008>
- Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Seedeви, P., Rajan, D.K., 2019. Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp aquaculture: A review. *Aquaculture* 500, 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.023>
- Mokhtar, D.M., Abdelhafez, E.A., 2021. An overview of the structural and functional aspects of immune cells in teleosts. <https://doi.org/10.14670/HH-18-302>
- Mokhtar, D.M., Zaccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M.T., Sayed, R.K.A., 2023. Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. *Fishes* 8, 93. <https://doi.org/10.3390/fishes8020093>
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture, Proceedings Of The 10th International Symposium On Nutrition And Feeding In Fish (Feeding For Quality)*. 225, 353–370. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00301-6)
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M., 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 399–407. <https://doi.org/10.1023/A:1007734720630>
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 139, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>
- Moutinho, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2017. Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. *Aquaculture* 468, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.024>
- Najafi, A., Salati, A.P., Yavari, V., Asadi, F., 2014. Effects of short-term starvation and re-feeding on antioxidant defense status in *Mesopotamichthys sharpeyi* (Günther, 1874) fingerlings. *International Journal of Aquatic Biology* 2. <https://doi.org/10.22034/ijab.v2i5.136>
- Napier, J.A., Haslam, R.P., Olsen, R.-E., Tocher, D.R., Betancor, M.B., 2020. Agriculture can help aquaculture become greener. *Nat Food* 1, 680–683. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-00182-9>
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>
- Netea, M.G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L.B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Mhlanga, M.M., Mulder, W.J.M., Riksen, N.P., Schlitzer, A., Schultze, J.L., Stabell Benn, C., Sun, J.C., Xavier, R.J., Latz, E., 2020. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 20, 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
- Nguyen, T.H., Fleet, G.H., Rogers, P.L., 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 206–212. <https://doi.org/10.1007/s002530051278>
- Nielsen, J., 2015. Yeast cell factories on the horizon. *Science* 349, 1050–1051. <https://doi.org/10.1126/science.aad2081>

- NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, D.C.
<https://doi.org/10.17226/13039>
- OCDE, FAO, 2022a. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2022-2031, Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO. OECD. <https://doi.org/10.1787/63c6c63f-fr>
- OCDE, FAO, 2022b. Statistiques et perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2022-2031. [WWW Document]. URL https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2022&lang=fr# (accessed 1.27.23).
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish: Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* 35, 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H., 2015. 8 - Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish, in: Davis, D.A. (Ed.), *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, Oxford, pp. 203–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8>
- Oliva-Teles, A., Gonçalves, P., 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture, Bass SPP culture: basic and applied aspects* 202, 269–278. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00777-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00777-3)
- Oliveira, A.S., Ferreira, C., Pereira, J.O., Pintado, M.E., Carvalho, A.P., 2022. Spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a potential source of bioactive peptides: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules* 208, 1116–1126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.094>
- Olsen, R., 1997. Lipid digestibility in fish: a review. pp. 199–265.
- Olsen, R.E., Hansen, A.-C., Rosenlund, G., Hemre, G.-I., Mayhew, T.M., Knudsen, D.L., Tufan Eroldoğan, O., Myklebust, R., Karlsen, Ø., 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II — Health aspects. *Aquaculture* 272, 612–624. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.010>
- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Ed.), 1995. Code de conduite pour une pêche responsable, Réimpr. 1996. ed. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.
- Orso, G., Imperatore, R., Coccia, E., Ashouri, G., Paolucci, M., 2022. Lamiaceae as Feed Additives in Fish Aquaculture. *Fishes* 7, 349. <https://doi.org/10.3390/fishes7060349>
- Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L.T., Romarheim, O.H., Skrede, A., 2013. Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 402–403, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.016>
- Øverland, M., Skrede, A., 2017. Yeast derived from lignocellulosic biomass as a sustainable feed resource for use in aquaculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 733–742. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8007>
- Ozdemir, S., Yetilmezsoy, K., 2020. A mini literature review on sustainable management of poultry abattoir wastes. *J Mater Cycles Waste Manag* 22, 11–21. <https://doi.org/10.1007/s10163-019-00934-1>
- Ozório, R. o. a., Turini, B. g. s., Môro, G. v., Oliveira, L. s. t., Portz, L., Cyrino, J. e. p., 2010. Growth, nitrogen gain and indispensable amino acid retention of pacu (*Piaractus mesopotamicus*,

- Holmberg 1887) fed different brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) levels. *Aquaculture Nutrition* 16, 276–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00662.x>
- Ozório, R.O.A., Portz, L., Borghesi, R., Cyrino, J.E.P., 2012. Effects of Dietary Yeast (*Saccharomyces cerevisia*) Supplementation in Practical Diets of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals (Basel)* 2, 16–24. <https://doi.org/10.3390/ani2010016>
- Pal, D., Joardar, S.N., Roy, B., 2007. Immunostimulatory Effects of a Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cell Wall Feed Supplement on Rohu (*Labeo rohita*), an Indian Major Carp. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh* 59. <https://doi.org/10.46989/001c.20525>
- Panserat, S., Kolditz, C., Richard, N., Plagnes-Juan, E., Piumi, F., Esquerré, D., Médale, F., Corraze, G., Kaushik, S., 2008. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *Br J Nutr* 100, 953–967. <https://doi.org/10.1017/S0007114508981411>
- Park, K.C., Osborne, J.A., Tsoi, S.C.M., Brown, L.L., Johnson, S.C., 2005. Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 18, 393–415. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.10.003>
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions* 145, 191–199. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00002-4)
- Patterson, R., Rogiewicz, A., Kiarie, E.G., Slominski, B.A., 2023. Yeast derivatives as a source of bioactive components in animal nutrition: A brief review. *Front Vet Sci* 9, 1067383. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1067383>
- Pavan Kumar, B., Ramudu, K.R., Devi, B.C., 2014. Mini review on Incorporation of Cotton Seed Meal, an Alternative to Fish Meal in Aquaculture Feeds. *International Journal of Biological Research* 2, 99–105. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v2i2.3274>
- Pelissero, C., Sumpter, J.P., 1992. Steroids and “steroid-like” substances in fish diets. *Aquaculture* 107, 283–301. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90078-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90078-Y)
- Petit, J., Embregts, C.W.E., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F., 2019. Evidence of Trained Immunity in a Fish: Conserved Features in Carp Macrophages. *The Journal of Immunology* 203, 216–224. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900137>
- Petit, V., Niot, I., Poirier, H., Besnard, P., 2007. Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 21, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2007.01.007>
- Pohlenz, C., Gatlin, D.M., 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture, Special Issue on Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture- Part A* 431, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.008>
- Polakof, S., Moon, T.W. (Eds.), 2013. *Trout: from physiology to conservation, Animal science, issues and professions*. Nova Publishers, New York.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol B* 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>
- Porter, D., Peggs, D., McGurk, C., Martin, S.A.M., 2022. Immune responses to prebiotics in farmed salmonid fish: How transcriptomic approaches help interpret responses. *Fish & Shellfish Immunology* 127, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.055>
- Prabhu, P., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2016. Mineral requirements of fish: a systematic review. *Rev Aquacult* 8, 172–219. <https://doi.org/10.1111/raq.12090>

- Prabu, E., Felix, S., Felix, N., Ahilan, B., Ruby, P., 2017. An overview on significance of fish nutrition in aquaculture industry. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 5, 349–355.
- Pratoomyot, J., Bendiksen, E.Å., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2010. Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 305, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.019>
- Puligundla, P., Mok, C., Park, S., 2020. Advances in the valorization of spent brewer's yeast. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 62, 102350. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102350>
- Py, C., Elizondo-González, R., Peña-Rodríguez, A., 2022. Compensatory growth: Fitness cost in farmed fish and crustaceans. *Reviews in Aquaculture* 14, 1389–1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12656>
- Quang Tran, H., Van Doan, H., Stejskal, V., 2022. Environmental consequences of using insect meal as an ingredient in aquafeeds: A systematic view. *Rev Aquacult* 14, 237–251. <https://doi.org/10.1111/raq.12595>
- Rahimi, R., Mirahmadi, S.A., Hajirezaee, S., Fallah, A.A., 2022. How probiotics impact on immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Aquaculture* 14, 27–53. <https://doi.org/10.1111/raq.12582>
- Raida, M.K., Buchmann, K., 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.001>
- Rasal, K.D., Nandanpawar, P.C., Swain, P., Badhe, M.R., Sundaray, J.K., Jayasankar, P., 2016. MicroRNA in aquaculture fishes: a way forward with high-throughput sequencing and a computational approach. *Rev Fish Biol Fisheries* 26, 199–212. <https://doi.org/10.1007/s11160-016-9421-6>
- Rathore, K.S., Pandeya, D., Campbell, L.M., Wedegaertner, T.C., Puckhaber, L., Stipanovic, R.D., Thenell, J.S., Hague, S., Hake, K., 2020. Ultra-Low Gossypol Cottonseed: Selective Gene Silencing Opens Up a Vast Resource of Plant-Based Protein to Improve Human Nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences* 39, 1–29. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1724433>
- Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.-M., 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.021>
- Reboldi, A., Dang, E.V., McDonald, J.G., Liang, G., Russell, D.W., Cyster, J.G., 2014. Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. *Science* 345, 679–684. <https://doi.org/10.1126/science.1254790>
- Reda, R.M., Nasr, M.A.F., Ismail, T.A., Moustafa, A., 2021. Immunological Responses and the Antioxidant Status in African Catfish (*Clarias gariepinus*) Following Replacement of Dietary Fish Meal with Plant Protein. *Animals* 11, 1223. <https://doi.org/10.3390/ani11051223>
- Reda, R.M., Selim, K.M., Mahmoud, R., El-Araby, I.E., 2018. Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. *Fish Shellfish Immunol* 80, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.016>
- Refstie, S., Korsøen, Ø.J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., Roem, A.J., 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190, 49–63. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00382-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00382-3)
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sarter, S., Sasal, P., Caruso, D., 2021. Moving towards more sustainable aquaculture practices: a meta-analysis on the potential of plant-enriched diets to

- improve fish growth, immunity and disease resistance. *Reviews in Aquaculture* 13, 537–555. <https://doi.org/10.1111/raq.12485>
- Reyes-Becerril, M., Guardiola, F., Rojas, M., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.Á., 2013. Dietary administration of microalgae *Navicula sp.* affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology* 35, 883–889. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.026>
- Ribeiro, R.A., Bourbon-Melo, N., Sá-Correia, I., 2022. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Ringoe, E., Olsen, R., González Vecino, J., Wadsworth, S., 2011. Use of Immunostimulants and Nucleotides in Aquaculture: A Review. *Journal of Marine Science: Research & Development* 02. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000104>
- Rios, F.S., Kalinin, A.L., Fernandes, M.N., Rantin, F.T., 2004. Changes in gut gross morphology of traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after refeeding. *Braz. J. Biol.* 64, 683–689. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842004000400017>
- Rios, F.S., Oba, E.T., Fernandes, M.N., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2005. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 140, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.12.006>
- Robertsen, B., 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology, Reviews in Fish Immunology* 20, 172–191. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.010>
- Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. m., Cordero, M. I., Lall, S. p., Alarcón, F. j., 2015. Tissue composition, blood biochemistry and histology of digestive organs in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles fed diets containing different plant protein ingredients. *Aquaculture Nutrition* 21, 767–779. <https://doi.org/10.1111/anu.12207>
- Romarheim, O. h., Zhang, C., Penn, M., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Skrede, A., Krogdahl, Å., Storebakken, T., 2008. Growth and intestinal morphology in cobia (*Rachycentron canadum*) fed extruded diets with two types of soybean meal partly replacing fish meal. *Aquaculture Nutrition* 14, 174–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00517.x>
- Roques, S., 2019. Métabolomique intégrative de l'adaptation du métabolisme de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à de nouveaux aliments à base de matières premières végétales et alternatives (These de doctorat). Pau.
- Roy, S.S., Pal, R., 2015. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proc Zool Soc* 68, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9>
- Rumsey, G.L., Hughes, S.G., Smith, R.R., Kinsella, J.E., Shetty, K.J., 1991. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology* 33, 185–193. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90059-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90059-2)
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., Foubert, I., 2014. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry* 160, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.087>
- Sahlmann, C., Sutherland, B.J.G., Kortner, T.M., Koop, B.F., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., 2013. 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, 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.031>

- Sakai, M., Hikima, J., Kono, T., 2021. Fish cytokines: current research and applications. *Fish Sci* 87, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01476-4>
- Sakyi, M.E., Cai, J., Tang, J., Xia, L., Li, P., Abarike, E.D., Kuebutornye, F.K.A., Jian, J., 2020. Short term starvation and re-feeding in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758): Growth measurements, and immune responses. *Aquaculture Reports* 16, 100261. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100261>
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad, C.E., Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8, 328. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-328>
- Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology* 4, 525–539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Salta, E., Panagiotidis, C., Teliouis, K., Petrakis, S., Eleftheriadis, E., Arapoglou, F., Grigoriadis, N., Nicolaou, A., Kaldrymidou, E., Krey, G., Sklaviadis, T., 2009. Evaluation of the Possible Transmission of BSE and Scrapie to Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *PLOS ONE* 4, e6175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006175>
- Samrongpan, C., Areechon, N., Yoonpundh, R., Srisapoome, P., 2008. EFFECTS OF MANNAN-OLIGOSACCHARIDE ON GROWTH, SURVIVAL AND DISEASE RESISTANCE OF NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS LINNAEUS*) FRY.
- Sanz, A., Morales, A.E., de la Higuera, M., Gardenete, G., 1994. Sunflower meal compared with soybean meals as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: protein and energy utilization. *Aquaculture* 128, 287–300. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90318-2)
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
- Savaiano, D.A., Clifford, A.J., 1978. Absorption, tissue incorporation and excretion of free [dietary] purine bases in the rat. *Nutrition Reports International (USA)*.
- Sayyaf Dezfuli, B., Pironi, F., Maynard, B., Simoni, E., Bosi, G., 2022. Rodlet cells, fish immune cells and a sentinel of parasitic harm in teleost organs. *Fish & Shellfish Immunology* 121, 516–534. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.045>
- Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.011>
- Serra, C.R., Oliva-Teles, A., Enes, P., Tavares, F., 2021. Gut microbiota dynamics in carnivorous European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed plant-based diets. *Sci Rep* 11, 447. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80138-y>
- Seskevicene, J., Jeroch, H., Westermeier, C., 2004. Effects of high amounts of rape-cake and peas in diets for broiler chicken 54, 181–186.
- Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M.A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., Daroch, M., 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *J Appl Phycol* 30, 197–213. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z>
- Shah, T.K., Tandel, R.S., Kumar, A., Bhat, R.A.H., Dash, P., Sarma, D., 2021. Chemical composition, antifungal activity and molecular docking of Himalayan thyme leaf extract (*Thymus linearis*) against fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Aquaculture* 543, 736988. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736988>

- Shaluei, F., Nematollahi, A., Naderi-Farsani, H. r., Rahimi, R., Kaboutari Katadj, J., 2017. Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on growth performance and mucosal immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 23, 814–821. <https://doi.org/10.1111/anu.12448>
- Shamran, H., Singh, N.P., Zumbrun, E.E., Murphy, A., Taub, D.D., Mishra, M.K., Price, R.L., Chatterjee, S., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., Singh, U.P., 2017. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) blockade ameliorates experimental colitis by altering microRNA expression and suppressing inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity* 59, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.008>
- Shehata, A.I., Alhoshy, M., Wang, T., Wang, J., Wang, R., Dawood, M.A.O., Zaki, M.A.A., Wang, Y., Zhang, Z., 2022. Expression of reproduction and antioxidant-related genes in crayfish *Cherax quadricarinatus* fed with dietary feed additives. *Aquacult Int* 30, 699–720. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00816-0>
- Shehata, A.I., Wang, T., Jibril Habib, Y., Wang, J., Fayed, W.M., Zhang, Z., 2020. The combined effect of vitamin E, arachidonic acid, *Haemtococcus pluvialis*, nucleotides and yeast extract on growth and ovarian development of crayfish (*Cherax quadricarinatus*) by the orthogonal array design. *Aquaculture Nutrition* 26, 2007–2022. <https://doi.org/10.1111/anu.13142>
- Shurson, G.C., 2020. “What a Waste”—Can We Improve Sustainability of Food Animal Production Systems by Recycling Food Waste Streams into Animal Feed in an Era of Health, Climate, and Economic Crises? *Sustainability* 12, 7071. <https://doi.org/10.3390/su12177071>
- Shurson, G.C., 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology* 235, 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>
- Sidransky, H., 2001. Tryptophan: Biochemical and Health Implications. CRC Press.
- Simon, A., 2014. Cholesterol Metabolism and Immunity. *N Engl J Med* 371, 1933–1935. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1412016>
- Singhal, A., Macfarlane, G., Macfarlane, S., Lanigan, J., Kennedy, K., Elias-Jones, A., Stephenson, T., Dudek, P., Lucas, A., 2008. Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 87, 1785–1792. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.6.1785>
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. *Food Chemistry* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Song, S.K., Beck, B.R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H.D., Ringø, E., 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 40, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., Tomasi, V., 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases* 21, 177–184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00089.x>
- Star, B., Nederbragt, A.J., Jentoft, S., Grimholt, U., Malmstrøm, M., Gregers, T.F., Rounge, T.B., Paulsen, J., Solbakken, M.H., Sharma, A., Wetten, O.F., Lanzén, A., Winer, R., Knight, J., Vogel, J.-H., Aken, B., Andersen, Ø., Lagesen, K., Tooming-Klunderud, A., Edvardsen, R.B., Tina, K.G., Espelund, M., Nepal, C., Previti, C., Karlsen, B.O., Moum, T., Skage, M., Berg, P.R., GjØen, T., Kuhl, H., Thorsen, J., Malde, K., Reinhardt, R., Du, L., Johansen, S.D., Searle, S., Lien, S., Nilsen, F., Jonassen, I.,

- Omholt, S.W., Stenseth, N.C., Jakobsen, K.S., 2011. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature* 477, 207–210. <https://doi.org/10.1038/nature10342>
- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., Sweetman, J., 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Int* 15, 153–161. <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9096-z>
- Steinel, N.C., Bolnick, D.I., 2017. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in Immunology* 8.
- Stone, D.A.J., 2003. Dietary Carbohydrate Utilization by Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 337–369. <https://doi.org/10.1080/10641260390260884>
- Stosik, M., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, W., 2023. Immunity of the intestinal mucosa in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 133, 108572. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108572>
- Sundell, K., Sundh, H., 2012. Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: importance of tight junctions and aquaporins. *Frontiers in Physiology* 3.
- Tacchi, L., Bickerdike, R., Douglas, A., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2011. Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 1st EOFFI Symposium 31, 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.023>
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2013. Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. *Reviews in Fisheries Science* 21, 22–38. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>
- Tadese, D.A., Song, C., Sun, C., Liu, B., Liu, B., Zhou, Q., Xu, P., Ge, X., Liu, M., Xu, X., Tamiru, M., Zhou, Z., Lakew, A., Kevin, N.T., 2022. The role of currently used medicinal plants in aquaculture and their action mechanisms: A review. *Reviews in Aquaculture* 14, 816–847. <https://doi.org/10.1111/raq.12626>
- Takaloo, Z., Nematy, R., Kazemi, M., Ghafari, H., Sajedi, R.H., 2022. Acceleration of Yeast Autolysis by Addition of Fatty Acids, Ethanol and Alkaline Protease. *Iranian Journal of Biotechnology* 20, 54–65. <https://doi.org/10.30498/ijb.2022.282895.3036>
- Thompson, K. d., Tatner, M. f., Henderson, R. j., 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition* 2, 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.1996.tb00004.x>
- Tidwell, J.H. (Ed.), 2012. *Aquaculture Production Systems*, 1st ed. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118250105>
- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P.-A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R.S., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F.A., Bargelloni, L., Power, D.M., Bonhomme, F., Canario, A.V., Reinhardt, R., 2014. European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature communications* 5, 5770. <https://doi.org/10.1038/ncomms6770>
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>
- Tominaga, T., Sharma, I., Fujita, Y., Doi, T., Wallner, A.K., Kanwar, Y.S., 2019. Myo-inositol oxygenase accentuates renal tubular injury initiated by endoplasmic reticulum stress. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 316, F301–F315. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00534.2018>
- Torrecillas, S., Makol, A., Betancor, M.B., Montero, D., Caballero, M.J., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2013. Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 1485–1495. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.351>

- Torreillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M.S., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 969–981. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.007>
- Torreillas, S., Montero, D., Izquierdo, M., 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology* 36, 525–544. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.029>
- Tort, L., Balasch, J.C., 2022. Stress and Immunity in Fish, in: Buchmann, K., Secombes, C.J. (Eds.), *Principles of Fish Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 609–655. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1_20
- Trichet, V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41, 356–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x>
- Tripathi, M.K., Mishra, A.S., 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* 132, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.003>
- Tukmechi, A., 2013. Replacement of dietary fish meal with plant sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); effect on growth performance, immune responses, blood indices and disease resistance. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*.
- Uauy, R., Quan, R., Gil, A., 1994. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J Nutr* 124, 1436S-1441S. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_8.1436S
- Urán, P. a., Schrama, J. w., Rombout, J. h. w. m., Obach, A., Jensen, L., Koppe, W., Verreth, J. a. j., 2008. Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different temperatures. *Aquaculture Nutrition* 14, 324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00534.x>
- Valente, L.M.P., Cabral, E.M., Sousa, V., Cunha, L.M., Fernandes, J.M.O., 2016. Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. *Aquaculture* 453, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.034>
- Valenzuela-Gutiérrez, R., Lago-Lestón, A., Vargas-Albores, F., Cicala, F., Martínez-Porchas, M., 2021. Exploring the garlic (*Allium sativum*) properties for fish aquaculture. *Fish Physiol Biochem* 47, 1179–1198. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00952-7>
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M., MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology* 56, 34–69. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.028>
- van den Ingh, T.S.G.A.M., Krogdahl, Å., Olli, J.J., Hendriks, H.G.C.J.M., Koninkx, J.G.J.F., 1991. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture* 94, 297–305. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90174-6)
- Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Sringarm, K., Jaturasitha, S., Yuangsoi, B., Dawood, M.A.O., Esteban, M.Á., Ringø, E., Faggio, C., 2019. Effects of Assam tea extract on growth, skin mucus, serum immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 93, 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.077>
- Van Hai, N., 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture* 446, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>
- Vaulont, S., Schalk, I., 2015. Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. *Med Sci (Paris)* 31, 756–763. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153108014>

- Verri, T., Barca, A., Pisani, P., Piccinni, B., Storelli, C., Romano, A., 2017. Di- and tripeptide transport in vertebrates: the contribution of teleost fish models. *J Comp Physiol B* 187, 395–462. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1044-7>
- Verri, T., Romano, A., Barca, A., Kottra, G., Daniel, H., Storelli, C., 2010. Transport of di- and tripeptides in teleost fish intestine. *Aquaculture Research* 41, 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02270.x>
- Vidakovic, A., Huyben, D., Sundh, H., Nyman, A., Vielma, J., Passoth, V., Kiessling, A., Lundh, T., 2020. Growth performance, nutrient digestibility and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed graded levels of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus*. *Aquaculture Nutrition* 26, 275–286. <https://doi.org/10.1111/anu.12988>
- Vieira, E., Brandão, T., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2013. Evaluation of Brewer's spent yeast to produce flavor enhancer nucleotides: influence of serial repitching. *J Agric Food Chem* 61, 8724–8729. <https://doi.org/10.1021/jf4021619>
- Vieira, E., Cunha, S.C., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2019. Characterization of a Potential Bioactive Food Ingredient from Inner Cellular Content of Brewer's Spent Yeast. *Waste Biomass Valor* 10, 3235–3242. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0368-9>
- Villasante, A., Ramírez, C., Rodríguez, H., Dantagnan, P., Hernández, A., Figueroa, E., Romero, J., 2022. Dietary carbohydrate-to-protein ratio influences growth performance, hepatic health and dynamic of gut microbiota in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Nutrition* 10, 261–279. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.04.003>
- Vohra, A., Syal, P., Madan, A., 2016. Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology* 219, 31–47. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.019>
- Volkoff, H., Rønnestad, I., 2020. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature* 7, 307–320. <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1765950>
- Waagbø, R., Tröbse, C., Koppe, W., Fontanillas, R., Breck, O., 2010. Dietary histidine supplementation prevents cataract development in adult Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in seawater. *British Journal of Nutrition* 104, 1460–1470. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002485>
- Wang, J., Du, J.-J., Jiang, B., He, R.-Z., Li, A.-X., 2019. Effects of short-term fasting on the resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 94, 889–895. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.055>
- Wang, L.-N., Liu, W.-B., Lu, K.-L., Xu, W.-N., Cai, D.-S., Zhang, C.-N., Qian, Y., 2014. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on non-specific immune responses, oxidative status and liver histology of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 426–427, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.022>
- Wang, X., Howell, C.P., Chen, F., Yin, J., Jiang, Y., 2009. Chapter 6 Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant, in: *Advances in Food and Nutrition Research*, Advances in Food and Nutrition Research. Academic Press, pp. 215–263. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58006-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58006-0)
- Watanabe, T., Pongmaneerat, J., 1991. Quality evaluation of some animal protein sources for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 57, 495–501. <https://doi.org/10.2331/suisan.57.495>
- Watts, M., Munday, B., Burke, C., 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* 79, 570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x>

- Wee, W., Abdul Hamid, N.K., Mat, K., Khalif, R.I.A.R., Rusli, N.D., Rahman, M.M., Kabir, M.A., Wei, L.S., 2022. The effects of mixed prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture and Fisheries*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.02.005>
- White, A., Fletcher, T.C., Pepys, M.B., Baldo, B.A., 1981. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-component levels in plaice (*pleuronectes platessa* L.) serum. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 69, 325–329. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(81\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0306-4492(81)90145-3)
- Wilfart, A., Garcia-Launay, F., Terrier, F., Soudé, E., Aguirre, P., Skiba-Cassy, S., 2023. A step towards sustainable aquaculture: Multiobjective feed formulation reduces environmental impacts at feed and farm levels for rainbow trout. *Aquaculture* 562, 738826. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738826>
- Wilson, J.M., Castro, L.F.C., 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes, in: *Fish Physiology*. Elsevier, pp. 1–55. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)
- Wilson, R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture, Fish nutrition and feeding* 124, 67–80. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90363-8)
- Woodgate, S.L., Wan, A.H.L., Hartnett, F., Wilkinson, R.G., Davies, S.J., 2022. The utilisation of European processed animal proteins as safe, sustainable and circular ingredients for global aquafeeds. *Reviews in Aquaculture* 14, 1572–1596. <https://doi.org/10.1111/raq.12663>
- Xia, J.H., Lin, G., Fu, G.H., Wan, Z.Y., Lee, M., Wang, L., Liu, X.J., Yue, G.H., 2014. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics* 15, 266. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-266>
- Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., Zhang, Y., Huo, L., Zhao, Z., Cao, D., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Liu, Z., Fan, Z., Shan, G., Li, X., Wu, S., Song, Lipu, Hou, G., Jiang, Y., Jeney, Z., Yu, D., Wang, L., Shao, C., Song, Lai, Sun, J., Ji, P., Wang, Jian, Li, Q., Xu, L., Sun, F., Feng, J., Wang, C., Wang, S., Wang, B., Li, Y., Zhu, Y., Xue, W., Zhao, L., Wang, Jintu, Gu, Y., Lv, W., Wu, K., Xiao, J., Wu, J., Zhang, Z., Yu, J., Sun, X., 2014. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nat Genet* 46, 1212–1219. <https://doi.org/10.1038/ng.3098>
- Yamaguchi, A., Botta, E., Holinstat, M., 2022. Eicosanoids in inflammation in the blood and the vessel. *Frontiers in Pharmacology* 13.
- Yar Ahmadi, P., Farahmand, H., Kolangi Miandare, H., Mirvaghefi, A., Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary Immunogen® on innate immune response, immune related genes expression and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 37, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.006>
- Yilmaz, E., Genç, M., Genç, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *ISRAELI JOURNAL OF AQUACULTURE-BAMIDGEH* 59.
- Yousefi, S., Monsef Shokri, M., Allaf Noveirian, H., Hoseinifar, S.H., 2020. Effects of dietary yeast cell wall on biochemical indices, serum and skin mucus immune responses, oxidative status and resistance against *Aeromonas hydrophila* in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Fish & Shellfish Immunology* 106, 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.007>
- Zargar, A., Rahimi-Afzal, Z., Soltani, E., Taheri Mirghaed, A., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Soltani, M., Yuosefi, P., 2019. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed *Thymus vulgaris* essential oils. *Aquac Res* 50, 3097–3106. <https://doi.org/10.1111/are.14243>

- Zeng, L.-Q., Li, F.-J., Li, X.-M., Cao, Z.-D., Fu, S.-J., Zhang, Y.-G., 2012. The effects of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.02.022>
- Zhang, Z., Chi, H., Dalmo, R.A., 2019. Trained Innate Immunity of Fish Is a Viable Approach in Larval Aquaculture. *Frontiers in Immunology* 10.
- Zhang, Z., Swain, T., Børgwald, J., Dalmo, R.A., Kumari, J., 2009. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.014>
- Zhao, C., Men, X., Dang, Y., Zhou, Y., Ren, Y., 2023. Probiotics Mediate Intestinal Microbiome and Microbiota-Derived Metabolites Regulating the Growth and Immunity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbiology Spectrum* 11, e03980-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03980-22>
- Zhao, J., Chen, J., Li, M., Chen, M., Sun, C., 2020. Multifaceted Functions of CH25H and 25HC to Modulate the Lipid Metabolism, Immune Responses, and Broadly Antiviral Activities. *Viruses* 12, 727. <https://doi.org/10.3390/v12070727>
- Zheng, L., Xie, S., Zhuang, Z., Liu, Y., Tian, L., Niu, J., 2021. Effects of yeast and yeast extract on growth performance, antioxidant ability and intestinal microbiota of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 530, 735941. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735941>
- Zhou, C., Ge, X., Lin, H., Niu, J., 2014. Effect of dietary carbohydrate on non-specific immune response, hepatic antioxidative abilities and disease resistance of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Fish & Shellfish Immunology* 41, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.024>
- Zhou, R., Wu, G., Qu, L., Zhong, X., Gao, Y., Ding, Z., Xu, J., Chen, X., Cheng, H., 2022. Effect of starvation on intestinal morphology, digestive enzyme activity and expression of lipid metabolism-related genes in javelin goby (*Synechogobius hasta*). *Aquaculture Research* 53, 87–97. <https://doi.org/10.1111/are.15555>
- Zhou, Z., Ringø, E., Olsen, R. e., Song, S. k., 2018. Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: A review. *Aquaculture Nutrition* 24, 644–665. <https://doi.org/10.1111/anu.12532>
- Zou, J., Secombes, C.J., 2016. The Function of Fish Cytokines. *Biology* 5, 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>

Résumé : La levure, un ingrédient durable pour améliorer l'efficacité des régimes à base de nouveaux ingrédients chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Depuis la fin des années 1990, l'aquaculture a bénéficié d'une expansion remarquable au point de dépasser la production des pêches de capture en 2012. Cette progression a permis de réduire la pression exercée sur les populations naturelles et d'élever le secteur au statut de contributeur majeur à la sécurité alimentaire mondiale. Les huiles et les farines de poissons sont traditionnellement utilisées pour la production d'aliments aquacoles mais leur disponibilité limitée ne permet plus de répondre à la demande du secteur. Chez les salmonidés, les aliments ont fortement évolué. Les ingrédients marins ont été en grande partie remplacés par des matières premières végétales mais aussi par des coproduits industriels d'animaux terrestres. Néanmoins, remplacer intégralement les ingrédients marins par des ingrédients alternatifs reste problématique car cela diminue la croissance, altère la qualité des produits et fragilise la santé des poissons. L'utilisation d'ingrédients fonctionnels tels que les levures pourrait donc être pertinente pour améliorer l'efficacité des nouveaux aliments. Ainsi, le principal objectif de cette thèse était d'évaluer les bénéfices d'une supplémentation en extrait de levure dans un régime alimentaire de truite arc-en-ciel qui ne contenait pas de farines de poissons mais des protéines végétales et des coproduits animaux. Les bénéfices de la supplémentation en levure ont d'abord été évalués à long terme sur 12 semaines d'alimentation. Les résultats indiquent que la substitution de la farine de poissons par des ingrédients alternatifs a un impact négatif sur la croissance des truites. Cependant, une supplémentation en extrait de levure permet de compenser cet effet et d'améliorer la croissance. L'analyse de paramètres immunitaires plasmatiques et l'étude histologique de l'intestin indiquent qu'il n'y a pas de réaction inflammatoire aiguë en réponse aux aliments, qu'ils soient supplémentés ou non en extrait de levure. Nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires pouvant être à l'origine des différences de croissance observées. Pour cela, un séquençage des ARNs et des microARNs a été réalisé sur deux tissus clés, le foie et l'intestin. Ces analyses transcriptomiques ont révélé que les régimes alternatifs, supplémentés ou non en extrait de levure, influencent l'expression de gènes impliqués dans les fonctions immunitaires et inflammatoires, dans la lutte contre les pathogènes et dans la coagulation. Les deux tissus présentent en revanche très peu de microARNs différenciellement exprimés ce qui n'a pas permis d'établir de lien entre les microARNs et les mécanismes sous-jacents aux phénotypes observés. Les performances et effets des ingrédients alternatifs sont généralement examinés sur le long terme sans nécessairement prendre en compte les réponses précoces des poissons. Par conséquent, les effets à court terme ont été évalués dans une seconde expérimentation ciblée sur les premiers repas mais qui n'a mis en évidence aucune répercussion précoce des aliments sur les défenses immunitaires et la structure de l'intestin. En revanche, le jeûne de courte durée appliqué avant le premier repas a modifié significativement l'expression de gènes impliqués dans les défenses immunitaires, la fonction de coagulation et la réponse au stress du réticulum endoplasmique. Par conséquent, les effets à long terme des régimes alimentaires de cette thèse, sur la structure de l'intestin et les transcriptomes hépatique et intestinal, ne semblent pas liés à une réaction précoce des poissons, mais plutôt à une adaptation à long terme. En conclusion, l'ajout de levure dans les nouveaux aliments aquacoles pourrait améliorer la robustesse de la truite arc-en-ciel et *in fine* sa croissance. Ces résultats confirment l'intérêt porté aux levures en alimentation aquacole mais soulèvent également des questions sur la pratique du jeûne de courte durée en élevage qui n'est pas sans conséquences physiologiques pour les poissons.

Abstract : Yeast as a sustainable ingredient to improve new diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Since the late 1990s, aquaculture has enjoyed a remarkable expansion, surpassing capture fisheries production in 2012. This progress has reduced pressure on natural populations and elevated the sector to the status of key contributor to global food security. Fish oil and fishmeal have traditionally been used for aquafeeds manufacturing, but their limited availability can no longer meet the sector's demand. In salmonids, feed composition have undergone significant changes. Marine ingredients have largely been replaced by plant-based raw materials but also industrial by-products from terrestrial animals. However, complete replacement of marine ingredients by alternative ones remains problematic as it decreases growth, compromises product quality and weakens fish health. The use of functional ingredients such as yeast may be relevant to improve the efficiency of new aquafeeds. Thus, the main objective of this PhD was to evaluate the benefits of a yeast extract supplementation in a rainbow trout diet that did not contain fishmeal but plant proteins and animal by-products. The benefits of yeast supplementation were first evaluated over a 12-week long-term feeding trial. The results indicate that substituting fishmeal with alternative ingredients has a negative impact on fish growth. However, yeast extract supplementation helps compensate this negative effect and improved growth. Analysis of plasma immune parameters and histological study of the gut indicate that there is no acute inflammatory response to feeds, whether supplemented with yeast extract or not. We sought to identify the molecular mechanisms that may underlie the observed differences in growth. For this purpose, RNA and microRNA sequencing were performed on two key nutritional tissues, the liver and the intestine. These transcriptomic analyses revealed that alternative diets, with or without yeast extract supplementation, influence the expression of genes involved in immune and inflammatory functions, pathogen resistance, and coagulation. However, both tissues show very few differentially expressed microRNAs, which did not allow establishing a link between the microRNAs and the underlying mechanisms of the observed phenotypes. The performance and effects of alternative ingredients are generally examined over the long term without necessarily considering the early responses of the fish. Therefore, short-term effects were evaluated in a second experiment focusing on the first meals with new diets but no impact of the diets on immune defenses and gut structure was observed. However, short-term fasting applied before the first meal significantly altered the expression of genes involved in immune defenses, coagulation functions, and the endoplasmic reticulum stress response. Therefore, the long-term effects of the diets used in this PhD on gut structure and hepatic and intestinal transcriptomes do not seem to be related to an early fish response but rather to long-term adaptation. In conclusion, the addition of yeast to new aquafeeds could improve the robustness and ultimately the growth of the rainbow trout. These results confirm the interest of using yeast in aquafeeds but also raise questions about the practice of short-term fasting in aquaculture, which is not without physiological consequences for fish.